

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 21 NR-2'94
(97-240)

Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej 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 Zeszytcie • Postępów Biologii Komórki •

Zeszyt ten jest poświęcony podstawowym problemom biotechnologii oraz wybranym zagadnieniom z tej dziedziny. Biotechnologii będzie również poświęcony specjalny suplement: "Postępów Biologii Komórki" (1/94), który wkrótce ukaże się pod redakcją prof. Z. Żaka z Instytutu Biologii Molekularnej UJ.

- Wypowiedzi pracowników nauki reprezentujących środowisko polskich biologów i biotechnologów podczas spotkania z parlamentarzystami w gmachu Senatu RP zamieszczono na stronach: 99 i 105. Prof. Andrzej Legocki z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu omawia nowe zdobycze genetyki i biologii molekularnej roślin, a prof. Wojciech J. Stec z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi uzasadnia konieczność i opłacalność rozwijania nowoczesnych biotechnologii w kraju.
- Przykładem dużego postępu biotechnologii w medycynie są intensywnie prowadzone badania nowej generacji leków swoiście inaktywujących ekspresję genów odpowiedzialnych za określone schorzenia np. wirusowe czy nowotworowe. Na s. 177 dr Mariusz Ratajczak z Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN oraz dr Tomasz Skórski z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, chwilowo przebywający w Filadelfii (USA), piszą o perspektywach wykorzystania oligonukleotydów antysensowych w medycynie doświadczalnej i klinicznej.
- Dokonany w ostatnich latach postęp wiedzy o mechanizmach regulacji ekspresji genów i czynników transkrypcyjnych u roślin opisują poraz pierwszy w piśmiennictwie polskim na stronach: 197-208 dr Marcin K. Filipecki i prof. Stefan Malepszy ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.
- Molekularne metody diagnostyki płci są ważne ze względu na możliwość zastosowania w genetyce oraz w praktyce medycznej i sądowej. Omawiają ten temat na s. 121 dr Michał Witt i dr Jadwiga Jaruzelska z Zakładu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.. Artykuł ten łączy się z opublikowanym uprzednio w zeszytcie nr 1 z 1994 r. (1994; 21: 93).
- Skład białkowy trzech podstruktur matryks jądrowej, tj. warstwy peryferycznej, resztkowych jąderek oraz sieci włóknisto-ziarnistej, jak również aktualne poglądy na temat specyficzności tych białek, głównych składników ważnej struktury jądrowej przedstawiają na s. 133 dr Piotr Szymczyk oraz prof. Zofia Kiliańska z Katedry Cytochemii Uniwersytetu Łódzkiego. Pierwsza część tego artykułu ukazała się w w nr 1 z 1994 r. (1994; 21: 27).
- Najnowsze badania nad oocytem ludzkim, a w tym nad receptorami uczestniczącymi w zapłodnieniu, o partenogenetycznej aktywacji oocytu ludzkiego oraz aktywnością transkrypcyjną genomu oocytu i przedimplantacyjnego zarodka ludzkiego, jak też nad metodami diagnostyki genetycznej opracowanymi na podstawie biologii molekularnej omawia na s. 165 dr Anna Niemierko z Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie.
- Oddziaływania makrofażów wątrobowych z innymi komórkami w tym narządzie opisuje na s. 227 doc. Joanna Kopeć-Szłęzak z Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.

Od Redakcji

W dniu 27 listopada ub. roku z inicjatywy Klubu Poselskiego Unii Demokratycznej odbyło się w Warszawie w Gmachu Senatu RP spotkanie parlamentarzystów z grupą pracowników nauki reprezentujących środowisko polskich biologów i biotechnologów. Celem spotkania było zwrócenie uwagi przedstawicieli obu izb Parlamentu na zatrważająco zmniejszający się stan finansowania polskiej nauki, konieczność wypracowania polityki naukowej państwa i zademonstrowanie, na przykładzie biotechnologii, zagrożeń, jakie stanowi nieinwestowanie u nas w rozwój nauki, oraz wagi, jaką rządy Stanów Zjednoczonych, Japonii, Niemiec i Wielkiej Brytanii przywiązują do rozwoju tej nowej multidyscypliny naukowej.

Spotkaniu przewodniczyła Wicemarszałek Senatu, Pani Prof. Zofia Kuratowska. Wprowadzeniem do dyskusji były referaty Przewodniczącego Komitetu Biochemii i Biofizyki PAN, prof. A. Legockiego (IChB PAN w Poznaniu) pt. „Nowe zdobycze genetyki i biologii molekularnej podstawą rozwoju biotechnologii roślin” oraz Przewodniczącego Komitetu Biotechnologii przy Prezydium PAN, prof. W. J. Steca (CBMiM PAN, Łódź): „Dlaczego należy promować nowoczesne biotechnologie?”. W dyskusji uczestniczyli m.in.: Przewodniczący KBN, prof. Witold Karczewski, Wiceprzewodniczący KBN, dr J. K. Frąckowiak, rektor Politechniki Warszawskiej, prof. M. Dietrich, prof. Z. Kuratowska oraz posłowie: prof. M. Górny i dr J. Lipski, jak i obecni na tym spotkaniu dziennikarze. Zaprezentowano zgodny pogląd, iż spotkanie uzmysłowiło obecnym, jak niebezpieczne dla bytu Państwa i Społeczeństwa jest niedostrzeżenie światowych tendencji uwrunkowania badań naukowych.

Redakcja „Postępów Biologii Komórki” zwróciła się do profesorów A. B. Legockiego i W. J. Steca o wyrażenie zgody na opublikowanie zaprezentowanych na tym spotkaniu referatów sądząc, że stanowią one godną propagowania formę popularyzacji nauki oraz tworzenia klimatu do poważniejszego traktowania przez gremia decyzyjne nauki jako czynnika rozwoju cywilizacyjnego i gospodarczego. Redakcja i Autorzy proszą Czytelników o wyrozumiałość w stosunku do uproszczeń bądź powierzchowności prezentacji niektórych zagadnień, co wynikało z konieczności przedstawienia tematyki biotechnologii w sposób prosty i nie wymagający od audytora wiedzy specjalistycznej.

NOWE ZDOBYCZE GENETYKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ PODSTAWĄ ROZWOJU BIOTECHNOLOGII ROŚLIN

Andrzej B. LEGOCKI

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Powszechnie używany termin: biotechnologia nie jest ściśle zdefiniowany i często budzi szereg kontrowersji. Biotechnologię jako nową naukę stosowaną określa się najczęściej jako dziedzinę wykorzystującą do celów praktycznych komórki żywe i ich fragmenty, rekombinowany DNA i geny syntetyczne, a także nowe techniki bioprosesowe. Nie jest to jednak definicja, a raczej pewien skrót myślowy, którego pełne rozwinięcie dopiero może wyjaśnić określenie przedmiotu zainteresowań i umiejscowienie biotechnologii wśród węższych dyscyplin przyrodniczych.

Wśród wielodyscyplinarnych nurtów biotechnologii można wyróżnić trzy powiązane ze sobą obszary zainteresowań:

- (1) obszar nauk podstawowych, takich jak: biochemia, genetyka, mikrobiologia, immunologia, które są prekursorami biotechnologii;
- (2) obszar zastosowań praktycznych, takich jak: nauki medyczne, rolnicze, technologia żywności i ochrona środowiska;
- (3) problemy socjoekonomiczne związane z wdrożeniem i rozwojem nowej nauki: własność intelektualna i ochrona patentowa, przepisy legislacyjne, bezpieczeństwo doświadczeń oraz wdrożeń.

Współczesna biotechnologia wywodzi się z biologii molekularnej, chemii i pokrewnych dziedzin podstawowych. Wraz z dynamicznym rozwojem tych dziedzin coraz to częściej uzyskiwane w pracowniach naukowych wyniki badań nie mieściły się w skali laboratoryjnej oraz w ramach czysto poznawczych celów. Na pograniczu nauk podstawowych i stosowanych gromadził się obszerny materiał faktograficzny, którego z osobna żadna z tych dziedzin nie mogłaby w pełni wykorzystać. I właśnie dzięki integracji zdobyczy podstawowych i zapotrzebowań praktycznych powstała obszerna dziedzina nauki, jaką jest nowa biotechnologia, która może być postrzegana

zarówno jako asocjacja wielodyscyplinarna, bądź też jako nowa i wyodrębniona dziedzina przyrodnicza.

Bez wątpienia przełomowe znaczenie dla ukształtowania się biotechnologii w jej obecnych zarysach miało ukazanie przez biologię molekularną możliwości trwałego modyfikowania zasobów genowych organizmów pod kątem wprowadzania do nich zdefiniowanych cech użytkowych. Było to możliwe dzięki opracowaniu metod klonowania i rekombinowania DNA określaných skrótowo jako inżynieria genetyczna. Nim jednak mogło do tego dojść, należało znacznie poszerzyć wiedzę na temat właściwości chemicznych i biologicznych kwasów nukleinowych oraz oddziałujących z nimi enzymów i czynników białkowych. W tej zaś dziedzinie jak wiadomo ostatnie dwie dekady przyniosły prawdziwie przełomowe odkrycia.

Zapoczątkowane dzięki tym zdobyczom biologii molekularnej manipulacje i transfery komórkowe określaných genów lub ich fragmentów miały na celu osiągnięcie kilku zasadniczych celów.

a. Wprowadzenie do komórki z pominięciem drogi ewolucyjnej nowej, użytecznej cechy poprzez trwałe włączenie do genomu tej komórki DNA obcego pochodzenia. Obecnie można wymienić wiele przykładów efektywnego wprowadzenia do gospodarczo ważnych organizmów pojedynczych genów kodujących takie cechy, jak np. oporność na antybiotyki czy środki chemiczne.

b. Ukierunkowane oddziaływanie na ekspresję określaných genów i poddanie ich różnorodnym mechanizmom kontroli związanym np. z warunkami stresowymi czy oddziaływaniem środowiska. Można wymienić tutaj wprowadzenie zależności ekspresji określanego genu od światła o odpowiedniej długości fali, temperatury czy induktorów chemicznych, takich jak związki flawonoidowe, fenolowe, oligosacharydy i in. Trzeba tu wspomnieć o determinantach organo- i tkankowo-specyficznej ekspresji genów, a także o uwarunkowaniach indukujących ekspresję genów w określanej fazie ontogenezy. Istota tego typu regulacji związana jest z regionami regulatorowymi genów, w których obrębie można wyróżnić fragmenty wzmacniające lub osłabiające ekspresję (elementy *cis*). Uczestniczą w niej także oddziałujące z DNA czynniki białkowe (elementy *trans*).

c. Selekttywne wyłączenie ekspresji genów konstytutywnych przez wprowadzenie do genomu komórki biorcy określanego genu w orientacji *anti-sense*. Transkrypcja DNA o takiej orientacji i utworzenie struktury dwuniciowej z "normalnym" komórkowym RNA powoduje wyłączenie z translacji danego genu. Może to mieć praktyczne znaczenie np. przy zmniejszaniu poziomu substancji inhibitorowych w komórce, związków antyżywnieniowych czy antymetabolitów.

Rolnictwo jest obszerną dziedziną praktycznego wdrażania nowych osiągnięć inżynierii genetycznej, biotechnologia roślin uprawnych zaś dostarczyła wielu przekonujących przykładów trwałego modyfikowania zasobów genowych roślin. Główne cele nowej biotechnologii roślin można ująć w kilka punktów:

- wprowadzenie do gospodarczo ważnych roślin uprawnych obcego materiału genetycznego dla polepszenia ich wartości żywieniowych (np. zwiększenia zawartości aminokwasów egzogennych w białkach zapasowych nasion) i technologicznych (np. podniesienie dostępności określonych białek przy izolacji, podwyższenie poziomu niektórych enzymów itp.);

- włączenie do genomu roślin uprawnych genów oporności na patogeny i szkodniki (grzyby, wiroidy, wirusy, owady), a także oporności na chemiczne środki ochrony (herbicydy, pestycydy);

- wprowadzenie do genomów roślin genów zwiększających ich oporność na czynniki stresowe oraz niekorzystne warunki środowiska. Do tej grupy czynników należą: нефizjologiczny odczyn gleby, wysoka zawartość metali ciężkich, zasolenie, działanie niektórych związków chemicznych wydzielanych przez mikroorganizmy, a także niska temperatura;

- obniżenie energochłonności produkcji roślinnej oraz działania na rzecz rolnictwa proekologicznego przez rozszerzenie biologicznego wiązania azotu atmosferycznego i tym samym zmniejszenie zależności plonowania od nieobejętych dla środowiska nawozów chemicznych, których produkcja należy do wysokoenergetycznych;

- zwiększenie wydajności fotosyntezy, np. przez optymalizację fotosystemów i aparatu asymilacyjnego, przedłużenie okresu wegetacji oraz usprawnienie pobierania składników mineralnych przez rośliny;

- wykorzystanie w większym stopniu tzw. roślin alternatywnych dostarczających odnawialnych źródeł energii oraz surowców dla przemysłu, a także przeciwdziałanie efektowi szklarniowemu m.in. przez usprawnianie obiegu węgla w przyrodzie i działania proekologiczne na rzecz ochrony zasobów wodnych i atmosfery.

Wymienione niektóre cele główne nowych biotechnologii nie wyczerpują znacznie dłuższej listy zadań jednostkowych mających na celu poprawę plonowania i jakości pierwotnych produktów roślinnych. Możliwości, które się tutaj ujawniły, są bardzo duże. Zidentyfikowanych zostało wiele genów mogących kodować cechy użytkowe. Wprowadzenie ich jednak do roślin uprawnych wymaga rozpoznania mechanizmów regulacyjnych, które umożliwią włączenie ekspresji wprowadzanego genu pod kontrolę rośliny biorcy. Te zaś zagadnienia należą do stosunkowo mało rozpoznanych, zwłaszcza jeżeli idzie o wyjaśnienie tak złożonych kwestii, jak swoistość gatunkowa, odmianowa i osobnicza.

Obecnie dzięki znacznemu udoskonaleniu stosowanych metod wprowadzanie obcego DNA do komórek roślinnych z pominięciem tradycyjnych podejść genetyki mendelowskiej sprowadza się w wielu przypadkach do postępowania rutynowego o charakterze jedynie technicznym. Najszerzej stosowane są dwie technologie transformacji komórek roślinnych:

- transformacje za pomocą wektorów *Agrobacterium tumefaciens* lub *A. rhizogenes* zachodzące wskutek przeniesienia bakteryjnych plazmidów Ti lub Ri (zawierają-

cych w obrębie regionu T-DNA odpowiednio wmontowany gen obcego pochodzenia) do genomu roślin dwuliściennych,

– transformacje bezpośrednie (bezwektorowe) przez mikroiniekcję, elektroporację i mikrowstrzeliwanie.

Oprócz szerokiego stosowania tych metod prowadzone są prace nad adaptacją wektorów wirusowego pochodzenia oraz nad manipulacjami mobilnymi fragmentami chromosomów roślin (transpozonami). Badania te mają na celu m.in. opracowanie dogodnych metod transformacji roślin jednoliściennych, które pod względem produkcji żywności należą do najważniejszych.

Istotnym elementem wprowadzenia określonego genu do rośliny jest opracowanie metodyki regeneracji rośliny po transformowaniu jej fragmentu lub pojedynczej komórki. Obecnie poznane są warunki do regeneracji wielu, choć nie wszystkich roślin o znaczeniu gospodarczym. Regenerację prowadzi się zależnie od rośliny i metody transformacji: z tkanki kalusowej, fragmentów liści, niedojrzałych zarodków lub korzeni. Mimo postępu w tej dziedzinie napotykanne naturalne bariery i osobnicze ograniczenia przy wprowadzaniu roślin transgenicznych stanowią, iż jest to ciągle jedno z tych zadań praktycznych, które stale należy podejmować i udoskonalać.

Przekonujących przykładów użyteczności nowych biotechnologii dostarczyły udane próby wprowadzenia do roślin uprawnych cech oporności na herbicydy. Kontrola i zwalczanie chwastów metodami tradycyjnymi są jak wiadomo bardzo pracochłonne, a także wymagają znacznych nakładów energii. Z pomocą przyszła tutaj inżynieria genetyczna. Zidentyfikowane zostały pojedyncze geny oporności na dany herbicyd, które można było wprowadzić do genomu rośliny dzięki technologii rekombinowania DNA. Stosowane były dwa zasadnicze podejścia:

a) modyfikacja genu dla białka "docelowego" (*target protein*) w genomie rośliny albo wprowadzanie dodatkowych kopii tego genu lub

b) wprowadzenie do rośliny genu kodującego białko degradujące herbicyd, zanim ten zacznie działać (białka detoksyfikujące).

Przykładów naturalnych biodegradacji dostarczają takie enzymy, jak: nityrlaza z *Klebsiella azaenae* dla herbicydu Buctril, acetylotransferaza ze *Streptomyces hydroscopicus* dla herbicydu Basta czy monoooksygenaza z *Alcaligenes eutrophus* dla 2,4-D. Obecnie jest już dostępnych handlowo szereg linii roślin uprawnych z wprowadzonymi cechami oporności na określony herbicyd. Inną kwestią, którą można w tym miejscu jedynie sygnalizować, jest problem dopuszczenia przez agencje ochrony środowiska w poszczególnych krajach zmodyfikowanych linii roślin uprawnych do upraw polowych na skalę produkcyjną.

Innym przykładem możliwości nowych biotechnologii jest wprowadzanie linii roślin uprawnych opornych na porażenie wirusami. Wykorzystywane są do tego celu naturalne geny oporności występujące w przyrodzie, których ekspresja może prowadzić do ograniczenia procesu namnażania wirusów przez:

– blokowanie dojrzewania białek wirusowych,

- blokowanie replikacji wirusowych RNA,
- ograniczanie przenoszenia wirusa do komórek sąsiednich lub przez indukcję obronnej nadwrażliwości rośliny na infekcję (*hipersensitive virus response*). Możliwe jest także wykorzystanie do tych celów genów “sztucznych”, będących wynikiem konstrukcji i manipulacji genetycznych. Należy tutaj wymienić wprowadzenie do rośliny genów dla białek płaszcza wirusów, zmniejszenie podatności roślin na infekcję przez zakażenie satelitarnym RNA, wprowadzenie do genomu rośliny fragmentów wirusowego RNA w orientacji *anti-sense*, czy wreszcie wykorzystanie struktur rybozymów – łańcuchów RNA o właściwościach autohydrolytycznych. Trzeba też wspomnieć o potencjalnej roli protekcji krzyżowej na porażenie szkodliwymi wirusami.

Technologia rekombinowania DNA w hodowli roślin umożliwiła pozyskanie nowych, niezmiernie użytecznych narzędzi diagnostycznych i selekcyjnych. Należą do nich techniki oparte na polimorfizmie fragmentów restrykcyjnych DNA - RFLP, amplifikacji fragmentów genomowego DNA z arbitralnie wybranymi starterami – RAPD, a także techniki oparte na markerach mikrosatelitarnych. Ten ostatni typ markerów wykorzystuje polimorficzne powtórzenia tandemowe krótkich sekwencji DNA obecne w genomach większości organizmów wyższych. Wykorzystanie tych markerów w hodowli roślin, a także stosowanie zautomatyzowanych metod szybkiej analizy DNA jako narzędzia selekcyjnego może wydatnie przysłużyć się wyprowadzaniu nowych, wartościowych linii roślin uprawnych o pożądanym genotypie. Można tutaj mówić o bezpośrednim związku pomiędzy nowoczesnym warsztatem diagnostycznym biologii molekularnej a klasyczną hodowlą roślin.

Na zakończenie warto uczynić uwagę, iż istnieje szereg obszarów podstawowych mających na celu wyjaśnienie istotnych zależności pomiędzy budową genomu roślinnego, organizacją pojedynczych genów a użytkowymi właściwościami poszczególnych gatunków, w tym uprawnych. Niekiedy związek taki wydaje się dość odległy, aby bezpośrednio wykorzystać go praktycznie. Można jednak z pewnym uproszczeniem przyjąć, że nieznaną molekularnych uwarunkowań zjawisk związanych z ekspresją genów w trakcie rozwoju, reakcji na różnorodne bodźce środowiska, nieznaną precyzyjnych mechanizmów determinujących ekspresję genów cyklu komórkowego i wielu innych zjawisk tutaj niewymienionych może być poważnym ograniczeniem dalszego wykorzystywania nowych biotechnologii w zwiększeniu i polepszeniu produkcji roślinnej. Wymienione tutaj przykłady kwestii podstawowych, należących do tzw. probiotechnologicznych zasobów wiedzy mogą w istocie wywrzeć decydujący wpływ na możliwości praktycznego wdrożenia nowych biotechnologii w sposób, który pozwoli na osiągnięcie z góry założonych celów aplikacyjnych.

DLACZEGO NALEŻY PRZYJMOWAĆ NOWOCZESNE BIOTECHNOLOGIE?

Wojciech Jacek STEC

Przewodniczący Komitetu Biotechnologii przy Prezydium PAN

Zakład Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN w Łodzi

Należę, jako szeregowy pracownik PAN do tej grupy pracowników, która prowadzi badania naukowe hobbistycznie zajmuje się także problemami polityki naukowej Państwa i to nie z tytułu, iż sobie nie radzimy w naszej pracy i zgłaszamy przy każdej okazji szereg bolączek. Zajmujemy się z dwóch zasadniczych powodów:

Po pierwsze, wierni jesteśmy zasadzie, iż wiedza, tak jak i władza, nakłada brzemień odpowiedzialności. Wierni tej maksymie uważamy, że nie wolno nam nie dostrzegać światowych tendencji w rozwoju nauki, jako awangardy postępu, zarówno technicznego jak i cywilizacyjnego, w świecie, i musimy się domagać utrzymania kondycji nauki po to, aby nie pogłębiać szczeliny czy też rozstępu pomiędzy poziomem badań naukowych w Polsce a poziomem w czołowych państwach świata.

Po drugie, nie jest nam obojętny społeczny odbiór nauki. Nie akceptujemy zasady, iż każde państwo musi kierować określony procent dochodu narodowego na badania naukowe tylko dlatego, że tak wypada, a uczeni muszą dostawać środki na to, aby zaspokajać swoją ciekawość intelektualną.

Uważam, że twórca dochodu narodowego, czyli podatnik, ma prawo domagać się określenia, jakie cele społeczno-ekonomiczne przyświecają uczonym i na ile badania naukowe przyczynią się do poprawy i świadomości, i bytu Polaka. Świadomy twórca dochodu narodowego powinien wiedzieć, że zysk z badań naukowych, jakkolwiek nie byłby liczony, nie może się pojawić wcześniej niż za lat 10, co nie oznacza, że pytań o cele społeczno-ekonomiczne do nauki kierować nie należy. Chcę także oświadczyć, że nie reprezentuję kosmopolitycznego poglądu na sprawy nauki. Uważam, że jest polska nauka; wyniki uzyskiwane tu w kraju, za pieniądze polskiego podatnika stanowią polską naukę i one powinny służyć temu krajowi i temu społeczeństwu. Tak

się złożyło, że w ramach mego ostatniego rocznego pobytu w USA byłem dwukrotnie zapraszany jako laureat Nagrody Narodowych Instytutów Zdrowia Stanów Zjednoczonych, do tzw. Przesłuchań Kongresowych. W marcu każdego roku, dyrektorzy instytutów NIH, a jest ich w ramach tego ugrupowania ok. 30, muszą przed komisją Kongresu, której przewodniczy Senator Natcher, wygłosić 9-minutowe przemówienie, które przede wszystkim eksponuje cele badań, jakie będą służyły obywatelom Stanów Zjednoczonych oraz interesom Stanów Zjednoczonych jako państwa. Przesłuchanie trwa ok. 45 minut i zarówno odpowiadający, jak i przesłuchujący są świetnie przygotowani do dyskusji. W odpowiedzi nie wolno się chować za przysłowiową całą, za równanie matematyczne, czy też za nową cząstkę materii czy antimaterii – Dyrektorzy ze swymi asystentami muszą odpowiadać językiem prostym i zrozumiałym dla obecnych.

Cieszę mnie fakt, iż mam zaszczyt przed Wysoką Komisją i Panami Posłami i Senatorami przedstawić pogląd na temat celowości koncentracji sił i środków na stworzenie w Polsce nowoczesnej biotechnologii.

Zanim przejdę do omawiania biotechnologii, chcę jednak powiedzieć, że tę dzisiejszą dyskusję przede wszystkim uważam jako początek dialogu uczelnia-Parlament po to, aby wyartykułować szereg naszych uwag na tematy także wykraczające poza specjalistyczne kręgi biotechnologii. Jedno z działań biotechnologii, do której wprowadzenia dokonał Pan Profesor Legocki, to działanie w kierunku ochrony środowiska – **Biotechnologia ekologiczna**. Polega ona m.in. na zmienianiu metodami rekombinantowymi mikroorganizmów, które będą zdolne w sposób bardziej efektywny powodować metabolizm trucizn przemysłowych w procesach uzdatniania wód odpadowych i ściekowych. Biotechnologia ekologiczna to selekcjonowanie szczepów bakteryjnych zdolnych do wychwytywania z gleby jonów metali, którymi są tak zanieczyszczone obszary Śląska, szczególnie w okolicach hut, co powoduje szereg schorzeń o podłożu genetycznym u nowonarodzonych dzieci. Ten proces uwalniania gleby od jonów metali nazywa się **bioremediacją**. Ale nie łudźmy się Panowie Posłowie, że takie działania mogą przynieść jakikolwiek wymierny skutek ekologiczny, jeśli jednocześnie w dalszym ciągu głównym materiałem energetycznym będą węgiel kamienny i węgiel brunatny, którego spalanie powoduje emisję węglowodórów aromatycznych o właściwościach kancerogennych, dwutlenku siarki powodującego kwaśne deszcze i zatrucie atmosfery, powoduje wreszcie kumulację radionuklidów i jonów metali w popiołach, wydobywanie węgla z kopalń zaś będzie powodowało dobowy wyrzut z wodami kopalnianymi 6000 ton suchej masy minerałów do zlewisk Wisły i Odry. Nie łudźmy się, że biotechnologia ekologiczna rozwiąże problem zdrowej wody, czynnika niezwykle ważnego dla zdrowia całych populacji i pewnie całego społeczeństwa, jeśli każda fabryka mechaniczna zajmująca się obróbką metali każdego dnia zrzuca do ścieków tony smarów, ropy, środków myjących i orddzewiaczy metali technologicznych.

Nie łudźmy się, że biotechnologia zmierzająca do poprawy plonowania drogą otrzymywania transgenicznych roślin gwarantujących wyższe plony poprawi czy polepszy dostęp do środków żywności, kiedy te rośliny będą się rozwijały w zatrutej atmosferze kumulując zanieczyszczenia, a jednocześnie ich plony będą podlegały stratom w procesie przechwalnictwa i przetwórstwa na skutek np. niedorozwoju przemysłu chłodniczego i przechwalniczego.

Podejście do zagadnienia, iż inwestowanie w naukę z przesłanek ekonomiczno-społecznych bez harmonijnego działania innych i bardzo ważnych sektorów maszyny państwowej przypomina mi, a chyba i wielu innym obecnym, okresy naszej młodości i tzw. czyny społeczne, kiedy łopatami i taczkami poprawialiśmy wygląd trawników, poboczy dróg, placów i skwerów, często po to, aby po kilku dniach buldożery zniszczyły plony tej pracy kładąc np. nowe rurociągi.

Tyle ogólnego komentarza o konieczności harmonijnego i konsekwentnego działania w budowaniu skutecznego modelu relacji Nauka - Gospodarka - Społeczeństwo.

Biotechnologia jako jedno z przedsięwzięć napędzających gospodarkę ma w przodujących państwach świata 20-letnią tradycję. W tabeli 1 zestawione są fakty, które towarzyszyły narodzinom współczesnej biotechnologii na świecie. Ich wybór i zestaw może się wydawać niespójny, gdyż porównuje przysłowioie "jabłka i pomarańcze", ale celem moim jest przybliżenie Państwu tych wszystkich uwarunkowań, które musiały być spełnione, aby zaistniała współczesna biotechnologia.

TABELA 1. Historia rozwoju współczesnej biotechnologii

1973	Pierwszy eksperyment klonowania genów (recDNA)
1974	Pierwsze doświadczenie hybrydyzacji komórkowej Publiczna dyskusja nad bezpieczeństwem i konsekwencjami techniki recDNA
1976	Utworzenie pierwszego przedsiębiorstwa wykorzystującego technikę recDNA (Genentech) Powołanie w Anglii grupy doradczej ds. manipulacji genetycznej
1980	Decyzja Sądu Najwyższego USA o patentowalności mikroorganizmów Opatentowanie (Cohen-Boyer) techniki konstruowania genów metodą recDNA Raport Spinksa (Anglia) o priorytecie w zakresie R&D dla biotechnologii Leistungsplan (RFN) – Decyzja Bundestagu o konieczności R&D w obszarze biotechnologii Rekord giełdowy (Wall Street) wzrostu cen udziałów firmy Genentech (USD 35. → 89. w 20 min)
1981	Pierwszy zestaw diagnostyczny skonstruowany w oparciu o p-ciała monoklonalne zaakceptowany przez FDA Japonia (MITI) ogłasza 1981 "rokiem biotechnologii" W USA powstaje ponad 80 małych przedsiębiorstw biotechnologicznych Wystawienie firmy Cetus na giełdzie powoduje najwyższe w historii Wall Street zebranie oferty publicznej (USD 115 milionów)
1982	Pierwsza rekombinantowa zwierzęca szczepionka zatwierdzona do stosowania w Europie (<i>calibacellosis</i>) Insulina ludzka otrzymywana drogą rekombinantową wprowadzona do stosowania w USA oraz Anglii

1983	Pierwsza ekspresja genu roślinnego w roślinie innego gatunku Firmy biotechnologiczne uzyskują USD 500 mln z tzw. oferty publicznej
1985	EPA zezwala firmie Advanced Genetic Sciences, Inc. na zastosowanie polowe (ale w kontrolowanej skali) rekombinantowych bakterii <i>P. syringae</i> i <i>P. fluorescens</i> pozbawionych genu kodującego białko odpowiedzialne za nukleację lodu (przemarzanie)
1986	Urząd ds. Polityki Naukowej i Technologicznej (Agenda Kongresu USA) wydaje dokument "Coordinated Framework for the Regulation of Biotechnology" "Akt transferu technologii" rozszerza prawa firm prywatnych do komercyjnego wykorzystania wyników badań sponsorowanych przez rząd USA
1987	Urząd Patentowy USA ogłasza decyzję, iż rekombinantowe zwierzęta (<i>non-human animals</i>) mogą być przedmiotem patentu
1988	Narodowy Instytut Zdrowia ustanawia program rozszyfrowania (mapowania) ludzkiego genomu Udzielenie pierwszego patentu zastrzegającego wykorzystanie transgenicznych myszy z wszczepionymi liniami nowotworowym (modele zwierzęce do testowania leków p-nowotworowych)
1989	Bioremediacje – pierwsze wykorzystanie bakterii do likwidacji skutków rozlania ropy naftowej Sąd w RFN podejmuje decyzję o przerwaniu konstrukcji zakładu mającego produkować białka techniką recDNA Chugai Pharmaceuticals (Japonia) wykupuje Gen-Probe (USA)
1990	recRENINA zatwierdzona przez FDA do wykorzystania w produkcji sera: pierwsze rec białko w produkcji żywności Bundestag (RFN) zatwierdza "Gene Law" określające prawnie dopuszczalne zastosowania biotechnologii Mycogen, po decyzji EPA, podejmuje testowanie genetycznie inżynierowanych biopestycydów Hoffman-Laroche (Szwajcaria) wykupuje firmę Genentech (USA) Pierwsze kliniczne próby "Terapii Genowej" (zaakceptowane przez FDA)
1991	Firmy biotechnologiczne w USA emitują i sprzedają nowe udziały o wartości USD 17,7 miliarda (5 miesięcy – rekord giełdy) Chiron wykupuje Cetus Corp. za USD 660 mln – największa transakcja łączenia firm biotechnologicznych

Chcę zwrócić uwagę, że biotechnologii nie da się opisać ani jako zespołu technik, ani multidyscypliny naukowej, ani zespołu technologii wykorzystujących procesy życiowe prymitywnych i wyższych organizmów do wytwarzania ekonomicznie bardzo korzystnych i opłacalnych produktów. Obok badań poznawczych z biologii oraz ich niemalże natychmiastowego wykorzystania w produkcji, biotechnologia wymaga określenia uwarunkowań prawnych i legislacyjnych ze względu na jej aspekt interwencji w przyrodę, której człowiek jest tylko częścią, oraz konsensusu społecznego, tj. społecznego przyzwolenia na wykorzystanie procesów określanych "życiem" i nie przekraczania kodeksu etycznego. Ważna jest zatem społeczna percepcja nowych biotechnologii i społeczne przyzwolenie, tak jak w przypadku energetyki jądrowej, na jej utylizację. Co najistotniejsze, biotechnologia wymaga szybkiej interwencji kapitału skłonnego do inwestowania.

Nie oznacza to jednak, iż mimo tych dwudziestu lat opóźnienia w stosunku do świata nie będą popierał i namawiał do rozwoju nowoczesnej biotechnologii w Polsce. Przechodząc do konkretów, biotechnologię jako zespół nauk adaptujących z wielu dziedzin nauk biologicznych różne techniki można rozpatrywać biorąc pod uwagę jej cele. Są możliwe aplikacje *nowoczesnych biotechnologii* do celów:

- **wyżywieniowych**
- **ochrony zdrowia**
- **ochrony środowiska naturalnego**
- **pozyskiwania niekonwencjonalnych zasobów i źródeł energii**
- **innych**

Zastosowanie biotechnologii w dziedzinie żywienia społeczeństwa i odpowiednie zabiegi biotechnologiczne przedstawił Pan Profesor Legocki (w artykule na s. 99).

Biotechnologie dla ochrony zdrowia społeczeństwa:

- ◆ Uzyskiwanie nowych generacji leków
- ◆ Profilaktyka: nowe szczepionki (rekombinantowe)
- ◆ Diagnostyka: sondy hybrydizacyjne, p-ciała monoklonalne
- ◆ Nowe strategie leczenia: terapia genowa, antysensowy mRNA

Na czym polega **cud biotechnologiczny**?

Wiadomo, że niektóre organizmy, np. bakteryjne, wzrastają i namnażają się bardzo szybko i w warunkach prymitywnych i tanich pożywek zwiększają swą masę 2500 raza w ciągu 6 godzin.

<i>Escherichia coli</i> (paleczka okrężnicy):	Objętość 1 komórki	≈ 10 ⁻¹² cm ³
	Waga	≈ 1,5 pg
	Waga suchej masy	≈ 0,25 pg
	Cykl życiowy	≈ 20 min
	Białka stanowią 50% wagi suchej masy	
	Zawartość białka w 1 komórce	≈ 0,15 pg
W hodowli w warunkach optymalnych uzyskuje się		
po 6 godzinach (18 podziałów) 2500-krotny wzrost masy		
Np. w hodowli o objętości 1 l		
	z inokulum o zawartości	≈ 0,3 mg białka
	uzyskuje się po 6 godzinach	≈ 750 mg białka

Jeśli daną bakterię bądź drożdże, bądź komórkę roślinną lub zwierzęcą w hodowli komórkowej zmusimy do zaadaptowania informacji genetycznej bądź też genu dla niej obcego i uzyskamy efekt, że ten obcy gen ulegnie ekspresji, tzn. że dana bakteria bądź drożdże, bądź komórka będą produkowały nieswoiste, obce dla siebie białko, które było zaszyfrowane w strukturze tego obcego genu, zrealizujemy proces tzw. "manipulacji genetycznej". Jeśli to będzie gen białka, które np. wytwarza człowiek i białko to pełni w jego życiu ważną funkcję, a więc jest to np. konieczny dla jego rozwoju hormon, czynnik wzrostowy czy inna substancja regulatorowa, zmuszając tę

bakterię do produkcji pożądanego białka, jesteśmy w stanie uzyskać je nie z krwi ludzkiej ani też z organów ludzkich, takich jak np. przysadki mózgowie czy inne gruczoły, realizujemy proces inżynierii genetycznej.

W ten prosty sposób w kierowanym przeze mnie Zakładzie Chemii Bioorganicznej w roku 1987 doc. J. Kłysik wytworzył bakterię, która była zdolna do produkcji ludzkiego, tzw. czynnika martwicy nowotworu. To białko zawierające 156 aminokwasów jest produkowane przez ludzkie makrofagi, lecz jego uzyskiwanie ze źródeł naturalnych jest nie tylko nieoptymalne, ale wręcz niemożliwe. Białko to po podaniu do guza nowotworu powoduje jego zanik na skutek selektywnego oddziaływania z tkanką nowotworową. Niestety, działaniu temu towarzyszą efekty uboczne, takie jak bardzo rozległy stan zapalny. Dzięki decyzji Fundacji na Rzecz Rozwoju Nauki Polskiej w roku 1992 w Zakładzie Chemii Biologicznej wytworzyliśmy w warunkach laboratoryjnych 3 g białka, które rozdysponowaliśmy do szeregu polskich Klinik Onkologicznych w celu prowadzenia badań nad skutecznością i bezpieczeństwem stosowania tego związku w terapii nowotworowej. Wysokość dotacji FNP wynosiła 1,6 mld zł. Wartość wytworzonego białka wg najniższych cen katalogowych przekracza sumę 80 mln USD. Takie są światowe ceny produktów nowoczesnej biotechnologii i na tym polega cud biotechnologiczny.

Pokazując ten przykład, chciałem nie tylko zilustrować zjawisko powielania biologicznego, ale także pokazać, iż w zakresie nowej biotechnologii nie tylko ją popularyzujemy, ale staramy się ją także uprawiać. Obecny na sali Prof. Płucienniczak może dostarczyć Państwu szeregu dalszych przykładów.

Przykładem nowych leków i terapeutyków bądź biotechnologicznych metod uzyskiwania znanych i występujących w przyrodzie leków, które dotychczas nie były dostępne ze względu na ograniczoność źródeł ich pochodzenia, może być krew, która zawiera kilkadziesiąt, jeśli nie kilkaset różnego rodzaju czynników, ale wiadomo, że krew była zawsze materiałem bezcennym (jeśli nawet przystawowym materiałem bezcennym) i jej dostępność jest oczywiście ograniczona. Pozwolę sobie wymienić przykład jednego ze składników krwi, jakim jest **interferon- α** stosowany w szeregu skojarzonych terapii poprawiających m.in. odporność. Jedną dawkę leczniczą interferonu- α uzyskuje się z przerobu 200 l krwi ludzkiej. Konstruując gen i wklonowując ten gen do bakterii, bądź drożdży, a więc organizmów, które w ciągu 18 godzin zwiększają swoją masę 2500 razy, i hodując je na prymitywnych pożywkach, takich jak wyciągi z kości, czy też w przypadku drożdży cukier i dodatki soli mineralnych, możemy uzyskać właśnie drogą rekombinantową te same preparaty w ilościach nieorganicznych.

Listę leków i szczepionek uzyskanych drogą recDNA ilustrują kolejne tabele.

Najbardziej spektakularne przykłady to erytropoetyna (wartość sprzedaży erytropoetyny i G-CSF w roku 1992 w skali światowej – 1,2 mld USD); tPA – tkankowy aktywator plazminogenu – białko liczące 524 aminokwasy, czynnik łączący się z plazminą, który docierając do włókniaka powoduje rozpuszczanie zakrzepów. Poda-

TABELA 2. Leki/szczepionki uzyskiwane drogą biotechnologiczną (zatw. FDA)

Produkt	Firma	Zalecenia	Akceptacja FDA	Zysk 1989	Zysk 1990
Epogen (erytropoetyna)	AMGEN	anemia	czerwiec 1989	95	300
Neupogen (G-CSF)	AMGEN	chemioterapia	luty 1991	–	–
Humatrope (somatostatyna)	ELI LILLY	regulacja wzrostu	marzec 1987	40	50
Humulina (rec insulina)	ELI LILLY	cukrzyca	październik 1982	200	250
Aktywaza (tPA)	GENENTECH	zawały	listopad 1987	175	200
Actimmune Interferon-gamma	GENENTECH	infekcje	grudzień 1990	–	–
Protropin (somatrem)	GENENTECH	regulacja wzrostu	październik 1985	100	120
Roferon (interferon- α 2)	HOFFMAN-La ROCHE	białaczka, nowotwór kości, AIDS	czerwiec 1986	40	60
Leukine (GM-CSF)	IMMUNEX	infekcje w przeszczepach szpiku	marzec 1991	–	–
Recombivacs HB (szczepionka HBV)	MERCK	prewencja WZW	czerwiec 1986	100	110
Orthoclone OKT	ORTHO-BIOTECH	odrzuć przeszczepu nerek	czerwiec 1986	30	35
Procrit (erytropoetyna)	ORTHO-BIOTECH	AIDS	grudzień 1990	–	–
Hibiter (szczepionka)	PAXIS BIOLOGICS	grypa (B)	grudzień 1988	10	30
Intron (interferon- α 2B)	SCHERING-PLOUGH	białaczka	czerwiec 1986	60	80
Energic-B (szczepionka WZW)	SMITH KLINE BEECHAM	WZW	wrzesień 1989	20	30

wany w 4 godziny po wystąpieniu zawału powoduje w 95% jego cofnięcie i wyleczenie.

Uzyskiwanie tego białka z organizmów ludzkich jest kompletnie nieopłacalne. Wartość nakładów badawczych, projektowych i technologicznych, wliczając w to marketing, przekroczyła sumę kilkunastu milionów USD. Technologia wytwarzania tPA została sprzedana firmie Hoffman LaRoche. Białko tPA w latach 1987-1992 przyniosło firmie Genentech ponad 1 mld USD zysku.

Tabela 3 zawiera listę innych enzymów trombolitycznych i fibrynolitycznych, produkowanych i stosowanych w leczeniu bądź testowanych dla jego potrzeb;

uwagę zwraca różnorodność firm biotechnologicznych: amerykańskich, japońskich i europejskich, zaangażowanych w te badania.

Bardzo interesującym przykładem, który przemawia za koniecznością uzyskiwania białek o zastosowaniu terapeutycznym metodami rekombinantowymi jest przykład ludzkiego hormonu wzrostowego. W jednym przypadku na 2000 nowonarodzonych dzieci występuje tzw. karłowatość. Ludzki hormon wzrostowy występuje w przysadkach mózgowych i tradycyjnie pozyskiwano go ekstrakcją z przysadek od osób zmarłych. Ze względów oczywistych, i naturalnych, przysadki są uzyskiwane z mózgow ludzi, którzy zakończyli życie raczej w starszym wieku. Tak się złożyło, że w Stanie Kalifornia, a także i we Francji, preparaty otrzymane tą drogą były zakażone patogenami, których nie umiano wykrywać. Patogeny te powodowały chorobę Jacobsa-Creutzfelda. Nie muszę mówić o tym, jak wielce niebezpieczny był ten preceuder i jak przykre były jego konsekwencje. Chcę podkreślić, że preparaty rekombinantowe nie mogą zawierać takich patogenów.

Oddzielny i olbrzymi zarazem, już dzisiaj istniejący rozdział biotechnologii, to otrzymywanie metodami rekombinantowymi nowych szczepionek oraz białkowych komponentów składowych testów diagnostycznych, a zatem wzrost działania w kierunku zarówno immunoprofilaktyki, jak i diagnostyki. Rysunek 1 przedstawia dynamikę wzrostu w latach 1980–1991 liczby zgłoszonych w FDA Stanów Zjednoczonych nowych leków; uderzająca jest dynamika wzrostu liczby nowych leków wytwarzanych metodami biotechnologicznymi.

TABELA 3. Enzymów trombolityczne i fibrynolityczne

Streptokinaza	Hoechst-Roussel Kabivitrum	Produkcja w bakteriach
Urokinaza	Abbot Lab. Genex Mitsui Toatsu Chem. Genentech Grunenthal	Ekstrakcja z hodowli komórkowych rec DNA
Ludzki aktywator tkankowego plazminogenu	Genentech Mitsubishi Kyowa Hakko Kooyo Biogen Fujisawa Integrated Genetix Toyobo Pharm. Chiron Collaborative Research Green Cross (Jap)	rec DNA, ekstrakty z hodowli komórkowych
Antykoagulanty i czynniki fibrynolityczne	Genentech Yamaguchi Ltd. Genex	Produkujące linie bakteryjne

TABELA 4. Białka o potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych uzyskiwane metodą rec-DNA

Substancja	L.A.	Funkcja	Stan R&D	Sponsor	Zastosowanie
Ludzkie regulatory wzrostu					
Hormon wzrostu (GH)	191-198	Promotor wzrostu	Klonowanie i ekspresja (1979)	Genentech Kabi Gen Eli Lilly	Promocja wzrostu Przyspieszenie gojenia ran pooparzeniowych, Kacheksja
Somato-statyna	14	Hamuje wydzielanie GH	jw., 1977	Genentech	Cukrzyca
Somatomedyna	44-59	Mediator działania GH	jw., 1982	Chiron	Promotor i regulator wzrostu
Czynnik uwalniania hormonu wzrostu (GHRF)	44	Reguluje poziom GH w przysadce mózgowej	jw., 1982	Salk Institute	Promotor wzrostu
Regulatory wapnia					
Kalcytonina	32	Inhibitor resorpcji Ca z kości	recDNA	Genentech	Zwapnienie kości
Hormon przytarczyczyzny (PTH)	84	Mobilizuje Ca, hamuje wydzielanie kalcytoniny	sklonowany, nie produkowany	Amgen Mass. Gen. Hospital	Osteoporoza
Hormony reproduktywne					
Hormon luteinizujący (LH)	(łańcuch β) 115	Induktor owulacji	Glikoproteina (w trakcie realizacji)	Integrated Genetisc, Sereno Labs	Leczenie bezpłodności
Gonadotropina ludzka	(łańcuch β) 147	jw.	w trakcie badań	jw.	jw., testy ciąży
Relaksyna	52	ułatwianie porodu	w trakcie badań	Genentech	zmiękczanie okostnej, p-reumatyk (?)
Limfokiny i peptydy immunoaktywne					
Interleukina-2	133	Promotor aktywności i wzrostu limfocytów T	sklonowany	Ajinamoto Jap. Cancer Inst. Immunix Cetus, Chiron Genex, Biogen Genetics Inst. Quipel	Immunoterapia
Tymozyna (ALPHA-1)	28	Promotor limfocytów pomocniczych	Oczyszczony, sklonowany (1979)	Hoffman-LaRoche Genentech	Erytmatoza, Immunoterapia
Tymopoetyna	49	Inhibitor różnicowania komórek β	-	Orthopharm	P-nowotworowy, immunoregulator
Czynnik hamujący makrofagi	-	Hamuje migracje makrofagów	Fuzja komórkowa	Penki-Kagaku	Immunoterapia

Tabela 4 cd.

Substancja	L. A.	Funkcja	Stan R&D	Sponsor	Zastosowanie
Regulatory systemu oddechowego Alfa-1-Antytrypsyna	ok. 230	Czynnik osłonowy p-elastazie	recDNA w drożdżach	Zymos Corp. Cooper Labs	Rozedma płuc
Peptydy neuroaktywne β-Endorfina	31	P-bólowy	Sklonowanie i ekspresja	Amgen	P-bólowy

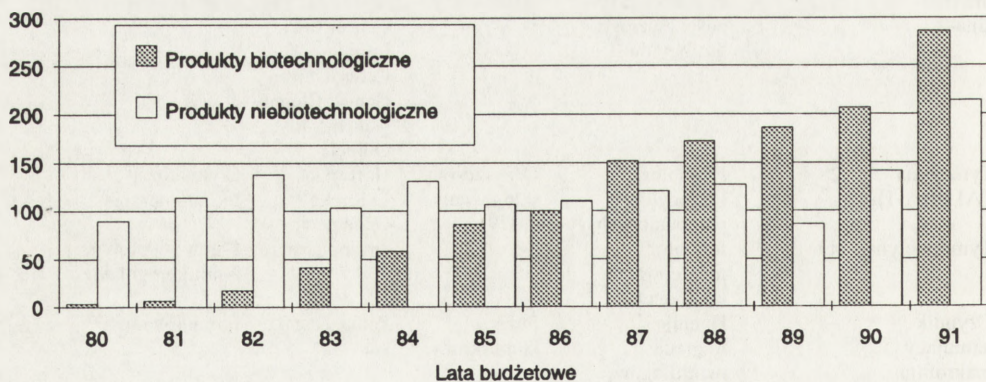
L. A. – liczba aminokwasów

Wreszcie chciałbym wymienić taki dział biotechnologii, jak terapia genowa i koncepcja antysensowego mRNA (rys. 2).

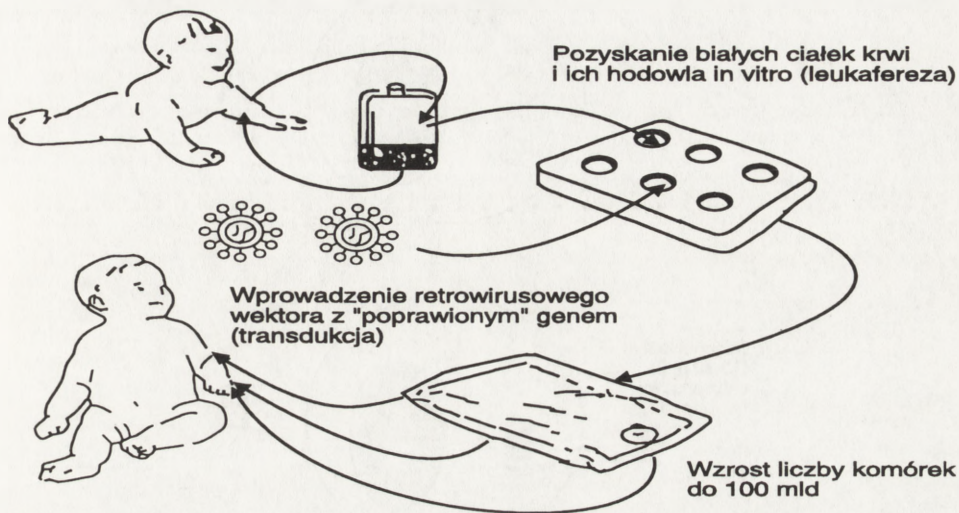
Terapia genowa w sposób genialny wykorzystuje występujące w przyrodzie wirusy, które poddane manipulacji genetycznej są pozbawione właściwości patogennych, dzięki zaś swej inwazyjności wprowadzają do organizmu ludzkiego informację genetyczną naprawiającą defekt genetyczny.

Technologia antysensowego mRNA jest jeszcze ciągle w wieku swego “niemowlęstwa”, choć prowadzone są pierwsze próby kliniczne, w których to za pomocą chemicznie konstruowanych związków, najczęściej stanowiących analogi oligonukleotydów, blokuje się ekspresję “niezdrowego” bądź “niechcianego” białka (rys. 3).

Celowo wybierając biotechnologię służącą ochronie zdrowia i medycynie chciałbym przez chwilę uwagę wysokiej Komisji skupić na problemie, jak dalece w Stanach Zjednoczonych Prezydent i Kongres przykładają wagę do sprawy rozwoju biotechnologii. Pierwsze opracowanie Urzędu Rozwoju Technologicznego w zakresie bio-



Rys. 1. Propozycje zgłoszeń do Administracji Żywności i Leków (FDA) nowych leków pochodzenia biotechnologicznego i innych – w latach 1980–1991



Rys. 2. Pierwsze doświadczenie w zakresie ludzkiej terapii genowej – 14 wrzesień 1990 r.

technologii pojawiło się w roku 1981. W latach 1991 i 1992 ukazały się dwa ważne dokumenty: *Biotechnology for the 21st Century* oraz *Biotechnology in a Global Economy*. Jako motto do jednego z tych opracowań zacytowano zdanie Wice prezydenta USA, D. Quayle: *Stany Zjednoczone są światowym liderem w biotechnologii. Prognozuje się, że ten 2 miliardowy przemysł (1991) osiągnie w roku 2000 wartość produkcji 50 miliardów USD.*

Inne stwierdzenie to:

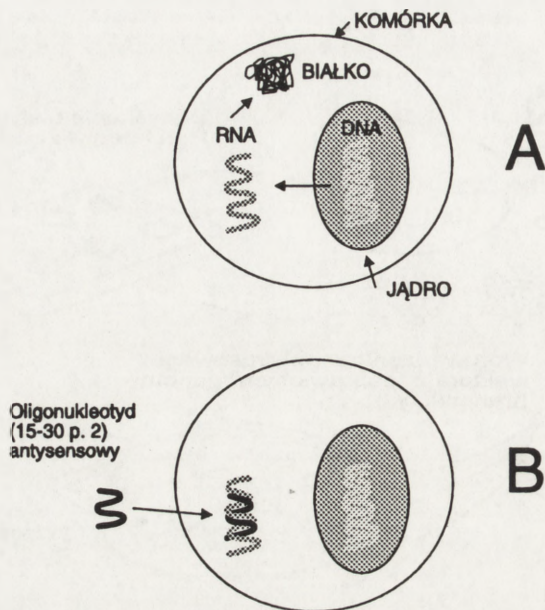
Kluczem do utrzymania naszej konkurencyjnej pozycji na światowym rynku biotechnologii jest zdecydowane wsparcie badań podstawowych oraz kształcenie w zakresie biotechnologii.

W kolejnych tabelach demonstruję: strukturę Prezydenckiej Strategicznej Inicjatywy Biotechnologicznej (tab. 5) oraz strukturę nakładów na badania w zakresie nowych biotechnologii w roku 1990 (tab. 6).

Kolejno przedstawiam propozycję Prezydenta USA na rok 1993 dotyczącą nakładów na nowe biotechnologie (rys. 4) oraz dynamikę wzrostu nakładów w latach 1991–1993 (tab. 7).

Na co chciałbym zwrócić szczególną uwagę Wysokiej Komisji, to:

1. Niewątpliwie Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej (DHHS) zdominowało wszystkie inne resorty. W ten sposób chcę usprawiedliwić przed Państwem swą samowolną decyzję ukazania tylko jednego oblicza biotechnologii, jakim jest Biotechnologia dla Ochrony Zdrowia.



Rys. 3. Technologia antysensowego mRNA

2. Zwracam uwagę na sposób dystrybucji środków: nie są one rozdysponowywane przez jednego decydenta, a przez szereg agencji rządowych.

3. Na podkreślenie zasługuje wysokość nakładów na **badania podstawowe** służące rozwojowi biotechnologii, a uprawiane w wielu innych dziedzinach i dyscyplinach nauki: biologii, fizyki, chemii, inżynierii. Zderzenie tej pozycji z innymi wyraźnie wskazuje na **naukogenny** charakter nowoczesnej biotechnologii.

Kończąc swoje wystąpienie, sędzę i podkreślam, że nauka i rozwój nauki jest podstawowym warunkiem dla możliwości rozwoju biotechnologii. To co uzyskują uczeni, jest bardzo ściśle chronione zastrzeżeniami patentowymi. To w Stanach Zjednoczonych miał miejsce pierwszy przypadek patentowania nowych rekombinowanych mikroorganizmów. To w Stanach Zjednoczonych pojawił się jako pierwszy odruch chronienia tzw. narodowej własności intelektualnej.

To w Stanach Zjednoczonych powstał projekt opatentowania genomu ludzkiego. Bez własnych badań nie ma mowy o oczekiwaniu na spektakularne zyski przynoszone przez biotechnologię. Świadomość taką miało środowisko naukowe w Polsce, opracowując w roku 1984 "Raport w sprawie Biotechnologii" (Komitet Biochemii i Biofizyki PAN) oraz powołując w PAN dwa programy - badawczo-rozwojowe oraz badań podstawowych w latach 1986-1990: "Molekularne Podstawy Biotechnologii" oraz "Inżynieria Genetyczna Roślin". Biotechnologii poświęcono także odpowiednią uwagę w materiałach III Kongresu Nauki Polskiej. W ramach wyżej wymienionych

TABELA 5. Biotechnologiczna inicjatywa badawcza USA (1993)

Badania dla: Rolnictwa, Energetyki, Środowiska, Zdrowia, Innych gałęzi przemysłu, Podstawowe (pre-biotechnologiczne)	Uwarunkowania socjalno-społeczne: Badanie socjologicznych, ekonomicznych i prawnych zjawisk towarzyszących biotechnologii.	Infrastruktura: <i>Konstrukcja i zasady bezpiecznej eksploatacji zakładów biotechnologicznych,</i> <i>Edukacja, programy nauczania, staże, przed- i po-doktorskie stypendia.</i> <i>Instrumentacja (wyspecjalizowane dla biotechnologii).</i> <i>Banki mikroorganizmów, linii komórek, sond molekularnych itp.</i> <i>Banki informacyjne.</i>
---	--	---

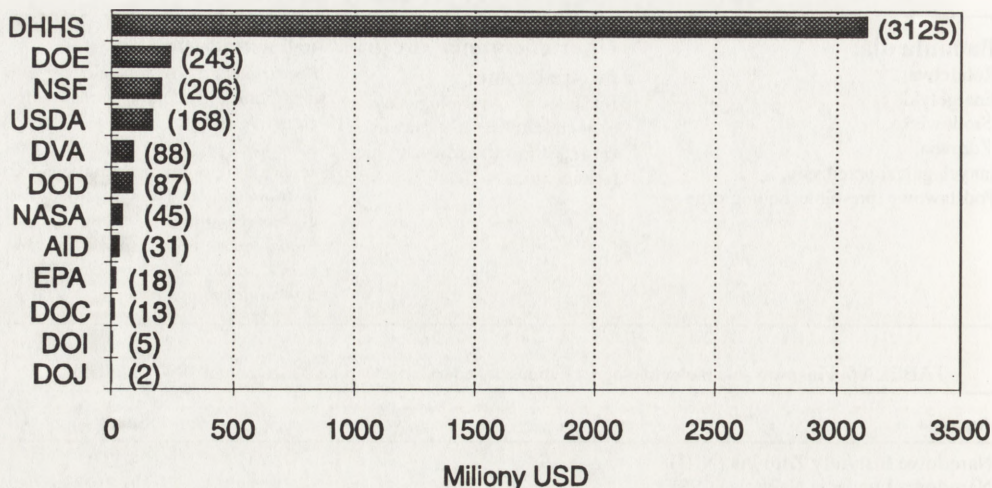
TABELA 6. Finansowanie biotechnologii z Funduszu Federalnego w roku budżetowym 1990 (mln USD)

Agencja	Suma
Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH)	2900,0
Narodowa Fundacja Naukowa (NSF)	167,9
Ministerstwo Rolnictwa (DOA)	116,0
Ministerstwo Obrony (DOD)	98,0
Ministerstwo Energetyki (DOE)	82,2
Agencja Współpracy Międzynarodowej (AID)	28,7
Administracja Leków i Żywności (FDA)	19,4
Agencja Ochrony Środowiska (EPA)	8,3
Administracja Rezerw Wojskowych (VA)	7,5
Narodowy Instytut Standardów i Technologii (NIST)	4,8
Administracja Badań Kosmicznych (NASA)	4,5
Administracja Badań Oceanicznych i Atmosferycznych (NOAA)	2,0
RAZEM	3439,3

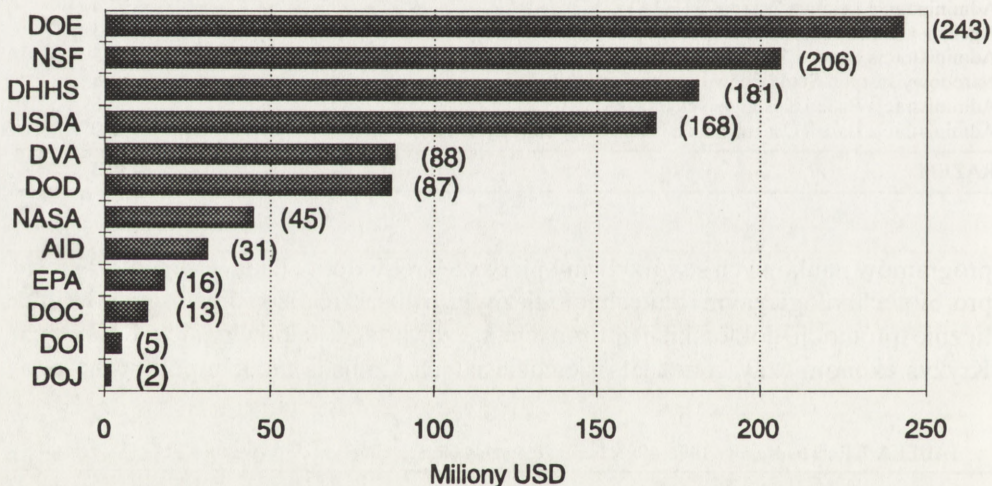
programów naukowych stworzyliśmy pierwsze zręby frontu badawczego w zakresie pro-biotechnologicznym i biotechnologicznym, o ilości zrealizowanych tematów oraz liczbie promocji doktorskich informacje są zawarte w odpowiednich Raportach. Kryzys ekonomiczny końca lat osiemdziesiątych i zmiana modelu polityczno-eko-

TABELA 7. Lata budżetowe 1991–1993: budżet federalny biotechnologii w USA (w mln USD – % wzrostu)

Kierunek	1991	1992	1993
Rolnictwo	174,2	190,5 (9%)	207,5 (9%)
Energia	65,5	80,4 (23%)	106,9 (33%)
Środowisko	62,3	68,6 (10%)	83,3 (21%)
Zdrowie	1421,3	1593,8 (12%)	1680,4 (5%)
Podstawowe	1259,5	1417,5 (13%)	1499,7 (6%)
Inne	88,9	98,8 (11%)	123,8 (25%)
Socjalno-Społeczne	6,5	9,0 (38%)	9,2 (2%)
Infrastruktura	301,2	300,7	319,6 (6%)
RAZEM	3379,4	3759 (11%)	4030,4 (7%)



Rok finansowy 1993: 4,030 mld USD



Rok finansowy 1993: 1,087 mld USD

Rys. 4. Prezydencka propozycja budżetu federalnego USA dla badań w zakresie biotechnologii: u góry – w przekroju agencyjnym, u dołu – bez uwzględnienia Narodowych Instytutów Zdrowia – NIH

nomicznego państwa zahamowały rozwój tematyki, a w sferze kadrowej odnotowaliśmy najpoważniejsze straty z tytułu emigracji najzdolniejszych pracowników. Powstaje pytanie: jak realizować program promocji biotechnologii? Oczywiście,

podstawowym warunkiem jest zrealizowanie programu kształcenia biologów i biotechnologów i wymuszenie oraz upowszechnienie szerokiego frontu badawczego. Politykę tę mogą wymusić resorty odpowiedzialne za kształcenie studentów oraz Komitet Badań Naukowych. Uważam, że uczelniom, które prowadzą proces kształcenia bądź będą prowadziły proces kształcenia i unowocześnienia kształcenia w zakresie biologii i specjalizacji pro-biotechnologicznych, trzeba stworzyć warunki wyposażenia w podstawowy i niezbyt kosztowny sprzęt laboratoryjny ("roздаć karabiny"). Jednocześnie, należy jak najszerszej upowszechnić program nauczania, na współczesnym poziomie, nowych biotechnologii opartych o zasady znajomości biologii molekularnej, genetyki molekularnej, mikrobiologii, biologii komórkowej, biologii roślinnej, biologii zwierzęcej.

Współczesny poziom nauczania wymaga, aby proces dydaktyczny był wspierany uprawianym w tej samej szkole procesem badawczym. To utworzy sieć, węzłami zaś tej sieci powinny być instytuty o uznanym dorobku naukowym. Zaczątki tworzenia węzłów takich możemy już odnotować w Polsce, bo za takową inicjatywę należy uznać "Program Bimol" – w tym miejscu chcę wyrazić słowa uznania Fundacji na Rzecz Rozwoju Nauki Polskiej za niezwykle trafny wybór obszaru promocji nauki.

Wysoka Komisjo! Oczywiście zawsze istniał, szczególnie w sytuacji ogólnego niedostatku środków bądź też niepełnego zrozumienia konieczności finansowania nauki, problem wyboru. Wybór musi być dokonany przez polityków, którzy zdecydują o strategicznych kierunkach rozwoju Państwa i o wspieraniu tych kierunków badaniami naukowymi. Będę zawsze zwolennikiem koncentracji na badaniach przyrodniczych i deterministycznego charakteru polityki naukowej. Nie ma recepty ani na skuteczne badania, ani na sukcesy naukowe, ale na pewno, zgodnie zresztą z tendencjami rozwoju nauki światowej, są wyraźne obszary ukierunkowania i koncentracji badań. Starłem się to uwypuklić przykładem Stanów Zjednoczonych. Uważam, że czas na wygenerowanie polityki naukowej oraz wytypowanie Misyjnych Programów Naukowych. Gdyby mnie zapytano, jaki program uważam za jeden z najpilniejszych i akceptowalnych i przez środowisko naukowe, i społeczeństwo, to uznałbym za takowy problem zwalczania chorób układu krążenia. Polska zajmuje czołową pozycję światowej listy państw o najwyższej umieralności ludzi w wieku produkcyjnym, właśnie z powodu tych chorób. A zakres opracowań naukowych metod zwalczania zjawiska nadciśnienia jest bardzo szeroki, od wręcz socjologicznych, poprzez sugerowane zmiany diety i sposobu żywienia, poprzez szeroką akcję edukacyjną w społeczeństwie, poprzez kreowanie ośrodków transplantologii oraz kardiologii, aż po badania szczegółowe procesów komórkowych odpowiedzialnych za system regulacji ciśnienia w organizmie ludzkim, i na podstawie wiedzy o molekularnych mechanizmach badanych zjawisk – konstruowanie nowych leków. O celowość powołania takiego Programu należy zapytać Kolegów lekarzy.

Istnieje oprócz organizacji badań naukowych szereg innych problemów, które należy rozwiązać po to, aby w Polsce również zafunkcjonowała Nowoczesna Biotech-

nologia. Za takowe uważam prawne uregulowania procesu transferu technologii i wyników badań uprawianych za pieniądze podatnika, system ich promocji i zasady przekazywania do wdrażania zarówno państwowym, jak i prywatnym przedsiębiorstwom. To pole w Polsce szczególnie niejasne.

Kończąc chcę ponownie uciec od biotechnologii i przypomnieć, że dla realizacji jakiegokolwiek przedsięwzięcia potrzebne są programy, środki finansowe i zaplecze kadrowe. Z tym ostatnim w Polsce sytuacja jest szczególnie dramatyczna. Lokalizacją kadr rządzą te same prawa termodynamiki zarządzające zjawiskami transferu masy czy ciepła. Gradient jest bardzo czytelny: miesięczne zarobki wynoszą w Rosji 40 USD, w Polsce 200 USD, w USA 2,400 USD dla osoby o tych samych kwalifikacjach naukowych. Bez utworzenia dla elity intelektualnej warunków dla pozostania w Polsce i uprawiania swych badań w Kraju nie łudźmy się żadnymi szansami stworzenia Nowoczesnej Biotechnologii w Polsce.

MOLEKULARNE METODY DIAGNOSTYKI PŁCI I ICH ZASTOSOWANIE W MEDYCYNIE I GENETYCE*

METHODS OF MOLECULAR SEXING AND THEIR APPLICATION IN MEDICINE AND GENETICS

Michał WITT, Jadwiga JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie. Określanie płci na poziomie molekularnym, sprowadzające się do detekcji sekwencji DNA specyficznych dla chromosomu Y, znajduje obecnie szerokie zastosowanie np. do detekcji mozaicyzmu w dysgenезji gonad, mapowania chromosomu Y i charakterystyki jego aberracji, diagnostyki prenatalnej chorób sprzężonych z płcią czy badań medyczno-sądowych. W artykule omówiono również techniczne strony stosowanych metod detekcji DNA chromosomu Y, szczególnie nacisk kładąc na najnowsze techniki oparte o PCR.

Słowa kluczowe: określanie płci, chromosom Y, dysgenезja gonad, mozaicyzm, mapowanie delecyjne, choroby sprzężone z płcią

Summary. Molecular sexing focusing on the detection of Y chromosomal specific DNA sequences currently finds broad application in detection of mosaicism in gonadal dysgenesis, in mapping of the Y chromosome and characterization of its aberrations, in prenatal diagnostics of sex-linked genetic disorders and in forensic studies. In this paper technical aspects of molecular methods being applied for detection of Y chromosomal DNA has also been described with particular emphasis on the latest, PCR-based methodology.

Key words: molecular sexing, Y chromosome, gonadal dysgenesis, mosaicism, deletion mapping, sex-linked disorders

Precyzyjne określanie płci na poziomie DNA (ang. *molecular sexing*), sprowadzające się do detekcji DNA chromosomu Y przy użyciu różnorodnych metod diagnostycznych, cieszy się znacznym zainteresowaniem wielu laboratoriów molekularnych. Wielorakie możliwości zastosowania tych metod w genetyce oraz praktyce medycznej stawiają je w grupie bardzo użytecznych narzędzi badawczych i diagnostycznych. Same metody w miarę poznawania struktury chromosomu Y przybierały różne formy, a wykorzystywano w nich wiele nowoczesnych technik molekularnych.

*Artykuł napisany w ramach realizacji programów badawczych KBN: nr 4 4734 92 03 i nr 4 0531 92 01.

Poniżej przedstawiono kilka ważnych obszarów genetyki i medycyny, do których rozwoju wprowadzenie tych metod przyczyniło się w istotny sposób.

DETEKCJA MOZAICYZMU W DYSGENEZJI GONAD

Osoby z dysgenezją gonad mają szczątkowe gonady, z reguły występujące w postaci pasm tkanki łącznej. Często charakteryzują się one niskim wzrostem i całym zestawem cech fenotypowych, które w sumie określa się jako cechy typowe dla zespołu Turnera. Monosomia chromosomu X została zidentyfikowana jako genetyczna podstawa zespołu Turnera w roku 1959, jednakże kariotyp osób z fenotypem zespołu Turnera, obok 45,X, może również przedstawiać się jako: 46,XX; 45,X/46,XX; 46,XY; 45,X/46,XY itd.; obecne w nim mogą być także różnorodne aberracje struktury chromosomów płciowych [55]. Obrazuje to, iż pojęcie fenotyp zespołu Turnera jest znacznie szersze niż jednostka nozologiczna zespół Turnera. W rzeczywistości zaledwie 40–60% chorych z fenotypem zespołu Turnera ma kariotyp 45,X [51]; u pewnej części pozostałych osób z tym fenotypem w kariotypie stwierdza się obecność materiału chromosomu Y [34]. Obecnie postuluje się, że występowanie zespołu Turnera związane może być z monosomią genu RPS4, kodującego białko rybosomowe S4 wchodzące w skład małej podjednostki rybosomu [13]. Gen ten ma dwie homologiczne kopie: jedną na chromosomie X (RPS4X), drugą na chromosomie Y (RPS4Y), a białkowe produkty obu genów są funkcjonalnie ekwiwalentne. W modelu tym zakłada się, że do normalnego rozwoju organizm człowieka potrzebuje dwóch kopii locus RPS4 na komórkę, a powstanie fenotypu typowego dla zespołu Turnera wiąże się, przynajmniej po części, z występowaniem tylko jednej kopii tego genu [66].

Grupa osób o dysgenetycznych gonadach i kariotypie 46,XY charakteryzuje się wyraźnie zwiększoną zapadalnością na nowotwory gonad, przede wszystkim gonadoblastoma. Około 96% przypadków gonadoblastoma znaleziono u takich właśnie osób [64]. Znaczna większość chorych z gonadoblastoma to fenotypowe kobiety; zaledwie 4% to fenotypowi mężczyźni z nieprawidłowymi narządami płciowymi wewnętrznymi lub zewnętrznymi. Gonadoblastoma często występuje razem z dysgerminoma (50%) czy innymi zmianami złośliwymi, wywodzącymi się z komórek zarodkowych (10%) [58]. Prawdopodobieństwo rozwoju nowotworu gonad w tej grupie chorych jest o ok. 30% wyższe niż w grupie kontrolnej [35].

Podobna sytuacja ma również miejsce u chorych z dysgenetycznymi gonadami oraz mozaicyzmem 45,X/46,XY i wszelkimi jego wariantami. Przypadki o fenotypie zespołu Turnera ze współistniejącym mozaicyzmem 45,X/46,XY określane są jako mieszana dysgenezja gonad, w przeciwieństwie do czystej dysgenezji gonad, w której obok fenotypu żeńskiego, pasmowatych gonad i niedorozwoju płciowego nigdy nie stwierdza się cech somatycznych zespołu Turnera, kariotyp zaś może być 46,XX lub

46,XY. W grupie osób z mieszaną dysgenezą gonad stwierdza się wielkie zróżnicowanie fenotypów, które zapewne jest odbiciem różnorodnego rozłożenia tkankowego poszczególnych linii komórkowych. Etiologia mozaicyzmu 45,X/46,XY nie jest ostatecznie udowodniona – z reguły zjawisko to interpretuje się jako wynik nondy-zjunkcji mitotycznej lub opóźnienia w anafazie [64]. Morfologicznie gonady chorych z mozaicyzmem 45,X/46,XY nie różnią się od gonad chorych 45,X, jednak prawdopodobieństwo nowotworzenia jest tu znamienne podwyższone i wynosi 15–20% [33, 64]. Mozaicyzmowi często towarzyszą aberracje struktury chromosomu Y [16]. Ze względu na potencjalne zagrożenie rozwojem choroby nowotworowej osoby o fenotypie żeńskim z mozaicyzmem 45,X/46,XY, podobnie jak kobiety 46,XY, powinny być poddane gonadektomii. W praktyce klinicznej ten sposób leczenia często stosuje się profilaktycznie również u chorych z fragmentarycznymi, cytogenetycznie nieidentyfikowalnymi chromosomami płciowymi, np. 45,X/46,X,r(?), gdyż takie chromosomy mogą być w rzeczywistości fragmentami chromosomu Y [15, 42]. Co więcej, znane są przypadki chromosomów markerowych opisywanych jako pierścieniowe chromosomy X, które po ponownej analizie metodami molekularnymi okazały się pochodnymi chromosomu Y [23]. Zabieg chirurgiczny jest szczególnie pilny, jeżeli u chorego stwierdza się rozwój gruczołów piersiowych, co może oznaczać obecność nowotworu produkującego estrogeny (gonadoblastoma lub dysgerminoma).

Wysunięto hipotezę, że za indukcję nowotworzenia w dysgenetycznych gonadach odpowiedzialny jest gen obecny w chromosomie Y, który wstępnie nazwano GBY (*Gonadoblastoma locus on Y chromosome*), a który działać miałby jako onkogen [47]. Takie działanie gen GBY przejawiałby tylko w przypadkach współistnienia dysgenetycznych gonad oraz prawdopodobnie jeszcze innych, dotąd nieznanymi czynników (np. mutacji somatycznej GBY). W jądrach u zdrowych mężczyzn gen GBY odgrywałby fizjologiczną rolę, związaną prawdopodobnie ze spermatogenezą. Jeśli chodzi o lokalizację hipotetycznego locus GBY, to wstępnie przypisano je do interwałów delecyjnych 4B-7 chromosomu Y (odcinek od centromeru do końca ramienia długiego); ostatnie doniesienia sugerują jednak lokalizację pericentromerową [41, 53].

W kontekście tych danych szczególnego znaczenia nabierają szybkie, precyzyjne i czułe testy pozwalające jednoznacznie identyfikować mozaicyzm z udziałem linii komórkowych zawierających chromosom Y lub jego fragmenty. Czułość konwencjonalnych testów cytogenetycznych w wielu przypadkach może okazać się niewystarczająca do detekcji mikro-mozaicyzmu (mozaicyzmu o niskiej zawartości drugiej linii komórkowej) lub subtelnych aberracji strukturalnych i wtedy jedynym rozwiązaniem, mogącym sprostać wymogom takiej analizy, staje się zastosowanie metody molekularnej, opierającej się o bezpośrednią analizę DNA.

MAPOWANIE CHROMOSOMU Y I CHARAKTERYSTYKA JEGO ABERRACJI

Specyficzną cechą chromosomów płciowych (heterochromosomów) ssaków jest brak homologii struktury pomiędzy obydwoma chromosomami tej pary na prawie całej ich długości. Powoduje to ograniczenie rekombinacji mejozytycznej jedynie do niewielkich, dystalnych fragmentów ich ramion krótkich, które homologię tę zachowują i pomiędzy którymi dochodzi do wzajemnej wymiany materiału genetycznego w trakcie podziału mejozytycznego (*crossing-over*). Odpowiednia część chromosomu Y ma długość ok. 2.5×10^6 bp i nosi nazwę regionu pseudoautosomowego (PAR). Taki przebieg mejozy uniemożliwia mapowanie pozostałej, znacznie większej części chromosomu Y poprzez konstrukcję mapy sprzężeń genetycznych; alternatywą jest tu mapowanie fizyczne poprzez charakterystykę naturalnie występujących delecji fragmentów tego chromosomu (mapowanie delecyjne). Tak utworzona mapa delecyjna pozwala uporządkować loci w kolejności wzdłuż chromosomu. Mapa taka stanowi podstawę do lokalizacji nowych genów w obrębie chromosomu Y; ponadto może służyć do badania zmienności struktury chromosomu Y w populacji, do porównania struktury chromosomów Y i X, do badań ewolucyjnych, czy wreszcie do wyjaśnienia mechanizmów powstawania chromosomów Y o nieprawidłowej strukturze.

Pierwsze próby mapowania delecyjnego chromosomu Y wykorzystywały korelacje nieprawidłowego fenotypu z cytogenetyczną analizą anomalii struktury chromosomu Y [59]. Kolejnym etapem była charakterystyka delecji techniką Southerna przy użyciu sond molekularnych specyficznych dla różnych fragmentów chromosomu Y [29]. Wprowadzenie PCR umożliwiło szybką, często jednoczasową analizę obecności lub braku licznych loci na całej długości chromosomu Y [40]. Dotąd najbardziej precyzyjną mapę delecyjną chromosomu Y uzyskano przez detekcję sekwencji STS (*sequence-tagged sites*) [65]. Są to krótkie odcinki sekwencji genomowych o dokładnie określonej lokalizacji, mogące służyć jako „punkty orientacyjne” w genomie, jednocześnie dające się łatwo wykryć przy użyciu PCR. Ze 155 sekwencji STS, wyselekcjonowanych z biblioteki genomowej skonstruowanej przy użyciu DNA chromosomu Y, 88 okazało się specyficznych dla chromosomu Y, 30 było wspólnych dla chromosomów X i Y, 25 było wspólnych dla chromosomu Y i przynajmniej jednego z autosomów, 10 było specyficznych dla autosomów i 2 dla chromosomu X. Pozwoliło to na podzielenie regionu euchromatynowego chromosomu Y na 43 interwały delecyjne, każdy o długości nie większej niż 800 kb. Każdy z interwałów zdefiniowany jest przez naturalnie występujące punkty pęknięcia chromosomu Y. Przy użyciu metod tradycyjnych w całym chromosomie Y wyróżniano zaledwie 7 interwałów delecyjnych [63]. Znaczna gęstość sekwencji STS w części euchromatynowej chromosomu Y pozwoliła na wykonanie mapy fizycznej tego regionu na podstawie klonów genomowego DNA zawartych w sztucznych chromosomach drożdżowych (YACs, *yeast artificial chromosomes*) [14].

Jednym z najważniejszych efektów mapowania delecyjnego chromosomu Y było zlokalizowanie w jego krótkim ramieniu sekwencji TDF (*testis determining factor*), której obecność wydaje się kluczowa dla złożonego procesu determinacji płci; jej działanie najprawdopodobniej sprowadza się do warunkowania wstępnego impulsu genetycznego inicjującego rozwój gonady pierwotnej w kierunku jądra [7, 22]. Oczywiście jest, że użycie detekcji sekwencji genu TDF jako kryterium płci stanowiłoby test o wybitnej specyficzności i informatywności diagnostycznej. Pierwszym kandydatem, podejrzanym o pełnienie funkcji TDF był gen ZFY (*zinc finger of the Y chromosome*) [48]. Mimo że wkrótce udowodniono, iż ZFY nie jest jednoznaczny z TDF [25, 49], sekwencji tego genu użyto do diagnozowania płci przy użyciu PCR [9, 54], jednakże specyficzność tych testów wydaje się wątpliwa.

Sekwencją w chwili obecnej uważaną za TDF jest gen SRY (*sex-determining region of the Y chromosome*) [56]. Wykazano np. obecność mutacji tego genu w przypadkach czystej dysgenezy gonad u kobiet o kariotypie 46,XY, występujących zarówno rodzinnie [20], jak i pojawiających się *de novo* [4, 24]. Jako koronny argument za identycznością TDF i SRY uznano zmianę determinacji płci na męską u myszy o kariotypie żeńskim, transgenicznej pod względem sekwencji Sry (mysi odpowiednik ludzkiego SRY), u której doszło do rozwoju azoospermicznych jąder [28]. Okazało się również, że sekwencja SRY obecna jest we fragmencie chromosomu Y translokowanym na jeden z chromosomów X u fenotypowych mężczyzn o kariotypie 46,XX [60]. Sekwencja SRY jest obecnie szeroko wykorzystywana do celów detekcji chromosomu Y, diagnostyki płci itd. [12, 27, 32, 44, 60, 61]. Pamiętać jednak należy, że sam proces determinacji płci daleki jest od wyjaśnienia. Wydaje się, że SRY pełni swą funkcję przede wszystkim na wstępnych etapach różnicowania jąder, rozwój zaś biologicznie funkcjonalnego organizmu męskiego wymaga działania również wielu innych genów ulokowanych na chromosomie Y, a prawdopodobnie także genów autosomalnych. Ponieważ działanie SRY jest prawdopodobnie tylko jednym ze składników genetycznej kaskady prowadzącej do determinacji płci, bezkrytyczne i absolutne poleganie na detekcji tej sekwencji jako wykładniku obecności chromosomu Y, może okazać się zbytnim uproszczeniem [39].

DIAGNOSTYKA PRENATALNA CHORÓB SPRZĘŻONYCH Z PŁCIĄ

Dotychczas opisano ponad 4 000 chorób genetycznych jednogenowych [38]. Część z nich to choroby sprzężone z chromosomem X, które z reguły występują wyłącznie u osobników męskich. Niektóre z tych chorób, np. dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD), hemofilie czy zespół Lesch-Nyhana, zostały dobrze scharakteryzowane na poziomie mutacji odpowiednich genów. W takich przypadkach możliwa jest skutecz-

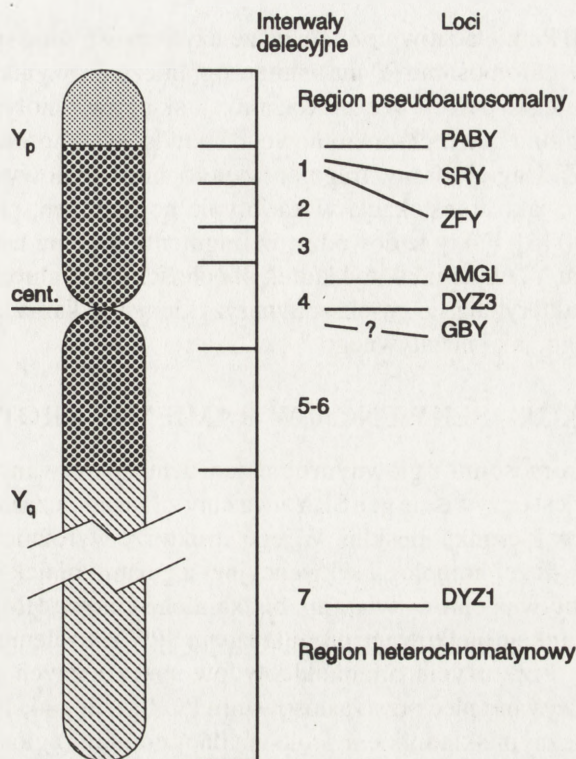
na diagnostyka prenatalna choroby przez analizę mutacji potencjalnie uszkodzonego genu, gdzie analizuje się DNA izolowane z materiału uzyskanego amniopunkcją czy biopsją trofoblastu (CVS). Ponieważ znaczna większość chorób sprzężonych z chromosomem X nie jest tak dobrze scharakteryzowana, w zakresie diagnostyki prenatalnej rodzinom ryzyka można tu oferować jedynie diagnostykę płci; prawdopodobieństwo wystąpienia choroby w przypadku płodu męskiego wynosi 50%. Analogiczna kalkulacja ryzyka stosuje się do zarodków otrzymywanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* (IVF) w rodzinach obarczonych chorobą genetyczną sprzężoną z chromosomem X. W takich przypadkach możliwe jest określenie płci poprzez analizę DNA pojedynczej komórki pobranej z rozwijającego się zarodka [19].

BADANIA MEDYCZNO-SĄDOWE

Oddzielną grupę zastosowań molekularnych metod oznaczania płci stanowi analiza materiału dowodowego dla celów medyczno-sądowych, mająca na celu wstępne ustalenie tożsamości osobników na podstawie badania pozostawionych śladów krwi, śliny, włosów, kości, zębów itd. [69]. Ponieważ niektóre z tych metod, w szczególności opracowane na podstawie PCR, mogą być używane do badania bardzo niewielkich ilości nawet znacznie zdegradowanego DNA, ich szczególna użyteczność dla tych celów staje się oczywista [8]. Wprawdzie w chwili obecnej medycyna sądowa dysponuje niezwykle czułym i precyzyjnym molekularnym narzędziem identyfikacyjnym, jakim jest tzw. *DNA fingerprinting*, polegający na analizie minisatelitów Jeffreysa czy loci VNTR (*variable number of tandem repeats*) [17, 36], jednak ustalanie płci również okazało się przydatne w nowoczesnym opracowywaniu materiału dowodowego [1, 2, 3, 11, 21, 52], pozwalając nawet na łączenie ze sobą obu tych metod (tj. *sexing* i *fingerprinting*) w ramach jednej procedury badawczej [62].

MOLEKULARNE METODY WYKRYWANIA CHROMOSOMU Y

Wszystkie molekularne metody oznaczania płci sprowadzają się do detekcji sekwencji DNA specyficznych dla chromosomu Y. W klasycznym modelu [18] chromosom Y człowieka dzielony jest pod względem cytologicznym na dwa główne regiony, w przybliżeniu mające podobne rozmiary: region heterochromatynowy zajmujący znaczną część ramienia długiego (Yq11 [qter) oraz region euchromatynowy, w skład którego wchodzi całe ramię krótkie, centromer i część ramienia długiego (Ypter [q11). DNA chromosomu Y stanowi ok. 2% całkowitej długości haploidalnego genomu człowieka i zawiera $(4-6) \times 10^7$ bp [50]. Schemat struktury chromosomu Y przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Przybliżona lokalizacja regionów i loci chromosomu Y człowieka (za Nagafuchi i wsp. [40]; zmienione); interwały delecyjne 1-7 wg Vergnaud i wsp. [63]; objaśnienia nazw loci w tekście

DETEKCJA SEKWENCJI W RAMIENIU DŁUGIM

Heterochromatyna chromosomu Y zawiera przynajmniej dwie główne rodziny sekwencji powtarzających się, wykazujących pewną specyficzność dla płci męskiej (loci DYZ1 i DYZ2) [5]. Pierwsza z nich, zawierająca charakterystyczny fragment 3,4 kb uzyskiwany po trawieniu enzymem restrykcyjnym HaeIII, stanowi główny składnik regionu heterochromatynowego. Rodzina ta została wykorzystana jako sekwencja docelowa w pierwszym prostym teście służącym do określania płci na poziomie DNA dla celów diagnostyki prenatalnej z wykorzystaniem techniki *dot hybridization* [31]. Zaletą tej metody, tak jak wszystkich tego rodzaju później opracowywanych, coraz doskonalszych procedur, był krótki czas jej wykonania (1-2 dni w porównaniu z 1-2 tygodni potrzebnych dla konwencjonalnej analizy kariotypu) oraz nieznaczna wyjściowa ilość materiału niezbędego do przeprowadzenia analizy. Analogicznie określano płeć używając strzępków kosmówki oraz preparatów genomowego DNA z komórek krwi obwodowej [30]. W chwili obecnej specyficzność locus DYZ1 wyłącznie dla płci męskiej jest poważnie kwestionowana przez niektó-

rych autorów [43]. Pamiętać również należy, że użyteczność sond specyficznych dla heterochromatyny chromosomu Y ma istotne ograniczenia wynikające z faktu, iż region ten może ulegać delecji bez zauważalnych skutków fenotypowych. Delecje różnych części regionu heterochromatynowego spotyka się u normalnych, płodnych mężczyzn [37]. Z drugiej strony fragment heterochromatynowy chromosomu Y pojawiać się może jako translokacja w kariotypie normalnych, płodnych kobiet z częstością 1 : 3000 [6]. Fakty te dowodzą, iż fragmenty regionu heterochromatynowego chromosomu Y, użyte jako wykładnik obecności tegoż chromosomu lub jego fragmentów, charakteryzują się zwiększonym ryzykiem uzyskania fałszywego wyniku tak pozytywnego, jak i negatywnego.

DETEKCJA SEKWENCJI W RAMIENIU KRÓTKIM

W tej części chromosomu Y głównym obiektem detekcji używanym w diagnostyce molekularnej płci jest oczywiście gen SRY uważany za zasadniczy czynnik inicjujący determinację płci w kierunku męskim. W jego strukturze wyróżnić można fragment konserwatywny, o dużej homologii sekwencyjnej z genami białek oddziałujących z transkrypcyjnie aktywną chromatyną (np. białka niehistonowe HMG1 i HMG2), co sugerować może funkcję białkowego produktu genu SRY jako elementu regulującego transkrypcję [56]. Przy użyciu oligonukleotydów specyficznych dla tego właśnie fragmentu diagnozowano płęć przy zastosowaniu PCR [4, 26, 44, 70].

Charakterystycznym składnikiem proksymalnej granicy regionu pseudoautosomowego w chromosomie Y (locus PABY, *pseudoautosomal border of Y*) jest insercja sekwencji Alu długości ok. 170 bp, czym różni się od homologicznego locus w chromosomie X (PABX). Detekcja tej różnicy w strukturze PABY i PABX stała się podstawą testu diagnostycznego opartego na multipleksie PCR, w którym użyto jednego oligomeru specyficznego dla regionu pseudoautosomowego (wspólnego dla Y i X) oraz dwóch różnych oligomerów specyficznych dla odcinków zlokalizowanych proksymalnie do PABY i PABX. Pozwoliło to na jednoczesną amplifikację dwóch różnych produktów, specyficznych dla chromosomu Y (dłuższy) i chromosomu X (krótszy) [10].

Niedawno sklonowano i zsekwencjonowano znajdujący się w chromosomie X gen amelogeniny (locus AMGL) oraz jego homolog w chromosomie Y (*amelogenin-like sequence*) [46]. Amplifikację sekwencji tych genów użyto jako wyznacznika obecności DNA chromosomów płciowych; istotną zaletą tej metody jest możliwość użycia tylko jednej pary oligomerów do PCR, gdyż mimo znacznego podobieństwa sekwencji obu homologów (ok. 90%) różnią się one obecnością insertu 177 bp w obrębie genu w chromosomie X. Skutkiem tego w wyniku amplifikacji DNA mężczyzny uzyskiwane są dwa oddzielne prążki (mniejszy z Y, większy z X), natomiast na matrycy DNA kobiety uzyskuje się tylko jeden prążek (pochodzący z chromosomu X) [45].

DETEKCJA SEKWENCJI REGIONU PERICENTROMEROWEGO

Aby stwierdzić obecność chromosomu Y, niektórzy autorzy używali również detekcję sekwencji wchodzących w skład regionu pericentromerowego tegoż chromosomu. Głównym jego składnikiem jest rodzina alfoidalnych sekwencji powtarzających się, zwana też sekwencjami satelitarnymi alfa. Jest to jedyna rodzina sekwencji powtarzających się w ludzkim genomie wykazująca cechy specyficzności chromosomowej [67].

Kosmid Y97, zawierający blok sekwencji powtarzających się centromeru chromosomu Y człowieka (locus DYZ3), używano jako sondę molekularną pozwalającą na detekcję fragmentu 5.5 kb, powstającego w wyniku trawienia DNA sekwencji centromerowych chromosomu Y enzymem EcoRI w technice Southerna [71]; sondę tę stosowano również w szybkim teście diagnostycznym wykorzystującym technikę *dot blot* [57]. Detekcja locus DYZ3 stała się również podstawą prostego i wiarygodnego testu wykorzystującego PCR [68], który stosowany był np. do analizy różnorodnych przypadków zaburzeń determinacji płci [61, 70] czy do analiz medyczo-sądowych [62].

Wszystkie wyżej opisane metody określania płci na poziomie molekularnym są coraz szerzej wykorzystywane do różnorodnych analiz genetycznych, medycznych czy kryminalistycznych. Zakres ich stosowalności zwiększa się w szybkim tempie. Do nowoczesnych zastosowań należy np. monitorowanie przeszczepów szpiku w układzie dawca kobieta/biorca mężczyzna czy detekcja komórek płodu we krwi kobiet ciężarnych. Bez wątpienia lista zarówno samych metod, jak i ich aplikacji wydłużać się będzie nadal.

LITERATURA

- [1] AKANE A, SEKI S, SHIONO H, NAKAMURA H, HASEGAWA M, KAGAWA M, MATSUBARA K, NAKAHORI Y, NAGAFUCHI S, NAKAGOME Y. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Sci Int* 1992; **36**: 143-148.
- [2] AKANE A, SHIONO H, MATSUBARA K, NAKAHORI Y, SEKI S, NAGAFUCHI S, YAMADA M, NAKAGOME Y. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. *Forensic Sci Int* 1991; **49**: 81-88.
- [3] BEROLDINGEN CH von, SENSABAUGH GF, BEROLDINGEN LA von, HIGUCHI R, ERLICH HA. Amplification of Y chromosome-specific sequences in biological evidence. [w] *Advances in Forensic Haemogenetics* 3, Polesky HA, Mayr WR (red.) Springer Verlag 1990:162-163.
- [4] BERTA P, HAWKINS JR, SINCLAIR AH, TAYLOR A, GRIFFITHS BL, GOODFELLOW PN, FELLOUS M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; **348**: 448-450.
- [5] COOKE H. Repeated sequences specific to human males. *Nature* 1976; **262**: 182-186.
- [6] COOKE HJ, NOEL B. Confirmation of Y/autosome translocations using recombinant DNA. *Hum Genet* 1979; **50**: 39-44.
- [7] DAVIS RM. Localisation of male determining factors in man: a thorough review of structural anomalies of the Y chromosome. *J Med Genet* 1981; **18**: 161-195.
- [8] DECORTE R, CASSIMAN J-J. Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. *J Med Genet* 1993; **30**: 625-633.

- [9] EBENSPERGER C, STUDER R, EPPLIN JT. Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man. *Hum Genet* 1989; **82**: 289–290.
- [10] ELLIS N, TAYLOR A, BENGTTSSON BO, KIDD J, ROGERS J, GOODFELLOW P. Population structure of the human pseudoautosomal boundary. *Nature* 1990; **344**: 663–665.
- [11] FATTORINI P, CACCIO S, GUSTINCICH S, WOLFE J, ALTAMURA BM, GRAZIOSI G. Sex determination and species exclusion in forensic samples with probe cY97. *Int J Leg Med* 1991; **104**: 247–250.
- [12] FECHNER PY, SMITH KD, JABS EW, MIGEON CJ, BERKOVITZ GD. Partial gonadal dysgenesis in a patient with a marker Y chromosome. *Am J Med Genet* 1992; **42**: 807–812.
- [13] FISCHER EC, BEER-ROMERO P, BROWN LG, RIDLEY A, MCNEIL JA, LAWRENCE JB, WILLARD HF, BIEBER FR, PAGE DC. Homologous ribosomal-protein genes on the human X-chromosome and Y-chromosome escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 1990; **63**: 1205–1218.
- [14] FOOTE S, VOLLRATH D, HILTON A, PAGE DC. The human Y chromosome: overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science* 1992; **258**: 60–66.
- [15] GEMMILL RM, PEARCE-BIRGE L, BIXENMAN H, HECHT BK, ALLANSON JE. Y chromosome-specific DNA sequences in Turner syndrome mosaicism. *Am J Hum Genet* 1987; **41**: 157–167.
- [16] GERMAN J. Abnormalities of human sex chromosomes. A unifying concept of relation to the gonadal dysgeneses. *Clin Genet* 1970; **1**: 15–27.
- [17] GILL P, JEFFREYS AJ, WERRETT DJ. Forensic application of DNA „fingerprints“. *Nature* 1985; **318**: 577–579.
- [18] GOODFELLOW P, DARLING S, WOLFE J. The human Y chromosome. *J Med Genet* 1985; **22**: 329–344.
- [19] HANDYSIDE AH, KONTOGIANNI EH, HARDY K, WINSTON RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; **344**: 768–770.
- [20] HAWKINS JR. Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mut* 1993; **2**: 347–350.
- [21] HE Z-N, JIANG X-H, LUS-H, WANG G-L, ZHU Y-W, WANG S-W, SHEN Y, GAO Q-S, LIU J-Z, WU G-Y. A study of sex identification of trace, dried bloodstains using a Y-chromosome-specific deoxyribonucleic acid (DNA) probe. *J Forensic Sci* 1989; **34**: 346–351.
- [22] JACOBS PA, ROSS A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 1966; **210**: 352–354.
- [23] JACOBS PA, BETTS PR, COCKWELL AE, CROLLA, M, MACKENZIE MJ, ROBINSON DO, YOUINGS SA. A cytogenetic and molecular reappraisal of a series of patients with Turner's syndrome. *Ann Hum Genet* 1990; **54**: 209–223.
- [24] JÄGER RJ, ANVRET M, HALL K, SCHERER G. A human XY female with frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990a; **348**: 452–454.
- [25] JÄGER RJ, EBENSPERGER C, FRACCARO M, SCHERER G. A ZFY-negative 46,XX true hermaphrodite is positive for the Y pseudoautosomal boundary. *Hum Genet* 1990b; **85**: 666–668.
- [26] JÄGER RJ, HARLEY VR, PFEIFFER RA, GOODFELLOW PN, SCHERER G. A familial mutation in the testis-determining gene SRY shared by both sexes. *Hum Genet* 1992; **90**: 350–355.
- [27] KOCOVA M, SIEGEL SF, WENGER SL, LEE PA, TRUCCO M. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet* 1993; **342**: 140–143.
- [28] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, GOODFELLOW P, LOVELL-BADGE R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; **351**: 117–121.
- [29] KOTECKI M, JARUZELSKA J, SKOWROŃSKA M, FICHNA P. Deletion mapping of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Genet* 1991; **87**: 234–236.
- [30] LAU Y-F. Organization of the human Y-specific Hae III 3.4 kb repeat sequence and their application in clinical diagnosis. [w] The Y chromosome, Part A: Basic characteristics of the Y chromosome. Sandberg AA (red.); Allan R. Liss, Inc., New York 1985: 177–192.
- [31] LAU Y-F, DOZY AM, HUANG JC, KAN YW. A rapid screening test for antenatal sex determination. *Lancet* 1984; **1**: 14–16.
- [32] LINDGREN V, CHEN C, BRYKE CR, LICHTER P, PAGE DC, YANG-FENG TL. Cytogenetic and molecular characterization of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. *Hum Genet* 1992; **88**: 393–398.
- [33] MACKAY AM, PETTIGREW N, SYMINGTON T, NEVILLE AM. Tumors of dysgenetic gonads (gonadoblastoma): ultrastructural and steroidogenic aspects. *Cancer* 1974; **34**: 1108–1125.
- [34] MAGENIS RE, BREG WR, CLARK KA. Distribution of sex chromosome complements in 651 patients with Turner's syndrome. *Am J Hum Genet* 1980; **32**: 79A.
- [35] MANUEL M, KATAYAMA KP, JONES HW. The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y chromosome. *Am J Obstet Gynecol* 1976; **124**: 293–300.
- [36] MARX JL. DNA fingerprinting takes the witness stand. *Science* 1988; **240**: 1616–1618.

- [37] McKAY RDG, BOBROW M, COOKE HJ. The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotypic polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 1987; **21**: 19–32.
- [38] McKUSICK VA. Mendelian Inheritance in Man, 8th ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore 1988.
- [39] MITTWOCH U. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum Genet* 1992; **89**: 467–479.
- [40] NAGAFUCHI S, SEKI S, NAKAHORI Y, TAMURA T, NUMABE H, NAKAGOME Y. PCR detection of structurally abnormal Y chromosomes. *Jpn J Hum Genet* 1992a; **37**: 187–193.
- [41] NAGAFUCHI S, TAMURA T, NAKAHORI Y, TAKANO K, NISHI Y, IWATANI N, KITAO M, HORI Y, KONDA S, HASEGAWA T, NUMABE H, FUJIEDA K, TANAKA T, HIBI I, NAKAGOME Y. The majority of the marker chromosomes in Japanese patients with stigmata of Turner syndrome are derived from Y chromosomes. *Hum Genet* 1992b; **89**: 590–592.
- [42] NAGEL T, CAMARGO M, TAGATZ G, OKAGAKI T, CERVENKA J, CAHILL L, WACHTEL SS, KING R, TWIGGS LB. Gonadal tumors in patients with gonadal dysgenesis and sex chromosome rings and fragments. *Am J Obstet Gynecol* 1984; **150**: 76–82.
- [43] NAKAGOME Y, NAGAFUCHI S, SEKI S, NAKAHORI Y, TAMURA T, YAMADA M, IWAYA M. A repeating unit of the DYZ1 family on the human Y chromosome consists of segments with partial male-specificity. *Cytogenet Cell Genet* 1991a; **56**: 74–77.
- [44] NAKAGOME Y, SEKI S, FUKUTANI K, NAGAFUCHI S, NAKAHORI Y, TAMURA T. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Med Genet* 1991b; **41**: 112–114.
- [45] NAKAHORI Y, HAMANO K, IWAYA M, NAKAGOME Y. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am J Med Genet* 1991a; **39**: 472–473.
- [46] NAKAHORI Y, TAKENAKA O, NAKAGOME Y. A human X-Y homologous region encodes amelogenin. *Genomics* 1991a; **9**: 264–269.
- [47] PAGE DC. Hypothesis: a Y-chromosomal gene causes gonadoblastoma in dysgenetic gonads. *Development (Suppl.)* 1987; **101**: 151–155.
- [48] PAGE DC, MOSHER R, SIMPSON EM, FISHER EMC, MARDON G, POLLACK J, MCGILLIVRAY B, CHAPELLE A DE LA, BROWN LG. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987; **51**: 1091–1104.
- [49] PALMER MS, SINCLAIR AH, BERTA P, ELLIS NA, GOODFELLOW PN, ABBAS NE, FELLOUS M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 1989; **342**: 937–939.
- [50] Paris Conference 1971: Standardization in human cytogenetics. *Birth Defects* 1971; **8**: 7.
- [51] PARK E, BAILEY JD, COWELL CA. Growth and maturation of patients with Turner's syndrome. *Pediatr Res* 1983; **17**: 1–7.
- [52] PASCAL O, AUBERT D, GILBERT E, MOISAN JP. Sexing of forensic samples using PCR. *Int J Leg Med* 1991; **104**: 205–207.
- [53] PETROVIC V, NASIOULAS S, CHOW CW, VOULLAIRE L, SCHMIDT M, DAHL H. Minute Y chromosome derived marker in a child with gonadoblastoma: cytogenetic and DNA studies. *J Med Genet* 1992; **29**: 542–546.
- [54] SASI R, FAN Y-S, LIN CC. Prenatal sexing and detection of ZFY gene sequences in sex chromosome disorders by polymerase chain reaction. *J Clin Lab Anal* 1991; **5**: 193–196.
- [55] SIMPSON JL, CHRISTAKOS AC, HORWITH M, SILVERMAN FS. Gonadal dysgenesis in individuals with apparently normal chromosomal complements. *Birth Defects* 1971; **7**: 215–228.
- [56] SINCLAIR AH, BERTA P, PALMER MS, HAWKINS JR, GRIFFITHS BL, SMITH MJ, FOSTER JW, FIRSCHAU F-A, LOVELL-BADGER R, GOODFELLOW PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; **346**: 240–244.
- [57] STALVEY JRD, ERICKSON RP. An improved method for detecting Y chromosomal DNA. *Hum Genet* 1987; **76**: 240–243.
- [58] TALERMAN A. Germ cell tumors of the ovary. [w] Pathology of the Female Genital Tract. Blaustein A. (red.) Springer Verlag, New York 1982: 602–664.
- [59] TIEPOLO L, ZUFFARDI O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; **34**: 119–124.
- [60] Van der AUWERA B, Van ROY N, De PAEPE A, HAWKINS JR, LIEBAERS I, CASTEDO S, DUMON J, SPELEMAN F. Molecular cytogenetic analysis of XX males using Y-specific DNA sequences, including SRY. *Hum Genet* 1992; **89**: 23–28.
- [61] Van DYKE DL, WIKTOR A, PALMERC G, MILLER DA, WITTM, BABU VR, WORSHAM MJ, ROBERSON JR, WEISS L. Ullrich-Turner syndrome with a small ring X chromosome and presence of mental retardation. *Am J Med Genet* 1992; **43**: 996–1005.

- [62] VERBOVAYA LV, IVANOV PL. „Sexing” deoxyribonucleic acid (DNA) on DNA fingerprint gel: an internal control for DNA fingerprint evidence. *J Forensic Sci* 1991; **36**: 991–998.
- [63] VERGNAUD G, PAGE DC, SIMMLER M-C, BROWN L, ROUYER F, NOEL B, BOTSTEIN D, CHAPELLE A DE LA, WEISSENBACH J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 109–124.
- [64] VERP MS, SIMPSON JL. Abnormal sexual differentiation and neoplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; **25**: 191–218.
- [65] VOLLRATH D, FOOTES, HILTON A., BROWN LG, BEER-ROMERO P, BOGAN JS, PAGE DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; **258**: 52–59.
- [66] WATANABE M, ZINN AR, PAGE DC, NISHIMOTO T. Functional equivalence of human X- and Y-encoded isoforms of ribosomal protein S4 consistent with a role in Turner syndrome. *Nature Genet* 1993; **3**: 268–271.
- [67] WILLARD HF, WAYE JS. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet* 1987; **3**: 192–198.
- [68] WITT M, ERICKSON RP. A rapid method of detection of Y chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 1989; **82**: 271–274.
- [69] WITT M, ERICKSON RP. Determination of sex of origin of blood and bloodstains using recombinant DNA techniques. [w] DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science, Advances in Forensic Science, Vol.3. Gaensslen RE, Lee HC (red.) Year Book Medical Publ., Inc., Chicago 1990: 98–113.
- [70] 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.
- [71] WOLFE J, DARLING SM, ERICKSON RP, CRAIG IW, BUCKLE VJ, RIGBY PWJ, WILLARD HF, GOODFELLOW PN. Isolation and characterization of an aliphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1985; **182**: 477–485.

Otrzymano: 17.01.1994 r.

Przyjęto: 18.03.1994 r.

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

MATRIKS JĄDROWA. II. SKŁAD BIAŁKOWY; SPECYFICZNOŚĆ BIAŁEK MATRIKS JĄDROWEJ

NUCLEAR MATRIX. II. PROTEIN COMPOSITION; THE SPECIFICITY OF NUCLEAR MATRIX PROTEINS

Piotr SZYMCZYK, Zofia KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. Artykuł jest przeglądem danych dotyczących składu białkowego trzech podstruktur matriks jądrowej, tj. warstwy peryferycznej, resztkowych jąderek oraz sieci włóknisto-ziarnistej. Przedstawiono w nim również aktualne poglądy na temat specyficzności białek, głównych składników tej ważnej struktury jądrowej.

Summary. This article summarizes the data on protein composition of three nuclear matrix substructures i.e. peripheral matrix, residual nucleoli and internal matrix. It presents also view on specificity of proteins, main components of this important nuclear structure.

Wykaz stosowanych skrótów: A, Ala – alanina; C, Cys – cysteina; cisDDP – cis-diaminodichloroplatyna; ConA – konkanawalina A; D, Asp – kwas asparaginowy; E, Glu – kwas glutaminowy; F, Phe – fenyloalanina; G, Gly – glicyna; GlcNAc – N-acetyloglukozoamina; H, His – histydyna; I, Ile – izoleucyna; K, Lys – lizyna; M, Met – metionina; N, Asn – asparagina; PHA – fitohemaglutynina; P, Pro – prolina; Q, Gln – glutamina; R, Arg – arginina; S, Ser – seryna; T, Thr – treonina; Y, Tyr – tyrozyna; V, Val – walina.

1. WSTĘP

Głównymi składnikami matriks jądrowej* są białka inne niż histony [22, 44, 78, 81, 105, 158]. Ostają się one w tej strukturze jądra komórkowego po ekstrakcji solami, detergentami oraz trawieniu nukleazami, a zatem należą do grupy makrocząsteczek o wyjątkowo niskiej rozpuszczalności. Stanowi to główną przyczynę, że poza nielicznymi przypadkami pozostają wciąż słabo scharakteryzowane. Zastosowanie do ana-

*W pracy terminy: matriks jądrowa i szkielet jądrowy są jako równocenne używane zamiennie.

lizej białek szkieletu jądrowego wysokorozdzielczej elektroforezy dwuwymiarowej ujawniło ich znaczną niejednorodność [43, 53, 144] i obecność ponad 200 składników, np. w nowotworach piersi [42]. Wśród różnorodnych białek tej struktury jądrowej wyróżnia się grupę, która wydaje się być względnie stałym elementem wspólnym dla różnych typów komórek. Dla niej właśnie Stuurman i wsp. [144] zaproponowali nazwę – białka „podstawowe” matriks (ang. *minimal matrix protein*). To wyróżnienie wydaje się mieć głównie funkcjonalny charakter i włącza do wspomnianej grupy wspólne wszystkim komórkom białka enzymatyczne, strukturalne i regulatorowe obecne w szkielecie jądrowym.

Część białek matriks charakteryzuje daleko posunięta specyficzność molekularna i ta właściwość może warunkować odmienną organizację kompleksu chromatynowego i regulację ekspresji genów [52, 72, 121, 122, 127]. Badania kilku laboratoriów [43, 53, 80, 83, 117, 144, 171] zogniskowały uwagę na porównaniach białek szkieletu jąder komórek nowotworowych z ich odpowiednikami prawidłowymi, odkrywając szereg składników nowotworowo-specyficznych. Zaskakujące obserwacje grupy, kierowanej przez Lidgarda z Matritech Inc. z Cambridge, Massachusetts, wskazują, że śmierci komórek nowotworowych w hodowlach towarzyszy uwalnianie do środowiska białek matriks jądrowej [103], które można zidentyfikować odpowiednimi przeciwciałami.

Dysponując przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko określonym białkom matriks jąder komórek nowotworowych udało się uzyskać pierwsze rezultaty świadczące, że procesowi nowotworzenia (m.in. nowotworom piersi, płuc, jajników) towarzyszy uwalnianie białek szkieletu jądrowego do krwi. Te dane pozwalają żywić nadzieję na w miarę szybką możliwość diagnozowania procesu nowotworowego za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko białkom szkieletu jądrowego. Należy podkreślić fakt, że na kontynuację badań w tym kierunku Lidgard ze swoją grupą w 1993 r. otrzymali niebagatelną sumę – ponad jednego miliarda dolarów [149].

2. BIAŁKA WARSTWY PERYFERYCZNEJ

Warstwę peryferyczną-matriks jądrowej, zwaną również resztkową otoczką jądrową, buduje blaszka wraz z kompleksem porów otoczki jądrowej o m.cz. ok. 125 MDa [46, 64, 69]. Blaszka stanowi włóknistą warstwę o grubości 20–200 nm, rozpościerającą się pomiędzy peryferyczną chromatyną a wewnętrzną błoną otoczki jądrowej. Uważa się, że białka tworzące tę strukturę – laminy – odgrywają istotną rolę w rozpadzie i odbudowie otoczki jądrowej po mitozie, w reorganizacji kompleksu chromatynowego podczas interfazy i utrzymaniu prawidłowej architektury jądra komórkowego, a także w „zakotwiczeniu” filamentów pośrednich do jego warstwy peryferycznej [8, 10, 39, 45, 51, 90, 108, 120].

Budujące laminę polipeptydy zaliczane są do rodziny filamentów pośrednich typu V [141] o masie cząsteczkowej (m.cz.) w przedziale 60–80 kDa [158; por. tab. 1A]. U ssaków wyróżnia się dwa główne typy lamin, tj. A i B [67–69, 87].

Do pierwszego typu – A zalicza się laminy A i C ssaków oraz odpowiadającą im laminę A kurczęcia oraz żaby *Xenopus laevis*. Badania immunologiczne oraz analiza map tryptycznych potwierdzają duże podobieństwo laminy A i C [51]. Prace dotyczące sekwencjonowania cDNA kodujących laminę A i C ujawniły identyczność sekwencji, z wyjątkiem dodatkowego odcinka kodującego 133 aminokwasy w C-końcowym fragmencie łańcucha laminy A (por. [81]). Okazuje się, że w komórkach zarodkowych nie obserwuje się ekspresji genów kodujących białka tego typu [91, 143].

Drugi typ lamin – B reprezentują dwa podtypy: B_I – do którego zaklasyfikowano laminę B_I ssaków i kurczęcia, a także laminę L_I *X. laevis* oraz typ B₂ – z laminą B₂ ssaków i kurczęcia, a także L_{II} *X. laevis*. Białka tego typu są wykrywane w komórkach zarówno dojrzałych, jak i zarodkowych [9, 67, 68]. W przypadku żaby *X. laevis* opisano cztery typy lamin (I–IV) obecne w oocytach i komórkach somatycznych. Białko L_I o m.cz. kDa/pI – 70/5,35 i lamina L_{II} – 68/6,02–6,35 budują blaszkę jądrową komórek somatycznych oraz spermatogonii. Z kolei białko L_{III} – 68/6,04–6,60 jest jedyną laminą oocytów tego zwierzęcia w fazie diplotenu, wykrywaną również w neuronach i komórkach mięśniowych. Natomiast polipeptyd L_{IV} o m.cz. 75 kDa ulega biosyntezie w późniejszych etapach spermatogenezy *X. laevis*, tj. w spermatydach i plemnikach [9].

Jak dotąd, poznano sekwencję lamin wielu gatunków i uchwycono w ich strukturze pierwszorzędowej pewne prawidłowości [67, 87]. Okazało się, że białka te charakteryzuje obecność rozległej wewnętrznej domeny α -helikalnej oraz krótkiego i długiego, niehelikalnego fragmentu odpowiednio w N- i C-końcu łańcucha polipeptydowego. Długość C-końcowego, niehelikalnego odcinka zmienia się w obrębie lamin różnego pochodzenia, np. w białkach L_{II} i L_{III} *X. laevis* i w laminie B kurcząt osiąga ok. 195 aminokwasów, w laminach zaś typu A *X. laevis* i ssaków – ok. 275 [87]. We wszystkich laminach występuje na początku fragmentu C-końcowego sekwencja lokalizująca je w jądrze komórkowym (ang. *nuclear localization signal*; NLS). W przypadku laminy L_I oocytów *X. laevis* stanowi ją następujący motyw sekwencyjny: ⁴¹⁴Lys-Arg-Lys-Arg-Ile-Asp⁴¹⁹. W jego obecności 50–60% wprowadzonego do cytoplazmy białka L_I przemieszcza się do jądra komórkowego. Mutacja początkowego fragmentu heksapeptydu, dotycząca dwóch aminokwasów: ⁴¹⁴Lys-Thr-Thr-Arg-Ile-Asp⁴¹⁹ uniemożliwia dojadrowy transport tego białka.

Inną, konserwatywną sekwencję w C-końcowym fragmencie łańcucha wszystkich lamin, z wyjątkiem laminy C, reprezentuje tetrapeptyd: ⁵⁸⁰Cys-Ala-Ile-Met⁵⁸³. Zapewnia on asocjację z blaszką jądrową aż 95% wprowadzonych do cytoplazmy lamin L_I, A i B [87, 88]. Mutacja tylko jednego aminokwasu w obrębie wspomnianego motywu sekwencyjnego, zamieniająca cysteinę w pozycji 580. na hydroksyamino-kwas – serynę, obniża znacznie (do ok. 13,5%) współczynnik asocjacji białka L_I.

Natomiast analogiczna zamiana aminokwasów, ale w innym regionie C-końcowym cząsteczki laminy A, tj. $^{662}\text{Cys-Ser-Ile-Met}^{665}$ na $^{662}\text{Ser-Ser-Ile-Met}^{665}$ powoduje mniejszy spadek zawartości tego białka w blaszce jądrowej, niż to ma miejsce w przypadku laminy C. Nadal stwierdza się w tej strukturze ok. 40,4% wprowadzonej do cytoplazmy laminy A, co wynika zapewne z obecności dodatkowych reszt cysteinowych w C-końcowym fragmencie łańcucha. W tworzeniu struktury blaszki równie istotne są domeny α -helikalne budujących ją białek. Utrata fragmentu łańcucha L₁ o tej strukturze, między 373.–389. resztą aminokwasową sprawia, że wykrywa się w blaszce tylko ok. 64% białka, wprowadzonego do cytoplazmy techniką mikroiniekcji.

Okazało się, że C-końcowa reszta cysteiny w tetrapeptydzie: Cys-a-a-X laminy B₂, (a – aminokwas alifatyczny, X – aminokwas dowolny) warunkuje asocjację z lipidami błony jądrowej i blaszką jądrową, co wynika prawdopodobnie z posttranslacyjnej modyfikacji tej reszty przez pochodne izoprenu [164]. Proces ten, zwany izoprenylacją, specyficznie hamuje inhibitor biosyntezy izoprenu – mewinolin. Przemiany posttranslacyjne laminy B₂ mogą objąć również degradację trzech ostatnich reszt aminokwasowych (aaX) z następczą estryfikacją uwolnionej grupy karboksylowej cysteiny przez resztę metylową [86]. Ta ostatnia modyfikacja wpływa zapewne na funkcje strukturalne białek blaszki, gdyż poziom metylacji laminy B zmienia się wyraźnie w cyklu komórkowym. W mitozie następuje ubytek 0,4–0,6 mola grup CH₃/mol laminy B, czemu towarzyszy przesunięcie punktu izoelektrycznego w kierunku kwaśnym, wywołane zapewne pojawieniem się wolnych grup karboksylowych [20].

Opisane wcześniej przemiany zachodzą w określonych domenach jądra komórkowego i są prawdopodobnie czynnikami ograniczającymi szybkość odbudowy blaszki jądrowej *in vitro*. Do wytworzenia odpowiedniej ilości zmodyfikowanych posttranslacyjnie lamin niezbędnych dla odbudowy blaszki jądrowej potrzeba kilku godzin, mimo że dojądrowy transport tych białek zachodzi w ciągu kilku minut. Domeny te formują się szybko z laminy A wędrującej z cytoplazmy do jądra komórkowego, a ich powolnemu zanikowi towarzyszy wzrost blaszki jądrowej [55].

W blaszce jądrowej wątroby szczura laminy asocjują z integralnymi białkami wewnętrznej błony otoczki jądrowej o m. cz.: 55, 68 i 75 kDa [136]. Wnikliwe badania ujawniły w otoczce jądrowej erytrocytów ptasich obecność receptorów laminy B o m. cz. 54 [5] i 58 kDa [165].

W cyklu komórkowym blaszka i otoczka jądrowa podlegają odwracalnym procesom rozpadu i odbudowy [10, 114, 153]. Sądzi się, że główną rolę w tych przemianach odgrywa zróżnicowany poziom fosforylacji lamin. U ssaków ma miejsce zjawisko mitotycznej hiperfosforylacji tych białek osiągające wartość 1,4–2,2 mole P/mol lamin. Poziom ten przewyższa 4–7 razy wartość typową dla tych białek w jądrze interfazowym, tj. 0,27–0,46 mola P/mol lamin [114].

U *Drosophila melanogaster* nie obserwuje się tak wyraźnych zmian poziomu fosforylacji białek blaszki. Wynika to z odrębności występujących w tym organizmie

lamin. Wykryto bowiem izoformy białka specyficzne dla interfazy – Dm₁ (m. cz. 74 kDa) i Dm₂ (m. cz. 76 kDa) oraz pojawiającą się podczas mitozy i oogenezy – Dm_{mit} (m. cz. 75 kDa). Dane autoradiograficzne i ocena zawartości lamin za pomocą techniki *Western-blot* wskazują, że ilość fosforu w laminie Dm_{mit} stanowi wartość pośrednią między Dm₁ a Dm₂ – odpowiednio ok. 2,5 i 3,0 mole P/mol lamin. W produktach ich hydrolizy stwierdzono fosfoserynę w izoformie Dm_{mit}, w Dm₁ i Dm₂ zaś obok wspomnianego ufosforylowanego hydroksyaminokwasu również fosfotreoninę [139]. Białka te wykazują odmienne właściwości fizykochemiczne. Isoformy Dm₁ i Dm₂ polimeryzują tworząc wiązki w roztworach o fizjologicznej sile jonowej, lamina Dm_{mit} zaś pozostaje wtedy w formie rozpuszczalnej [92].

Dotychczas poznano szereg kinaz, dla których fizjologicznym substratem są białka blaszki. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że lamina B₂ kurczenia ulega fosforylacji przez kinazę p34^{cdc2} [96]. Analiza map tryptycznych fosfopeptydów uzyskanych po działaniu wspomnianej kinazy potwierdziła, że enzym ten wprowadza reszty fosforanowe do łańcucha laminy B₂. Wykryto jednak kilka fosfopeptydów, których pojawianie się nie mogło wynikać z aktywności p34^{cdc2}, co sugeruje udział jeszcze innych kinaz. Enzym ten generuje *in vitro* jedną z dwóch mitotycznych postaci laminy B₂ o m. cz. 70 kDa i 6–7-krotnie niższej zawartości fosforu niż izoforma białka o m. cz. 72 kDa.

Przykładem innej kinazy, która modyfikuje laminy, jest kinaza C. Jej substratami okazały się m.in. lamina B keratynocytów myszy (linia BALB/MK-2) i lamina B₂ komórek białaczkowych HL-60 człowieka [65, 77]. W przypadku tej ostatniej określono miejsca tej modyfikacji poprzez zsekwencjonowanie fosfopeptydów tryptycznych; są nimi reszty seryny w pozycjach 395. i 405.

Obszerne doświadczenia nad fosforylacją laminy typu A myszy wskazują na możliwość skoordynowanego działania obydwu tych kinaz [37]. Już wcześniej przypuszczano [65], że kinaza C wprowadzając resztę fosforanową na ³⁹⁵Ser i ⁴⁰⁵Ser umożliwia aktywność mitotycznej kinazy p34^{cdc2}, fosforylującej resztę ³⁹²Ser laminy B₂ komórek HL-60. Jednak dopiero ostatnio wykazano, że kinaza C modyfikuje laminę typu A myszy w czasie całego cyklu komórkowego, bez wyraźnego mitotycznego wzrostu poziomu fosforylacji reszt aminokwasowych, uznanych dla niej za specyficzne, tj. ⁵Ser, ⁴¹⁶Thr, ⁴⁸⁰Thr i ⁵²⁵Ser. Okazało się, że ⁵²⁵Ser jest modyfikowana preferencyjnie w interfazie. Wydaje się, że zjawisko fosforylacji Ser w pozycji 392., specyficznie rozpoznawanej przez kinazę p34^{cdc2}, jest bardziej skomplikowane, niż sądzono do tej pory. Modyfikacja tego aminokwasu nie ogranicza się do mitozy, lecz ma miejsce również w interfazie. Nie kwestionuje to udziału kinazy p34^{cdc2} w procesie mitotycznego rozpadu blaszki jądrowej, ale pozwala sądzić, że w pozycji ³⁹²Ser działa kompleks: p34^{cdc2}-cyklina o zmiennej aktywności w różnych fazach cyklu komórkowego [37].

Zprzedstawionych badań wynika, że niehelikalne fragmenty N- i C-końcowe lamin stanowią główne miejsce działania kinaz. Te właśnie odcinki warunkują tworzenie

trimerów (m. cz. 200 kDa) i tetramerów (m. cz. 270 kDa) lamin. Wprowadzenie reszt fosforanowych powoduje rozpad wspomnianych wysokocząsteczkowych agregatów. Z kolei wpływ fosforylacji na wewnętrzne, α -helikalne domeny białek blaszki jest niewielki. Nie narusza ona hydrofobowych, stabilizowanych wiązaniami dwusiarczkowymi oddziaływań między tymi domenami, które utrzymują dimery lamin (m. cz. 138 kDa) [30].

Z badań Bailera i wsp. [5] wynika, że kinaza $p34^{cdc2}$ modyfikuje *in vitro* także receptor laminy B – integralne białko wewnętrznej błony otoczki jądrowej kurczęcia o m. cz. 54 kDa (p54).

In vitro fosforylacja lamin przyczynia się do uwalniania tych białek w formie rozpuszczalnej z blaszki jądrowej [65, 96, 114]. Jest to proces szybki, gdyż ubytek (ok. 10%) lamin ma miejsce już po 5 minutach działania kinazy C, inkubacja blaszki jądrowej zaś z tym enzymem przez 2 godziny powoduje utratę ok. 70% lamin [65].

In vivo obserwuje się wyraźne różnice w zachowaniu się uwolnionych lamin typu A oraz B. W profazie mitozy laminy A i C rozpraszają się w cytozolu, lamina B zaś wiąże się z pęcherzykami powstałymi po rozpadzie interfazowych błon jądrowych [51, 88].

Warunkiem wstępnym odbudowy blaszki jądrowej jest defosforylacja lamin [13, 54, 55], po której następuje kilka etapów obecnie dobrze poznanych na przykładzie oocytów *X. laevis*. Obserwacje ułatwia obecność w tych komórkach tylko jednej laminy, tj. L_{III}, która ponadto nie wiąże się samoistnie z powierzchnią chromosomów ani z pęcherzykami błon jądrowych. Newport i wsp. [108] przedstawili model odbudowy otoczki jądrowej, który zakłada następujące etapy:

1^o łączenie się pęcherzyków przez interakcję nielaminowych receptorów błonowych z białkami chromatynowymi,

2^o zlewanie się pęcherzyków i odtworzenie błon jądrowych,

3^o dojądrowy transport L_{III} i jej „organizację” na wewnętrznej błonie jądrowej. Zakłócenia tego procesu wywołane, np. związaniem laminy L_{III} za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko temu białku, nie hamują wprawdzie odbudowy otoczki jądrowej, lecz prowadzą do uformowania bardziej delikatnej struktury, która nie chroni chromatyny przed „pęcznieniem” w roztworach o niskiej sile jonowej [108, 164].

Utworzenie w pełni funkcjonalnej otoczki jądrowej wymaga powstania spolimeryzowanej warstwy blaszki, utworzonej przez laminę L_{III} w sąsiedztwie wewnętrznej błony otoczki jądrowej. Jej obecność wydaje się być nieodzowna dla prawidłowego przebiegu biosyntezy DNA [100, 108]. Uważa się, że lamina albo jest bezpośrednim miejscem powstawania kompleksów replikacyjnych, albo może sprawować funkcje regulacyjne, np. w dekondensacji DNA lub w formowaniu połączeń z siecią włókniasto-ziarnistą matriks jądrowej, z którą wielu badaczy ostatnio wiąże replikację materiału genetycznego [66, 72, 155].

Część lamin zachowuje się podczas mitozy w sposób analogiczny do otoczki jądrowej. Wykrywa się ją testem immunofluorescencyjnym w komórkach zarodkowych *Drosophila melanogaster*, poddanych działaniu taksolu. W jej skład, poza laminami, wchodzi białko wewnętrznej błony otoczki jądrowej – otefina o m. cz. 53 kDa [61]. Zsekwencjonowanie cDNA otefiny i rozszyfrowanie jej struktury pierwszorzędowej ujawniło hydrofobową domenę w C-końcowej części łańcucha, zapewne ułatwiającą asocjację tego białka z błoną otoczki jądrowej [115].

Wydaje się, że niewielka część lamin A i C w komórkach CHO wiąże się z powierzchnią chromosomów w toku całej mitozy [13]. Z białkami tymi asocjuje z kolei wrażliwy na trypsynę receptor białkowy, obecny na powierzchni pęcherzyków jądrowych. Trawienie trypsyną rozkłada białko receptorowe i uniemożliwia asocjację pęcherzyków z powierzchnią chromosomów [163]. Wspomniany powyżej fakt asocjacji lamin z powierzchnią chromosomów znalazł potwierdzenie w eksperymentach, którymi wykazano zdolność lamin do asocjacji z DNA oraz polinukleosomami [95, 170]. Lamina A indyka wiąże specyficznie białkowy składnik polinukleosomów. Na podstawie zmian masy cząsteczkowej polinukleosomów określonej w toku elektroforezy w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS, a także 10-krotnie wyższej ich wrażliwości na trawienie trypsyną w porównaniu z chymotrypsyną sądzi się, że jest nim histon H1 [170]. Ostatnio wykazano, że laminy B₁, B₂ i agregaty lamin A i C wątroby szczura wiążą się specyficznie z sekwencjami DNA, określanymi jako MAR (ang. *Matrix Attached Region*) [95]. Uważa się, że odcinki MAR reprezentują miejsca przyłączenia superheliksowych pętli DNA o średniej długości ok. 50 000 pz do białkowego szkieletu jądrowego [12, 72, 107, 125, 160].

W skład kompleksów porów otoczki jądrowej kręgowców, zaliczanych do warstwy peryferycznej matriks jądrowej, wchodzi: transmembranowe białko gp210 [46, 166] i rodzina peryferycznych glikoprotein – nukleoporyn, których m. cz. waha się od 45 do 270 kDa [27, 116; por. tab. 1A].

W przypadku nukleoporyn modyfikowanych O-glikozydowo, składnik cukrowy stanowi głównie N-acetyloglukozoamina (GlcNAc) rozpoznawana przez lektynę WGA (ang. *Wheat Germ Agglutinin*) z kielków pszenicy. Trawienie β -N-acetyloglukozaminidazą, atakującą cukry przyłączone O-glikozydowo, usuwa reszty GlcNAc i uniemożliwia wiązanie ze wspomnianą lektyną [26, 140].

Jak dotąd najlepiej poznano własności białka gp62 opisywanego również symbolem gp68 [10, 26, 27]. Jest ono syntetyzowane w formie prekursora o m. cz. 59 kDa, którego m. cz. osiąga 62 kDa, po modyfikacji za pomocą 8–10 reszt GlcNAc [140]. Okazało się, że polipeptyd ten łączy się z innymi białkami, tj. gp60 i gp54 w stosunku 1:1:2, tworząc kompleks o m. cz. 231 kDa, stabilny nawet po 1000-krotnym oczyszczeniu [85]. W cząsteczce gp62 poznano miejsca glikozylacji, różniące się po winowactwem do enzymu prowadzącego ten proces, tj. N-acetyloglukozoaminotransferazy UDP:białko. Fragment gp62 między 248. a 341. aminokwasem wiąże się z enzymem silniej niż odcinki cząsteczki obejmujące regiony między resztami:

TABELA 1. Białka wykryte w matriks jądrowej

Białko (materiał, w którym zostało wykryte)	M.cz. [kDa] (ew. pl)	Najważniejsze dane bibliograficzne	Funkcja
A. WARSTWA PERYFERYCZNA			
Błaszka			
Lamina	A	69	Utrzymywanie struktury blaszki, przyłączanie blaszki do błon jądrowych, organizacja chromatyny
(wątroba szczura)	B	67	
(komórki HeLa)	C	62	
Kompleksy porów otoczki jądrowej			
Glikoproteina transmembranowa			
gp210 (wątroba szczura, <i>X. laevis</i>)	190/210	[45, 166]	Transport jądrowo-cytoplazmatyczny
Nukleoporyny:			
gp62/gp68 (wątroba szczura, komórki PtK ₂)	62/68	[10, 14, 26, 27, 140]	Przyłączanie kompleksu porowego do otoczki jądrowej
gp74/gp76 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	74/76	[45]	Transport jądrowo-cytoplazmatyczny. jw.
NSP1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	86	[12, 14, 70, 106]	
NUP1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	130	[28]	jw.
Nukleoporyno-podobne białko p100 (marchew)	100	[132]	jw.
NUP49; NUP100; NUP116 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	49; 100; 116	[161]	jw.
gp153 (wątroba szczura)	153	[145]	Organizacja chromatyny
kinaza fosfatydylo-4-fosforanu (fibroblasty myszy, wątroba szczura)		[118]	Udział w szlaku fosfatydyloinozytolowym
B. MATRIKS JĄDERKOWA			
p145 (<i>X. laevis</i>)	145/6,15	[47]	Białko strukturalne
Fibrylaryna (erytrocyty kury, komórki HeLa)	34(38)/8,5	[3, 4, 23, 73, 94, 112]	Składanie pre rRNA
Izoforma topoizomerazy II (komórki HeLa)	150/180	[174]	Organizacja chromatyny jąderkowej, składnik strukturalny
Fosfoproteina C23 (?)	110/5,1	[93, 113, 137, 142]	
Fosfoproteina B23/numatryna (wątrobiak Novikoffa, fibroblasty, limfocyty B, komórki wywodzące się z linii B)	38-40/5,0	[16-19, 41, 42, 44]	Organizacja genów rybosomalnych
Antygen p120 (komórki HeLa, rak piersi, wątrobiak Novikoffa)	120	[49, 50, 56, 111]	Potencjalny antygen proliferacji
C. SIEĆ WŁÓKNISTO-ZIARNISTA			
Wieloenzymatyczny kompleks replikacyjny (polimeraza DNA α , DNA prymaza, 3'→5'-egzonukleaza, RNAza H, metylaza DNA) (wątroba szczura)		[84, 150, 151]	Replikacja DNA
Białko C ₁ i C ₂ cząstek rdzeni hnRNP (komórki HeLa)	39; 41	[156]	Składanie mRNA
Białko 70-U1 snRNA (komórki szczura, komórki HeLa)	70	[156]	jw.
Białko D (białko rdzeni U1, U2, U5, U4/U6 snRNP)(komórki HeLa)	16	[62]	jw.
p107	107/8,7 -8,8	[138]	jw.
Sm antygen (wątroba szczura)	28/9,5	[134, 138]	Antygen proliferacji
p125/6,5	125/6,5	[58, 148]	jw.

cd. tab. 1

Białko (materiał, w którym zostało wykryte)	M.cz. [kDa (ew. pI)]	Najważniejsze dane bibliograficzne	Funkcja
Matryny: 3 4 D-G 12, 13 F/G (wątroba szczura)	125/6,0 105 60-75 42, 48 65/10,19	[7, 59, 60, 105]	Organizacja DNA jw. jw. jw. jw.
Białko ARBP (jajowód kury)	95	[160]	Zakotwiczenie pętli DNA w matriks jądrowej
Aktyna (limfocyty, komórki nowotworowe)	43	[103, 152, 154]	Transport RNA, składnik strukturalny
Deacetylaza histonów H3, H4 (erytrocyty kury)		[63]	Udział w transkrypcji DNA
Kinazy fosfatydyloinozytolo 4,5-bis-fosforanu		[118]	Metabolizm fosfolipidów
Kinaza diacyloglicerolowa		[2]	jw.
Fosfolipaza C		[2]	jw.
D. BIAŁKA MATRIKS JĄDROWEJ – brak określonej lokalizacji w jej substrukturach			
RFP (chłoniak Burkitta, wątrobiak szczura AW7974)	58	[71]	Specyficzne rozpoznawanie DNA
Białko NuMa (antygen SPN, centrofilina) (komórki HeLa, BHK)	236	[25, 75, 76]	Rozdział chromosomów, udział w reorganizacji jądra komórkowego
Topoizomeraza II	170	[24, 33, 34, 38, 125]	Regulacja stanu topologicznego DNA, replikacja DNA
Terminalna transferaza (linia KM-3)		[32]	Replikacja DNA
Białko PRP kompleks: kinaza 3-fosfoglicerynianowa aneksyna II (komórki HeLa)	41/36	[159]	Udział w replikacji DNA odcinków poprzedzonych krótkimi odcinkami typu "primer"
Kalmodulina		[124]	Replikacja DNA (?)
Endonukleaza (dynia)	32	[128, 129]	Zmiany stanu opakowania DNA
RBF-1 (Receptor Binding Factor-1) (jajowód kury)	10	[126, 135]	Wiązanie kompleksów: progesteron-białko receptorowe
Fosfolipaza A2 (wątrobiak szczura AW7974)		[147]	Metabolizm fosfatydyloinozytoli w jądrze komórkowym,
Białka wiążące cAMP	40, 50, 55, 150, 200	[57]	wtórny przekaz sygnałów Wtórny przekaz sygnałów
Kinaza białkowa p63 (komórki HL-60)	63/6,0	[130, 131]	Udział w różnicowaniu
Keratynopodobne białko p55 (wątroba szczura)	55/6,2	[1]	Składnik strukturalny
Białka p60 i p65 (marchew)	60 i 65	[48]	jw.
poli(ADP-rybozo)polimeraza (komórki CaLu-1)	116	[79, 120, 162]	Modyfikacja posttranslacyjna białek jądrowych, naprawa uszkodzeń DNA
Fibronektyna		[173]	Składnik strukturalny
Adenylotransferaza mononukleotydu nikotynamidowego (łożysko człowieka)		[6]	Enzym pomocniczy polimerazy poli-ADP-rybozy
Katalaza (hepatocyty świnki morskiej)	240	[169]	?

1.–249. i 111.–261. *In vitro* hamuje on glikozylację cząsteczki gp62 oraz jej fragmentów między aminokwasami: 1.–249. i 111.–261. W przeprowadzonych eksperymentach N-końcowy segment białka gp62 (1.–341.) zawierający aminokwasy zarówno o wysokim, jak i o niskim powinowactwie do enzymu ulega glikozylacji dwufazowej. W pierwszej kolejności ma miejsce powolna glikozylacja reszt o wysokim powinowactwie, potem zaś szybka modyfikacja pozostałej części łańcucha. Proces ten przebiega zapewne w sposób kooperatywny i prawdopodobnie tak modyfikowana jest cząsteczka gp62 *in vivo*. Umożliwia to precyzyjną regulację zawartości reszt cukrowych w gp62, zależną od aktywności glikotransferazy i ich dostępności w komórce [27]. Poziom glikozylacji gp62 może wpływać na przebieg transportu przez pory jądrowe, regulacja zaś aktywności enzymu może odbywać się w drodze zmiany składu podjednostek w różnych fazach cyklu komórkowego lub podczas rozwoju organizmu [26]. Możliwość intensywnej glikozylacji N-końcowego fragmentu gp62 wiąże się zapewne z jego wzbogaceniem w aminokwasy hydroksylowe – serynę i treoninę, których suma stanowi aż 34,8% u *X. laevis* i 38,8% – u myszy. Wspólny motyw sekwencyjny dla tego odcinka gp62 u różnych gatunków zwierząt to: Gly-Phe-X-Phe-Gly, gdzie X: Ser, Thr, Asp, Gly, Ala, Val [26].

W innej nukleoporynie, tj. gp153, obserwowano zbliżony motyw sekwencyjny, jednak o zmienionej kolejności aminokwasów, tj. X-Phe-X-Phe-Gly. To ciekawe białko zawiera cztery palce cynkowe typu Cys₂-Cys₂, zdolne wiązać DNA *in vitro* w sposób zależny od obecności jonów cynku i jest zlokalizowane po stronie nukleoplazmatycznej kompleksu porowego [145].

Ukazały się również sygnałne doniesienia o wykryciu u drożdży nukleoporyn opisanych jako: NSP1 o m. cz. 86 kDa [14, 70, 106], NUP1 o m. cz. 130 kDa [28] oraz NUP49, NUP100 i NUP116 o m. cz./pI odpowiednio: 49/5,94; 100/9,38 i 116/9,32 [161]. Motyw sekwencyjny: Gly-Leu-Phe-Gly jest wspólny dla białek NUP49, NUP100 i NUP116, powtarzając się w ich N-końcowym fragmencie łańcucha odpowiednio: 13, 29 i 33 razy. Z kolei w białkach NSP1 i NUP1 9-aminokwasowy, konserwatywny fragment: Lys-Pro-Ala-Phe-Ser-Phe-Gly-Ala-Lys zostaje skrócony w polipeptydach: NUP49, NUP100 i NUP116 do rdzeniowego tripeptydu: Phe-X-Phe [161]. Zaobserwowano, że motyw sekwencji Gly-Leu-Phe-Gly ulega mutacji do układu: Phe-Ser-Phe-Gly w białkach NUP1 i NSP1, w których powtarza się 6–9-krotnie w N- i C-końcowej części łańcucha [14, 28, 161].

Ostatnio wykryto w matriks jądrowej pochodzenia roślinnego (marchew) białka (m. cz. 96 i 100 kDa) o cechach zbliżonych do nukleoporyn kręgowców i drożdży [99, 132]. Inne białko kompleksów porów jądrowych – transmembranową glikoproteinę o m. cz. 210 kDa cechuje N-glikozydowe przyłączenie reszt cukrowych, wśród których dominuje mannoza rozpoznawana przez lektynę, konkanawalinę A (ConA). Enzym atakujący wiązanie N-glikozydowe w tej glikoproteinie (endoglikozydaza H; endo- β -N-acetyloglukozaminidaza H) usuwa reszty cukrowe powodując spadek jej masy cząsteczkowej o 9 kDa. W cząsteczce gp210 o długości 1886 aminokwasów

stwierdzono dwie domeny hydrofobowe, tj. między 1469.–1509. i 1809.–1829. aminokwasem, wiążące się z otoczką jądrową. Obie wspomniane domeny tego białka mogą działać kooperatywnie dzięki ich otoczeniu przez aminokwasy hydrofilowe, co ma niewątpliwie wpływ na proces odbudowy kompleksu porów otoczki jądrowej *in vivo* [166]. Prowadząc wnikliwe badania stwierdzono, że niewielki C-końcowy odcinek białka gp210 wchodzi w interakcję z obwodową częścią kompleksu porowego (tzw. podjednostka luminalna), pozostała zaś część jego łańcucha znajduje się między błonami otoczki jądrowej [166].

3. BIAŁKA MATRIKS JĄDERKOWEJ

Reszkowe jąderko (matriks jąderkowa) wyróżnia się rozmiarami wśród pozostałych substruktur szkieletu jądrowego i stanowi odrębną całość, która odpowiada przede wszystkim za przestrzenną organizację chromatyny jąderkowej i produktów jej transkrypcji. Z uwagi na funkcje jąderka, które jest miejscem syntezy i dojrzewania pre rRNA, a także „montażu” cząstek prerybosomalnych, poznanie struktury jego szkieletu pozostaje w centrum uwagi wielu laboratoriów [47, 113, 137, 142].

Należy podkreślić, że zgodnie z definicją matriks jąderkowej podaną przez Jordana w 1984 r. [74] reprezentuje ona pozostałość jąderka, otrzymaną po kolejnych ekstrakcjach solami, detergentami i nukleolizie, z wykluczeniem trawienia RNAzą A. Zachowany po takich zabiegach rozmiar i kształt oryginalnych jąderek warunkują przede wszystkim składniki rybonukleoproteinowe oraz niewielka ilość DNA (ok. 4% jąderkowego DNA) [113].

Najlepiej poznanymi białkami tej substruktury matriks są fibrylaryna (ang. *fibrillar*) oraz numatryna (por. tab. 1B).

Fibrylaryna, wykryta przez Christensena i wsp. [23] u śluzowca *Physarum polycephalum*, zyskała swoją nazwę w laboratorium Buscha [110] ze względu na jej wybiórczą lokalizację w fibrylarnych rejonach jąderka ssaków (gęsty składnik fibrylarny i centra fibrylarne). Reprezentuje składnik jąderkowych cząstek snRNP (ang. *small nuclear ribonucleoprotein particles*), których rola wiąże się z początkowymi etapami dojrzewania pre rRNA, m.in. z wycinaniem transkryptów pre rRNA przy 5'końcu łańcucha. W komórkach ludzkich białko to tworzy kompleksy z U3, U8 i U13 snRNA, podczas gdy w drożdżach aż z ośmioma różnymi snRNA [3, 4, 73]. Polipeptyd ten wyodrębniony z różnych gatunków wykazuje szereg wspólnych cech, np. m. cz. w zakresie od 33 do 38 kDa, punkt izoelektryczny w zasadowym przedziale pH (8,5–10,0), wysoką zawartość glicyny (ok. 20 mol%) oraz dimetyloargininy (ok. 4 mol%). W fibrylarynie komórek HeLa, liczącej 321 aminokwasów, wyróżnia się trzy domeny istotne zapewne dla jej funkcji [4]. W N-końcu cząsteczki zlokalizowany jest ok. 70-aminokwasowy segment bogaty w glicynę i dimetyloargininę, w centrum – ok. 90-aminokwasowy odcinek, przypuszczalnie odpowiedzialny za wiązanie z

RNA (zawiera motyw sekwencyjny – Gly-Leu-Val-Tyr-Ala-Val-Glu-Phe, typowy dla białek wiążących RNA) oraz w C-końcu – zestrukturalizowany fragment α -heli-kalny (ok. 33 aminokwasy). Z obszernych badań struktury pierwszorzędowej fibrylaryn różnego pochodzenia można wnioskować o ich znacznym konserwatyźmie ewolucyjnym. Okazało się, że ten polipeptyd jąderkowy wydzielony z komórek ludzkich wykazuje odpowiednio 67 i 81% homologii z białkiem drożdży i *X. laevis* [3, 4, 73].

Na podkreślenie zasługuje fakt, że fibrylaryna wyizolowana z komórek nabłonkowych, fibroblastów czy limfocytów człowieka, a także żaby, szczura czy myszy daje reakcję krzyżową z surowicami pacjentów cierpiących na sklerodermię [94, 110].

W 1991 r. Ochs i Smetana [112] dzięki immunomikroskopii elektronowej wykryli to białko w szkielecie jąderka komórek *X. laevis*, kury i człowieka. Odpowiada ono opisywanemu przez innych badaczy [94, 137], zasadowemu białku p34. Ochs i Smetana [112] sugerują, że w matriks jąderkowej obecne są przynajmniej dwie populacje fibrylaryny:

1^o zaangażowana w proces skracania produktów transkrypcji pre rRNA oraz

2^o o funkcji związanej z upakowaniem rRNA. Dodatni ładunek tego białka sprzyja zapewne umacnianiu interakcji z rDNA, rRNA oraz z kwaśnymi białkami jąderka – B23 i C23, opisanymi w latach siedemdziesiątych w laboratorium Buscha [93].

Białko B23, zwane również nukleofosminą bądź NO38 [16–19, 119], reprezentuje składnik jąderka umiejscowiony głównie w jego rejonach granulanych. Ilość B23 podlega wahaniom w zależności od aktywności proliferacyjnej komórek. Feuerstein i Mond [41] w 1987 r. wykryli w matriks jądrowej limfocytów B myszy białko o m. cz./pI – 40/5,0, nazwane numatryną, którego biosynteza gwałtownie rośnie w komórkach tej linii pod wpływem mitogenów (estry forbolu, przeciwciała, liposacharydy). Ten wzrost zawartości numatryny wyprzedza wzmoczoną biosyntezę DNA, co wydaje się stanowić sygnał do rozpoczęcia proliferacji komórek. Zaobserwowano, że biosynteza numatryny w komórkach aktywnie rosnących i nowotworowych może być nawet 20-krotnie wyższa niż w komórkach spoczynkowych [41, 42]. Za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej i analizy map tryptycznych numatryny i białka B23 wykazano ich homologię. Reakcje krzyżowe przeciwciał skierowanych przeciwko B23 z numatryną i odwrotnie – przeciwciał anty-numatryna z białkiem B23 ostatecznie potwierdziły tożsamość tych białek. Doniesiono o sklonowaniu genów kodujących białko B23 człowieka, szczura i kury [17, 18, 97]. Ich ekspresja dostarczyła polipeptydów o długości odpowiednio 294, 292 i 294 reszt aminokwasowych. Okazało się, że białko to może występować w dwóch formach opisywanych jako B23.1 i B23.2 o długości 257 i 292 aminokwasów; stanowią one produkt ekspresji tego samego genu [19].

Wnikliwa analiza struktury pierwszorzędowej B23 wykazała znaczną homologię (ok. 50%) N-końcowego segmentu (ok. 140 aminokwasów) z nukleoplazminą, białkiem uczestniczącym m.in. w organizacji nukleosomów [17, 31, 36]. Z kolei w centralnej części łańcucha B23 występują dwie domeny o wysokiej zawartości ami-

nokwasów kwaśnych (u człowieka i szczura zespoły sekwencji odpowiednio między aminokwasami: 120.–132., 161.–188. i 120.–132., 159.–187.). Wykazano, że seryna pierwszej domeny jest akceptorem reszt fosforanowych *in vivo* [16]. Ten aminokwas jest fosforylowany przez kinazę kazeinową II, która preferencyjnie wprowadza reszty fosforanowe na hydroksyaminokwasy znajdujące się w łańcuchu białkowym w sąsiedztwie aminokwasów kwaśnych [16, 133]. Uważa się, że to jąderkowe białko zawiera potencjalne miejsca fosforylacji przez mitotyczną kinazę p34^{cdc2} na reszcie treoniny, w obrębie motywu sekwencyjnego: Thr-Pro-X-Lys-Lys [98]. Białko B23 zostaje wbudowane w strukturę szkieletu jąderkowego w toku dwustopniowej polimeryzacji. W pierwszym etapie ulega dimeryzacji (m. cz. 55 kDa), a następnie tworzy większe agregaty stabilizowane głównie przez mostki dwusiarczkowe [44]. Sprawą wciąż otwartą jest funkcja tego bogato reprezentowanego białka szkieletu jąderkowego. Rozważa się możliwość jego udziału w organizacji i transporcie rybosomów [19, 98].

Problemem dyskusyjnym jest obecność w matriks jąderkowej innej fosfoproteiny – białka C23, zwanego również nukleoliną (m. cz./pI: 110/5,1). W doniesieniach Olsona i wsp. [113] polipeptyd ten stanowi dominujący składnik matriks jąderkowej wątrobiaka Novikoffa obok białek o m. cz. 28, 37,5, 40, 70, 72 i 160 kDa. Jednakże obserwacje Shiomi i wsp. [137] i innych badaczy [142] wskazują, że ekstrakcja jąderek za pomocą wysokich stężeń NaCl lub dijudosalicylanu litu usuwa białko C23 z ich szkieletu. Białko to zlokalizowane w fibrylarnych rejonach jąderka ulega autokatalitycznej degradacji, którą hamuje w komórkach proliferujących bliżej nieokreślony czynnik [21].

W szkielecie jąderek *X. laevis* stwierdzono specyficzny dla tego organizmu polipeptyd o m. cz. 145 kDa i pI 6,15 [47]. Natomiast Freeman i wsp. [49, 50, 111] w mikrofibrylach matriks jąderkowej komórek aktywnie proliferujących i nowotworowych (np. HeLa, rak piersi, wątrobiak Novikoffa) wykryli wysokocząsteczkowe białko o m. cz. 120 kDa.

Zini i wsp. [174] potwierdzili występowanie w komórkach HeLa dwóch izoform topoizomerazy II, enzymu odpowiadającego za utrzymanie architektury DNA oraz jego replikację. Obie formy enzymu różnią się masą cząsteczkową, tj. 180/150 i 170 kDa oraz dynamiką i miejscem pojawiania się w cyklu komórkowym [24, 33, 34, 38, 146, 174]. Wykorzystując immunomikroskopię elektronową wykazano, że izoforma topoizomerazy II-180/150 (opisywana dwiema wartościami m. cz. ze względu na łatwość degradacji oryginalnego enzymu o m. cz. 180 do 150 kDa w toku preparatyki) jest zlokalizowana w interfazie w jąderku; głównie w jego gęstym składniku fibrylarnym. Nie obserwowano jej w nukleoplazmie jąder interfazowych ani w chromosomach metafazowych. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko izoformie enzymu 180/150 kDa silnie reagowały z matriks jądrową oraz jej substrukturą – resztkowym jąderkiem. Badacze sugerują, że ta izoforma topoizomerazy II może stanowić istotny element katalityczno-strukturalny nieodzowny w organizacji przestrzennej oraz regulacji transkrypcji genów rybosomalnych [142, 174].

4. BIAŁKA SIECI WŁÓKNISTO-ZIARNISTEJ

W mikroskopie elektronowym ta substruktura matriks jądrowej widoczna jest jako sieć włókien o średnicy 9–13 nm i połączonych z nią ziarnistości o średnicy 20–25 nm [109, 172]. W wewnątrzjądrowej sieci włóknisto-ziarnistej znajduje się wiele białek niezbędnych dla metabolizmu DNA i RNA [6, 15, 79, 81, 127, 150, 151, 159, 167, 168; por. tab. 1C]. Ponadto występują tu składniki strukturalne o naturze głównie rybonukleoproteinowej, których obecność w wydzielonych preparatach warunkuje procedura izolowania szkieletu jądrowego [84, 133], a także aktywność metaboliczna jądra komórkowego. Okazało się np., że w jądrach dojrzałych erytrocytów kury, w których nie przebiega już biosynteza DNA czy RNA, nie wykrywa się tej substruktury matriks [89].

Odnotowano w niej kilka białek tworzących kompleksy z U1, U2, U4/U6 i U5 snRNA o m. cz. 16, 28 i 70 kDa [62, 138, 156] oraz komponenty cząstek hnRNP o m. cz. 39(C₁) i 41 (C₂) kDa [156, 157].

Wykorzystując metodę immunochemiczną lokalizacji antygenów wykryto w sieci aktynę (m. cz./pI; 41/5,5) oraz białka podobne do składników filamentów pośrednich o m. cz. 60 i 65 kDa [48, 104, 154]. Przez wiele lat obecność aktyny w jądrach komórkowych budziła kontrowersje. Nakayasu i Ueda [104, 152], jako pierwsi, wykazali za pomocą immunomikroskopii elektronowej, że białko to jest zlokalizowane głównie wewnątrz szkieletu jądrowego limfocytów prawidłowych i nowotworowych myszy.

Jądrowa aktyna wykazuje zbliżone właściwości do analogicznego białka cytoplazmatycznego. Sugeruje się, że sprawuje ona w jądrze komórkowym funkcje „transportera” cząstek RNP. Wydaje się, że transport ten polega na „ślizganiu się” wspomnianych cząstek wzdłuż filamentów aktynowych, a nie na skoordynowanym procesie ich depolimeryzacji i repolimeryzacji [104]. Tę ostatnią możliwość wykluczono stosując falloidyne, inhibitor depolimeryzacji aktyny, który nie wpływa na transport cząstek snRNP.

Obecność aktyny w jądrze komórek raka wosniakowego Guerin potwierdzili ostatnio Valkov i wsp. [154]. Za pomocą autoradiografii i techniki radioimmunologicznej stwierdzono, że białko to stanowi ok. 3% białek jądrowych oraz 9% – matriks jądrowej. Blisko połowa aktyny obecnej w szkielecie jądrowym wiąże się z DNA tej struktury. W wiązaniu jądrowej aktyny z DNA wydaje się uczestniczyć opisane przez Prendergasta i Ziffa [123] białko mbh1 (ang. *myc basic motif homolog-1*), zbliżone strukturalnie i funkcjonalnie do gelsoliny i seweryny, polipeptydów cytoplazmatycznych regulujących długość filamentów aktynowych. Analiza w mikroskopie elektronowym preparatów matriks, po reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko aktynie, z następczą identyfikacją za pomocą kompleksu białko A-złoto ujawniła, że ten polipeptyd lokalizuje się przede wszystkim w sieci włóknisto-ziarnistej. Obserwacja, że przeciwciała przeciwko aktynie selektywnie blokują transkrypcję katalizo-

waną przez polimerazę RNA typu II oraz zdolność do tworzenia kompleksów aktywna-polimeraza nasuwają przypuszczenie, że białko to może uczestniczyć, w sposób jeszcze bliżej nieokreślony, w procesie transkrypcji.

W laboratorium Bereznaya [7, 59, 60, 105] wykryto w sieci włóknisto-ziarnistej matriks jądrowej nową rodzinę białek, którą nazwano matrynami. W elektroferogramach dwuwymiarowych szkieletu jądrowego wątroby szczura białka te stanowią główne składniki obok lamin A, B i C, B23 oraz białek hnRNP. Są to: matryna 3 (125 kDa/pI 6,0), 4 (105 kDa/pI zasadowy), D-G (60–70 kDa/pI zasadowy) oraz 12 i 13 (42–48 kDa/pI kwaśny). Wnikliwe badania immunologiczne połączone z analizą sekwencji N-końcowych fragmentów łańcuchów pozwoliły wydzielić trzy pary zbliżonych do siebie matryn, tj. D/E, F/G i 12/13. Jak dotąd przedstawiono bliżej charakterystykę dwóch nowopoznaczonych białek – matryny F/G i 3.

Matryna F/G jest silnie zasadowym (pI, 10,19) białkiem zbudowanym z 544 aminokwasów, ze znaczną przewagą aminokwasów hydrofobowych (ok. 55%). Oddziałuje ono z DNA przez dwa motywy strukturalne o naturze palców cynkowych. W obrębie jednego z nich, a w sąsiedztwie następnego, występuje unikatowa, palindromowa sekwencja: Ser₂-Thr-Asn-Thr-Ser₂. Zawiera ona potencjalne miejsca fosforylacji i glikozylacji, co prawdopodobnie modyfikuje przebieg interakcji tej matryny z DNA [59].

Matryna 3 natomiast składa się z 845 aminokwasów. W jej N-końcowym fragmencie łańcucha (1–120 reszt aminokwasowych), naładowanym dodatnio wśród pierwszych 100 aminokwasów znajduje się aż 26 hydroksyaminokwasów. Z kolei C-końcowy segment białka (170 aminokwasów) zawiera 32% aminokwasów kwaśnych. Tak wysoki odsetek Glu i Asp zidentyfikowano również w C-końcu łańcuchów czynników transkrypcyjnych: GCN4, GAL4 i receptora glukokortykoidów. Białko to cechuje wyjątkowo wysoka konserwatywność. Porównanie sekwencji aminokwasowej matryny 3 człowieka i szczura wykazuje 96% homologii [7]. Wciąż niewiele wiadomo o funkcji matryn. Dalsze badania zapewne wkrótce wyjaśnią biologiczny sens ich znacznej reprezentacji w szkielecie jądrowym.

W wewnętrznej sieci włóknisto-ziarnistej znajduje się białko rozpoznające sekwencje MAR DNA, opisywane symbolem ARBP (ang. *Attachment Region Binding Protein*). Polipeptyd ten o m. cz. 95 kDa, wyodrębniony z jajowodu kury, odpowiada za „wypętlanie” nici DNA. Wydaje się, że jest on zdolny rozpoznawać określone struktury heliksu DNA, a nie specyficzne sekwencje [160]. Białko ARBP selektywnie wiąże się z MAR genu lizozymu kury oraz z sekwencją MAR genów *Drosophila*, myszy i człowieka.

W szkielecie jądrowym niedojrzałych erytrocytów kury stwierdzono wysoką aktywność (40–50% ogólnej aktywności) deacetylazy histonowej. Praktycznie całą tę aktywność (ok. 95%) odnajdowano po rozfrakcjonowaniu matriks jądrowej w jej sieci wewnętrznej. Hendzel i wsp. [63] wysunęli sugestię, że enzym ten poza modulowaniem poziomu acetylowanych histonów, związanych z DNA aktywnej transkrypcyj-

nie chromatyny, może pośredniczyć również w dynamicznych interakcjach aktywnych genów z wewnętrznym szkieletem jądrowym.

Matriks jądrowa uczestniczy w przekazywaniu informacji za pomocą wtórnych przekaźników [57, 118, 147]. Wykryto w tej strukturze białka wiążące cAMP o m. cz. 40, 50, 55, 150 i 200 kDa [57]. Pionierskie doświadczenia grupy Payrastre'a i wsp. [118] zasygnalizowały związek z matriks jąder fibroblastów myszy i wątroby szczura enzymów cyklu fosfoinozytowego, tj. kinaz fosfatydyloinozytowych, kinazy diacyloglicerolowej oraz fosfolipazy C. Powyższe enzymy wykazują szczególną lokalizację w szkielecie jądrowym. Kinaza fosfatydyloinozytolo-4-fosforanowa, umiejscowiona w jego warstwie peryferycznej, chroni przed „ucieczką” reszt fosfatydyloinozytoli poza jądro komórkowe przeprowadzając go w fosfatydyloinozytolo-4-fosforan. Ten związek, dzięki kolejnej kinazie, ale zlokalizowanej w wewnętrznej sieci włóknisto-ziarnistej, ulega fosforylacji do fosfatydyloinozytolo-4-bisfosforanu, który może być hydrolizowany przez bardzo aktywną w tej podstrukturze matriks – fosfolipazę C do diacyloglicerolu i trifosfoinozytoli. Obydwa te związki reprezentują wtórne przekaźniki informacji w komórce. Diacyloglicerol może modyfikować aktywność kinazy białkowej C albo może być ufosforylowany przez kinazę diacyloglicerolową, zlokalizowaną wybiórczo w wewnętrznej sieci matriks jądrowej, do kwasu fosfatydowego. Aczkolwiek rola wspomnianych związków w jądrze komórkowym wciąż jest nie wyjaśniona wydaje się, że „przedziałowość” enzymów związanych z metabolizmem fosfolipidów znajdzie wkrótce wytłumaczenie. Jak dotąd udało się stwierdzić *in vitro*, że inozytolo mono-fosforan i fosfatydyloinozytolo-1,4-bisfosforan aktywują polimerazę DNA typu α [118].

W matriks jądrowej stwierdzono obecność wielu białek bez zdefiniowanej przynależności do jednej z trzech jej podstruktur (por. tab. 1D).

Wśród aktywności enzymów modulujących białka jądrowe, a także zaangażowanych w procesy naprawy DNA, stwierdzono poli(ADP-rybozo)-polimerazę (m. cz. 116 kDa). Aktywność tego enzymu w matriks jądrowej waha się od 2 do 35% obserwowanej w puli jądrowej [29, 79, 162]. Tak duża rozbieżność wyników może być spowodowana ścisłą asocjacją polimerazy z DNA matriks i usuwaniem jej w czasie trawienia DNazą I podczas izolowania tej struktury.

Enzymy kompleksu replikacyjnego są wspomagane przez białko PRP (ang. *Primer Recognition Protein*). Białko to wydaje się przyczyniać do wydajniejszej replikacji odcinków DNA, poprzedzonych krótkimi sekwencjami typu „primer” [159]. W matriks jąder komórek HeLa funkcję tę pełni kompleks aneksyny II (m. cz. 36 kDa) i kinazy 3-fosfoglicerynianowej (m. cz. 41 kDa).

Proces replikacji DNA wymaga obecności innego enzymu pomocniczego – topoizomerazy II, której obecność wykryto po raz pierwszy w szkielecie chromosomów mitotycznych komórek HeLa (por. [81]). Enzym ten kontroluje, obok topoizomerazy I, superhelikalność cząsteczki DNA. Drake i wsp. [33, 34] udowodnili obecność dwóch izoform tego enzymu, tj. o m. cz. 180 i 170 kDa. O ile wiadomo, że izoforma

180/150 występuje w matriks jąderkowej (por. rozdz. 3), to lokalizacja białka o m. cz. 170 kDa nie jest w pełni ustalona. Część tego enzymu jest związana przede wszystkim z wewnętrzną siecią matriks, w której pełni istotną funkcję w „zakotwiczeniu” do niej pętli DNA. Odcinki MAR/SAR, tj. sekwencje, za pomocą których wchodzi on w interakcje z białkami szkieletu jądra interfazowego (MAR), bądź rusztowania chromosomów mitotycznych (SAR; ang. *Scaffold Attached Region*) zawierają motyw sekwencyjny specyficznym rozpoznawany przez topoizomerazę II [12, 72, 125].

Inne białko, oznakowane symbolem RFP (m. cz. 58 kDa), które opisano w matriks komórek nowotworowych, wykazuje w swojej strukturze motyw sekwencyjny Cys₃-His-Cys₄. Wydaje się, że ta cecha może być związana z jego zdolnością rozpoznawania określonych miejsc w DNA. Polipeptyd RFP nie występuje w tkankach prawidłowych (wątroba, śledziona, nerka), z wyjątkiem jąder myszy. Postuluje się jego udział w kontroli wzrostu komórek [71].

W laboratorium Spelsberga [126, 135] wykryto w matriks jąder jajowodu kury czynnik białkowy RBF-1 (ang. *Receptor Binding Factor-1*) wiążący kompleks progesteron-receptor [101, 102]. To niskocząsteczkowe białko (m. cz. 10 kDa) jest silnie reprezentowane w matriks wątroby, w śladowych ilościach zaś w analogicznej strukturze śledziony kury. Sugeruje się, że białko RBF-1 może uczestniczyć, wspólnie z onkogenem *c-myc*, w kaskadowej regulacji transkrypcji genów kontrolowanych przez hormony sterydowe [135].

Obecność niektórych białek w szkielecie jądrowym jest prawdziwym zaskoczeniem (np. katalazy, fibronektyny) [169, 173; por. tab. 1D]. Potwierdzenie ich występowania, a także powiązanie z ewentualną funkcją w tej istotnej strukturze jądra komórkowego wymaga dalszych badań.

5. SPECYFICZNOŚĆ BIAŁEK MATRIKS JĄDROWEJ

Specyficzność białek matriks jądrowej może być rozpatrywana na poziomie komórkowym, tkankowym i gatunkowym [40, 43, 52, 80, 143, 144]. Również procesom różnicowania się i nowotworzenia komórek towarzyszy biosynteza odrębnych białek tej struktury szkieletowej [35, 49, 50, 53, 56, 82, 83, 171]. Sygnalne doniesienia dotyczące specyficznych białek mają jak dotąd formę wstępnej charakterystyki i obejmują dane dotyczące ich masy cząsteczkowej czy punktu izoelektrycznego.

Fey i Penman [43] jako pierwsi zwrócili uwagę na zjawisko specyficzności komórkowej białek matriks jądrowej. W cytowanych badaniach białka szkieletu jądrowego wydzielono z diploidalnych fibroblastów i trzech linii nowotworów piersi: (MCF7, BF20 i T47), komórek gruczołakoraka kory nadnerczy (HuT80) i dwunastnicy (SW-13) oraz glejaka (A-172).

Przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko białkom matriks jąder komórek raka piersi (linia MCF7) rozpoznawały w teście immunofluorescencyjnym białka tej

struktury zlokalizowane głównie w wewnętrznej części szkieletu jądrowego. Stwierdzenie obecności pewnych specyficznych komponentów wśród bardzo niejednorodnej puli białek matriks różnych linii ludzkich komórek nowotworowych, zapoczątkowało poszukiwania w tej strukturze znaczników procesu nowotworzenia. Okazało się, że białka szkieletu jądrowego wzmiankowanych komórek nowotworów piersi cechowała obecność 37 wspólnych składników spośród ogółem 205 wchodzących w skład tej struktury badanych linii komórek, co wskazuje na ich znaczną odrębność molekularną. W przypadku matriks jąder prawidłowych fibroblastów odnotowano pięć specyficznych białek, w gruczolakoraku nadnerczy i dwunastnicy odpowiednio – 32 i 42, natomiast w glejaku – 30 [43].

Stuurman i wsp. [144] poddali wyczerpującej analizie elektroforetycznej białka matriks jądrowej różnych nowotworów linii zarodkowych myszy, wątroby, nerek i mózgu myszy, wątroby szczura oraz ludzkich komórek białaczkowych K562. Wśród „gąszczu” składników białkowych matriks, którą badacze rozfrakcjonowali dodatkowo na tzw. peryferyczną oraz wewnętrzną matriks (por. [84, 144]), pewna ich część wykazuje konserwatywność ewolucyjną. Wynika ona zapewne z faktu, że pełnią one analogiczne funkcje w organizmach na różnym szczeblu rozwoju ewolucyjnego związane z metabolizmem jądra komórkowego. Te białka matriks wspólne dla różnych typów komórek i tkanek, opisywane jako „białka podstawowe”, są zapewne włączone w procesy m.in. replikacji, transkrypcji czy składania RNA. Należy podkreślić, że zarówno w komórkach zarodkowych myszy, jak i w badanych tkankach myszy, szczura i człowieka wykryto specyficzne białka, szczególnie w jej frakcji odpowiadającej sieci włóknisto-ziarnistej i resztkowym jąderkom [144].

Getzenberg i wsp. [52, 121] donieśli o pewnej odrębności białek komórek matriks gruczołu krokowego i pęcherzyków nasiennych szczura, których aktywność jest regulowana przez androgeny. Pod wpływem dihydrotestosteronu gruczoł krokowy (płat brzuszny) syntetyzuje jako główne białko sekrecyjne – prostateinę. Polipeptyd ten, będący glikoproteiną o m. cz. 40 kDa i pI 4,8, budują cztery podjednostki, wśród których dominuje składnik opisywany symbolem C3 (m. cz. 14 kDa). Z kolei w pęcherzykach nasiennych hormon ten stymuluje sekrecję 6 głównych białek, oznakowanych SV I–VI, wśród których przeważa synteza składnika SV VI o m. cz. 17000 kDa. Kastracja szczurów zmienia tor metaboliczny tych gruczołów, przerywając produkcję białek sekrecyjnych [52].

Autorzy sugerują, że odmienna regulacja przez dihydrotestosteron ekspresji genów kodujących białka sekrecyjne w gruczole krokowym i pęcherzykach nasiennych może wynikać z różnic w precyzyjnej organizacji DNA między tymi narządami, w której uczestniczą białka szkieletu jądrowego. Prowadząc analizę porównawczą techniką elektroforezy dwuwymiarowej białek matriks jądrowej, wydzielonej z wymienionych gruczołów szczurów kontrolnych oraz kastrowanych, ujawniono szereg różnic o naturze ilościowej i jakościowej. Wśród porównywanych białek wyróżniono trzy grupy:

1^o – obejmującą komponenty specyficzne dla gruczołu krokowego (płat brzuszny) i pęcherzyków nasiennych,

2^o – zawierającą składniki białkowe pojawiające się w tych gruczołach i zanikające po kastracji (a zatem regulowaną przez hormony) i

3^o – najliczniejszą, do której zaklasyfikowano wszystkie polipeptydy wspólne dla obydwu gruczołów; ich obecność nie wydaje się zależeć od wpływu hormonów.

Ciekawe rozwiązanie w analizie specyficzności tkankowej białek matriks zastosowali ostatnio Ferraro i wsp. [40]. Wykorzystali oni fakt tworzenia kompleksów białek z DNA za pomocą metali ciężkich, eliminując potrzebę etapów preparatywnych stosowanych przy wydzielaniu matriks. Czynnikiem wiążącym białka szkieletu z DNA był lek przeciwnowotworowy – *cis*-diaminodichloroplatyna (*cis*-DDP), którym traktowano hepatocyty kury, świni i bydła. Chromatografia na hydroksyapatycie posłużyła do rozdzielenia białek wiążących się z DNA od innych składników komórkowych, elektroforeza dwuwymiarowa zaś – do ich analizy. Porównanie elektroforegramów dwuwymiarowych białek matriks peryferycznej i wewnętrznej tych komórek wiążących się z DNA przez *cis*-DDP ujawniło 11 analogicznych polipeptydów. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że z tych 11 białek matriks, pięć stanowi wspólne składniki hepatocytów badanych gatunków. Ich konserwatyzm może wynikać z analogii pełnionych funkcji, wśród których badacze upatrują udział w zakotwiczeniu pętli chromatynowego DNA.

W szeroko zakrojonych eksperymentach grupy Stuurmana [143, 144] zwrócono uwagę na fakt, że podczas różnicowania się komórek dochodzi do zmian w ekspresji genów kodujących niektóre białka szkieletu jądrowego. Model doświadczalny stanowiła linia mysich, niezróżnicowanych zarodkowych komórek nowotworowych P19EC. Z komórek tych, pod wpływem kwasu *trans*-retinowego (10^{-6} M), udało się wyprowadzić trzy klony linii komórkowych odpowiadające różnym stopniom zróżnicowania, tj. endo-, epi- i mezodermie, opisywanym jako END-2, EPI-7 i MES-1. Analizą elektroforetyczną białek matriks wyodrębnionych z komórek niezróżnicowanych i odpowiadających wcześniejszym etapom różnicowania, tj. END-2 i EPI-7, ujawniono znaczne ich podobieństwo. Komórki niezróżnicowane, P19EC, zawierały pewną liczbę składników szkieletu jądrowego, które ulegały w nich specyficznej bądź wyraźnie wyższej lub niższej biosyntezie. Największe różnice obserwowano w jednowymiarowych obrazach elektroforetycznych białek matriks niezróżnicowanych (P19EC) i w pełni zróżnicowanych komórek MES-1. W tych ostatnich silnej ekspresji ulegają geny kodujące laminy A i C, których praktycznie nie wykrywa się w komórkach niezróżnicowanych. Wśród rodziny lamin tylko lamina B występuje w komórkach zarówno niezróżnicowanych, jak i zróżnicowanych. Procesowi różnicowania komórek P19EC towarzyszą ponadto zmiany w biosyntezie polipeptydu odpowiadającego prawdopodobnie wimentynie oraz kilku składników, które wydają się być syntetyzowane przejściowo w określonej fazie różnicowania [143]. Należy podkreślić, że różnicowaniu komórek P19EC po traktowaniu kwasem *trans*-retinowym (1,

3, 7 dni) towarzyszy zmiana fenotypu niektórych białek matriks, wydzielonych po określonym czasie działania czynnika indukującego ten proces. Zmiany te, natury ilościowej i jakościowej, są typowe dla procesu różnicowania; nie obserwowano ich wśród białek matriks wydzielonych z hodowli komórek P19EC RAC, które są niewrażliwe na działanie kwasu retinowego.

Z kolei Dworetzky i wsp. [35] opisali zmiany w składzie polipeptydowym szkieletu jądrowego osteoblastów w toku różnicowania *in vitro*. W procesie tym wyróżnia się trzy stadia:

1^o aktywną proliferację,

2^o dojrzewanie substancji międzykomórkowej (ang. *extracellular matrix maturation*) oraz

3^o mineralizację, które na poziomie molekularnym można monitorować poziomem syntezy mRNA określonych białek.

Podczas aktywnej proliferacji osteoblastów (7. dzień hodowli) dochodzi do wysokiej ekspresji genów histonów rdzeniowych, histonu H1 oraz kolagenu typu I. W kolejnym stadium (11.–15. dzień hodowli) spada aktywność proliferacyjna osteoblastów i uaktywniają się geny związane z ich wzrostem – kodujące przede wszystkim alkaliczną fosfatazę, osteopontinę oraz białka niekolagenowe. W stadium mineralizacji (19.–23. dzień hodowli) substancja międzykomórkowa nabywa cech zbliżonych do kości, a komórki osiągające ten stopień zróżnicowania cechuje wysoka ekspresja genów kodujących osteokalcynę i osteopontinę. Włączenie wysokorozdzielczej elektroforezy dwuwymiarowej do analizy składu białkowego preparatów matriks jądrowej wydzielonych z hodowli osteoblastów (znakowanych [³⁵S]-Met), odpowiadających trzem kolejnym stadiom ich różnicowania, pozwoliło stwierdzić w tych komórkach dwie klasy białek. Do pierwszej zostały zaliczone białka szkieletu jądrowego typowe dla wszystkich stadiów różnicujących się osteoblastów, w drugiej zaś znalazły się składniki specyficzne dla określonego stadium. Badacze obserwowali dwufazowe zmiany w fenotypie tych białek przy przejściu osteoblastów ze stadium aktywnej proliferacji do etapu dojrzewania substancji międzykomórkowej oraz w czasie odpowiadającym „wchodzeniu” w stan kostnienia. Analiza porównawcza białek wydzielonych z tego samego etapu różnicowania wskazywała na ich zbliżony fenotyp. Autorzy spekulują, że specyficzna dla określonego stadium różnicowania komórek kości biosynteza pewnych białek matriks może być związana z umiejscowieniem i organizacją określonych genów ulegających w tym okresie wybiórczej ekspresji. Nie wykluczają również możliwości, że właśnie te białka szkieletowe mogą ułatwić interakcję czynników transkrypcyjnych z sekwencjami regulatorowymi genów aktywnie transkrybowanych w różnicujących się komórkach [35].

Pod koniec 1991 r. ukazały się pierwsze zaskakujące doniesienia o specyficzności białek matriks jądrowej tego samego narządu, tj. gruczołu krokowego szczura [53]. Gruczoł ten jest dogodnym modelem badań specyficzności, gdyż budują go trzy odrębne morfologicznie i funkcjonalnie płaty, tj. grzbietowy, boczny i brzuszny.

Mimo pewnej odrębności, płaty grzbietowy i boczny mają wiele cech wspólnych odróżniających je od płata brzuszego, szczególnie jeśli chodzi o regulację hormonalną ekspresji genów. Wnikliwa analiza elektroforegramów dwuwymiarowych białek matriks trzech płatów gruczołu krokowego pozwoliła wstępnie scharakteryzować je pod względem m. cz. i pl. Poza ogromną większością wspólnych białek, najwyższą odrębność molekularną obserwowano w płacie brzuszonym, w którym stwierdzono 9 komponentów specyficznych, w bocznym i grzbietowym płacie zaś odpowiednio – pięć i jeden.

Prowadzone w ten sposób badania mają charakter wstępny, gdyż do identyfikacji białek stosuje się przede wszystkim elektroforezę dwuwymiarową, rzadko używając specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko określonym polipeptydom, np. przeciwko laminom. W tej sytuacji można liczyć się z przypadkową zbieżnością masy cząsteczkowej i punktów izoelektrycznych różnych białek i odwrotnie – odmiennych wielkości tych parametrów wśród jednakowych białek, jako efektu różnorodności ich przemian posttranslacyjnych.

Ostatnio szczególną uwagę ogniskuje się na poszukiwaniach, wśród białek matriks, specyficznych składników związanych z aktywną proliferacją oraz procesami chorobowymi, głównie autoimmunologicznymi [110, 134] i nowotworowymi [80, 82, 83, 117, 171]. Zakłada się bowiem, że pojawienie się pewnych specyficznych polipeptydów w tej strukturze może mieć wpływ na organizację przestrzenną DNA i zmienioną ekspresję genów. Jeżeli te zmiany znajdują odzwierciedlenie w białkowym szkielecie jądrowym, to wprzęgnięcie metod biochemicznych do ich wykrywania stwarza w diagnostyce możliwość wczesnego ich rozpoznawania.

Wśród potencjalnych znaczników proliferacji wymienia się m.in. polipeptyd p55/6,2 wykryty w sieci włóknisto-ziarnistej matriks hepatocytów szczura, zbliżony do keratyn przez swój hydrofobowy charakter [1] oraz białko p125/6,5 pojawiające się podczas spermatogenezy [58, 148]. To ostatnie występuje nie tylko w proliferujących, aktywnie wbudowujących [³H]-tymidynę komórkach Sertoliego noworodków szczura, lecz również w tej części prespermatogonii, które aktualnie nie dzielą się, lecz dopiero wejdą na drogę mejozy, co sugeruje jego udział w przygotowaniach jądra komórkowego do podziału [58].

Inne białko – numatryna łączy w sobie cechy znacznika proliferacji i nowotworzenia [41, 42, 98]. Jego poziom, wykrywany techniką *Western-blot*, wzrasta w komórkach wątrobiaka Novikoffa i dzielących się, prawidłowych hepatocytach – odpowiednio 20 i 2 razy. Ekspresja genu B23, mierzona techniką *Northern-blot*, wskazuje odpowiednio na 50- i 5-krotny wzrost zawartości mRNA białka B23 [17].

Zgodne opinie panują na temat laminy B jako znacznika procesu proliferacji. Jest ona białkiem specyficznym dla dzielących się komórek wątroby szczura [11] i wielu zarodkowych oraz niezarodkowych linii komórkowych myszy, wzmiankowanych w początkowej części tego rozdziału [143]. Laminy A i C nie zostały wykryte w tym

materiale, a w proliferujących hepatocytach nie stwierdzono nawet mRNA tych białek [11].

Fey i Penman [43], a potem Stuurman i wsp. [143, 144] zasugerowali występowanie wśród białek matriks składników, których biosynteza podlega wahaniom ilościowym bądź przebiega *de novo*, gdy komórki prawidłowe wchodzi na szlak niekontrolowanej proliferacji towarzyszącej nowotworzeniu. W tym miejscu należy zacytować serię prac dotyczących białek szkieletu jądrowego, zarówno nowotworów doświadczalnych jak i ludzkich, pochodzących głównie z laboratorium Coffeya [52, 53] lub jego współpracowników [80, 117]. Początkowo, w badaniach wykorzystywano transplantowane gruczolakoraki [53] gruczołu krokowego szczura, pojawiające się spontanicznie w jego płacie grzbietowym oraz wywodzące się z tego nowotworu trzy linie komórkowe o różniących się fenotypach. Analizowane linie były reprezentowane przez:

1^o komórki nowotworowe G – wrażliwe na androgeny, po transplatacji, powodujące duży przyrost masy guza, nie powodujące jednakże przerzutów ani śmierci zwierzęcia,

2^o komórki AT-2 – o niskiej zdolności do dawania przerzutów i szybszym wzroście niż komórki G oraz

3^o komórki MLL – dające wiele przerzutów i uśmiercające nosiciela guza, nawet przy niewielkich rozmiarach.

Dwuwymiarowe rozdziały elektroforetyczne białek matriks jądrowej wydzielanych z komórek prawidłowego płata grzbietowego gruczołu krokowego oraz z różnych linii gruczolakoraka Dunning wykazały komponenty specyficzne zarówno dla komórek prawidłowych, jak i transformowanych. Wykryto 10 indywidualnych składników ulegających biosyntezie wyłącznie w szkielecie jądrowym komórek prawidłowych i trzy polipeptydy charakterystyczne dla wszystkich linii gruczolakoraka Dunning [53]. Wydaje się, że białka pochodzące z komórek linii AT-2 i MLL, zbliżonych do siebie tempem proliferacji i właściwościami fizjologicznymi wykazują więcej podobieństw niż te wydzielone z linii G (por. tab. 2). Okazało się, że trzy białka matriks jądrowej płata grzbietowego gruczołu krokowego występują również wśród struktur szkieletu jądrowego komórek linii AT-2, przy zachowaniu w komórkach tej linii wszystkich innych białek, uznanych dla niej i dla komórek linii MLL za specyficzne. Bezpośrednią przyczynę stanowi zapewne nieuniknione przy izolowaniu guza linii AT-2 z tkanki, zanieczyszczenie białkami substancji międzykomórkowej komórek prawidłowych bądź ekspresja białek wspólnych w obrębie substancji międzykomórkowej obu typów komórek [52].

Procesom nowotworzenia u gryzoni towarzyszy pojawienie się w obrębie szkieletu jądrowego fenotypowo różnych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi, białek niehistonowych. Zastosowanie przeciwciał, skierowanych przeciwko wysokocząsteczkowym białkom niehistonowym wątrobiaka Morrisa 7777, pozwoliło zidentyfikować wśród matriks jądrowej wątrobiaków Morrisa 7777 i 8994 oraz chemicznego

TABELA 2. Białka matriks jądrowej specyficzne dla prawidłowego gruczołu krokowego szczura (płat grzbietowy) i komórek gruczolakoraka Dunning [53]

Białka	M. cz. [kDa]	pI
Białka specyficzne dla płatu grzbietowego gruczołu krokowego		
NDP-1	95	6,77
NDP-2	57	8,33
NDP-3	57	8,00
NDP-4	47	5,26
NDP-5	47	5,80
NDP-6	41	6,83
NDP-7	37,2	7,05
NDP-8	36,9	7,35
NDP-9	35	6,25
NDP-10	32,5	5,46
Białka specyficzne dla populacji komórek nowotworowych G		
G-1	55	6,48
G-2	52	6,93
Białka specyficzne dla populacji komórek AT-2 i MLL		
AM-1	40	6,73
AM-2	36	8,33
Białka specyficzne dla wszystkich badanych komórek nowotworowych Dunning		
D-1	63	8,55
D-2	40	5,91
D-3	33	6,97

wątrobiaka Kirkmana-Robbins immunospecyficzne komponenty, których nie obserwowano w komórkach wątroby szczura czy chomika. Dalsze eksperymenty wykorzystujące fosforylację *in vitro* oraz technikę immunoprecypitacji wykazały ich przynależność do fosfoprotein jądrowych [82, 83].

Również Zbarsky i wsp. [171] opisali specyficzne składniki matriks jądrowej o m. cz.: 30, 56, 86, 100, 150, 160, 190 i 200 kDa w innym nowotworze doświadczalnym – wątrobiaku Zajdela. Białka o m. cz. 190 i 200 kDa zawierają zapewne ufosforylowaną tyrozynę, gdyż estry w tych białkach są odporne na hydrolizę w 1 M roztworze NaOH o temp. 40°C.

Kilka białek o cechach potencjalnych znaczników nowotworzenia poznano bliżej. Należy do nich białko RFP o m. cz. 58 kDa [71], zawierające palec cynkowy C₃HC₄ (Cys₃-His-Cys₄) i dodatkową domenę bogatą w cysteinę i histydynę, co umożliwia jego wiązanie z DNA *in vitro*, a być może i *in vivo*.

Inne białko, opisane jako antygen p120, występuje w matriks jąderkowej komórek HeLa i charakteryzuje się wysokim obrotem metabolicznym. Pojawia się ono w tych komórkach zaledwie w 30 min po uzupełnieniu brakujących składników pożywki (osocze) [49, 56]. Okazało się, że p120 ulega ekspresji na granicy faz G1/S cyklu komórkowego i wiąże się z niekorzystnym rokowaniem w chorobie nowotworowej [49, 50].

Ostatnio poczyniono pierwsze kroki w poszukiwaniu znaczników procesu nowotworzenia wśród białek matriks komórek nowotworów ludzkich, wykorzystując do tego celu materiał pochodzący z biopsji (rak piersi, gruczołu krokowego), jak i z hodowli komórkowych. Badania laboratorium Coffeya [117] objęły grupę 21 chorych dotkniętych postępującymi zmianami nowotworowymi w obrębie gruczołu krokowego. Wspomniani autorzy, mający duże doświadczenie w zakresie badań białek matriks jądrowej gruczołu krokowego szczura, [52, 53], wydzielili matriks jądrową z gruczołu prawidłowego, jak również z jego fragmentów objętych łagodną hiperplazją (ang. *Benign Prostatic Hyperplasia*; BPH) oraz gruczolakoraka tego narządu. Wysokorozdzielczą elektroforezą dwuwymiarową białek matriks jądrowej z powyższego materiału ujawniono ok. 150 plam, z których większość reprezentowała wspólne dla tych trzech tkanek składniki. W tym „gąszczu” różnorodnych białek 14 komponentów wykazało odrębność molekularną. Ich wnikliwa analiza wskazała na ciekawą zależność. Wśród wymienionej liczby białek specyficznych tylko trzy (oznakowane NP) występowały wyłącznie w tkance prawidłowej (tab. 3). W gruczole, który uległ nieprawidłowemu przerostowi, lecz jeszcze nie mającemu znamion złośliwego nowotworu, pewne polipeptydy matriks były obecne zarówno w preparatach wydzielonych z gruczołu prawidłowego (opisane w tab. 3 symbolem NPB), jak i zmienionego procesem nowotworowym (oznakowane w tab. 3 symbolem BPC). Tylko jedno białko matriks jądrowej – PC-1 o m. cz. 56 kDa i pI 6,58 – było wyłącznym składnikiem nowotworu gruczołu krokowego i występowało w 100% badanych przypadków. To właśnie białko może kandydować do funkcji znacznika procesu nowotworowego w

TABELA 3. Białka matriks jądrowej prawidłowego gruczołu krokowego człowieka, gruczołu krokowego z łagodną hiperplazją (BPH) bądź z gruczolakorakiem [117]; symbole odpowiadające określonym białkom wyjaśniono w tekście; n – liczba badanych przypadków

Białko	M. cz. [kDa]	pI	Gruczoł prawidłowy (n = 13)	BPH (n = 14)	Gruczolakorak (n = 14)
NPB-1	17	6,91	+	+	–
NPB-2	17	8,30	+	+	–
NPB-3	12	8,40	+	+	–
NPB-4	12	6,91	+	+	–
NPB-5	43	6,27	+	+	–
NPB-6	43	6,22	+	+	–
NPB-7	43	6,14	+	+	–
NP-1	12	7,50	+	–	–
NP-2	11,5	7,62	+	–	–
NP-3	11	8,30	+	–	–
BPC-1	42,5	5,80	–	+	+
BPC-2	42	5,73	–	+	+
BPC-3	41	5,64	–	+	+
PC-1	56	6,58	–	–	+

gruczole krokowym człowieka. Z przedstawionych wyników można wstępnie wnioskować, że zmiana fenotypu pewnych białek szkieletu jądrowego towarzyszy przejściu komórek prawidłowych w silnie proliferujące – niezłośliwe, a potem w nowotworowe.

W badaniach białek matriks jądrowej raka piersi i tkanki kontrolnej (u 10 kobiet) stwierdzono, obok specyficznych dla stanu nowotworowego składników tej struktury (opisywanych jako NMBC-W, X, Y i Z o m. cz./pI odpowiednio: 18/6,5; 62/5,3; 64/4,7 i 80/5,5) obecność 10 polipeptydów, które występowały zarówno w tkance prawidłowej, jak i zmienionej procesem nowotworowym [80]. Na uwagę zasługuje fakt, że w ludzkich komórkach nabłonkowych linii MCF-10, transfekowanych onkogenami *H-ras* lub *c-neu*, występują wspomniane uprzednio polipeptydy wspólne dla tkanki prawidłowej i nowotworowej, jak również białka specyficzne dla nowotworu: W, X, Y i Z oraz dla tkanki prawidłowej, tj. o m. cz./pI 24/6,2 i 26/6,4. Wydaje się, że komórki wspomnianej linii, aczkolwiek niezdolne do indukowania nowotworów u zwierząt doświadczalnych, mogą stanowić ogniwo pośrednie w procesie transformacji komórek prawidłowych w nowotworowe.

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko białkom matriks jądrowej komórek linii nowotworów szyjki macicy Ca-Ski i Me-180 zwróciło uwagę na uwalnianie z nich pewnych białek szkieletowych w postaci rozpuszczalnej. Przeciwciała te, oznakowane symbolami 302-22 i 107-7, rozpoznające odpowiednio polipeptydy o m. cz. 92 kDa oraz 150 i 110 kDa wspomnianych linii komórek nowotworowych wykazywały ponadto zdolność do reakcji krzyżowych z białkami uwalnianymi w chwili śmierci ze szkieletu jądrowego do płynu hodowlanego komórek nowotworów piersi, jajników czy płuc [103]. Prawdziwą niespodzianką okazało się stwierdzenie wysokiego odsetka pozytywnych reakcji krzyżowych tych przeciwciał z surowicami chorych na raka okrężnicy, płuc, jajników czy gruczołu krokowego.

Wydaje się, że kontynuacja badań nad poszukiwaniem i charakterystyką specyficznych białek szkieletu jądrowego komórek ludzkich, które weszły na drogę niekontrolowanego wzrostu nowotworowego, i produkcja przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciwko nim, znajdzie wkrótce zastosowanie w ujawnianiu i rejestracji wczesnych zmian towarzyszących różnym nowotworom i w planowaniu strategii ich leczenia.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALIQUÉ R, BASTOS R, SERRATOSA J, ENRICH C, JAMES P, PUJADES C, BACHS O. Increase in a 55 kDa keratin-like protein in the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. *Exptl Cell Res* 1990; **186**: 346–353.
- [2] ALTIERI F, MARAS B, EUFEMI M, FERRARO A, TURANO C. Purification of a 57 kDa nuclear matrix protein associated with thiol: protein-disulfide oxidoreductase and phospholipase C activities. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **194**: 992–1000.
- [3] ARIS JP, BLOBEL G. Identification and characterization of a yeast nucleolar protein that is similar to a rat liver nucleolar protein. *J Cell Biol* 1988; **107**: 17–31.

- [4] ARIS JP, BLOBEL G. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 931–935.
- [5] BAILER SM, EPPENBERGER HM, GRIFFITHS G, NIGG EA. Characterization of a 54 kDa protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1991; **114**: 389–400.
- [6] BALDUCCI E, EMANUELLI M, MAGNI G, RAFFAELLI N, RUGGIERI S, VITA A, NATALINI P. Nuclear matrix-associated NMN adenylyltransferase activity in human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 1275–1279.
- [7] BELGRADER P, DEY R, BEREZNEY R. Molecular cloning of matrin 3. *J Biol Chem* 1990; **266**: 9893–9899.
- [8] BENAVENTE R, KROHNE G, FRANKE WW. Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* 1985; **41**: 177–190.
- [9] BENAVENTE R, KROHNE G. Change of karyoskeleton during spermatogenesis of *Xenopus*: expression of lamin IV, a nuclear lamina protein specific for the male germ line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6176–6180.
- [10] BENAVENTE R. Postmitotic nuclear-reorganization events analyzed in living cells. *Chromosoma* 1991; **100**: 215–220.
- [11] BIBOR-HARDY V, LE MYRE A, SAKR F, BERNARD M. Expression of nuclear matrix proteins in rat liver tissue. *Exptl Cell Res* 1991; **192**: 550–556.
- [12] BLASQUEZ VC, SPERRY AO, GARRARD WT. Elements that organize chromosomal loops in the interphase nucleus. [w:] DNA-protein interactions in transcription, Alan R. Liss, Inc, 1989; 273–286.
- [13] BURKE B. On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exptl Cell Res* 1990; **186**: 169–176.
- [14] CARMO-FONSECA M, KERN H, HURT EC. Human nucleoporin p62 and the essential yeast nuclear pore protein NSP1 show sequence homology and a similar domain organization. *Eur J Cell Biol* 1991; **55**: 15–30.
- [15] CARTER KC, BOWMAN D, CARRINGTON D, FOGARTY K, MC NEIL JA, FAY FS, LAWRENCE JB. A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science* 1993; **259**: 1330–1335.
- [16] CHAN PK, ALDRICH M, COOK RG, BUSCH H. Amino acids sequence of protein B23 phosphorylation site. *J Biol Chem* 1986; **261**: 1868–1872.
- [17] CHAN W-Y, LIN Q-R, BORJGIN J, BUSCH H, RENNERT OM, TEASE LA, CHAN R-K. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 1989; **28**: 1033–1039.
- [18] CHANG J-H, DUMBAR TS, OLSON MOJ. cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12824–12827.
- [19] CHANG J-H, OLSON MOJ. A single gene codes for two forms of rat nucleolar protein B23 m-RNA. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11732–11737.
- [20] CHELSKY D, OLSON J, KOSHLAND J. Cell cycle-dependent methyl esterification of lamin B. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4303–4309.
- [21] CHEN C-M, CHIANG S-Y, YEH N-H. Increased stability of nucleolin in proliferating cells by inhibition its self-cleaving activity. *J Biol Chem* 1991; **12**: 7754–7758.
- [22] CHERNOKHVVOSTOV VV, STEL' MASHCHUK VY, RAZINSV, GEOR-GIEV RP. DNA-protein complexes of the nuclear matrix: visualization and partial characterization of the protein component. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **162**: 175–183.
- [23] CHRISTENSEN ME, SCHELLING ME. Localization of a major nucleolar protein, B 36, in *Physarum polycephalum* using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1984; **99**: 11a.
- [24] CHUNG TDY, DRAKE FH, TAN KB, PER SR, CROOKE ST, MIRABELLI CK. Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9431–9435.
- [25] COMPTON DA, CLEVELAND DW. NuMA is required for the proper completion of mitosis. *J Cell Biol* 1993; **120**: 947–957.
- [26] CORDES V, WAIZENEGGER I, KROHNE G. Nuclear pore complex glycoprotein p62 of *Xenopus laevis* and mouse: cDNA cloning and identification of its glycosylated region. *Eur J Cell Biol* 1991; **55**: 31–47.
- [27] CORDES VC, KROHNE G. Sequential O-glycosylation of nuclear pore complex protein gp62 in vitro. *Eur J Cell Biol* 1993; **60**: 185–195.
- [28] DAVIS LJ, FINK GR. The NUP1 gene encodes an essential component of the yeast nuclear pore complex. *Cell* 1990; **61**: 965–978.

- [29] D'ERME M, MALANGA MA, QUESADA P, FARAONE-MENUELLA MR, FARINA B, CAIAFA P. Tightly-bound form of poly-(ADP-ribose) polymerase in the higher order of chromatin organization. *Biochem Int* 1990; **20**: 887-895.
- [30] DESSEV GN, JOVCHEVA-DESSEV Ch, GOLDMAN RD. Lamin dimers. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12636-12641.
- [31] DINGWALL C, DILWORTH SM, BLACK SJ, KEARSEY SE, COX LS, LASKEY RA. Nucleoplasm cDNA reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localisation signals. *EMBO J* 1987; **6**: 69-74.
- [32] DI PRIMIO R, TRUBIANI O, BOLLUM FJ. Association between nuclear matrix and terminal transferase: an electron microscope immunocytochemical analysis. *Histochemistry* 1991; **96**: 59-64.
- [33] DRAKE FH, ZIMMERMAN JP, MCCABE FL, BARTUS HF, PER SR, SULLIVAN DM, ROSS WE, MATTERN MR, JOHNSON RK, CROOKE ST, MIRABELLI CK. Purification of topoisomerase II from Amsacrine-resistant P388 leukemia cells. *J Biol Chem* 1987; **262**: 16739-16747.
- [34] DRAKE FH, HOFMANN GA, BARTUS HF, MATTERN MR, CROOKE ST, MIRABELLI CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. *Biochemistry* 1989; **28**: 8154-8160.
- [35] 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.
- [36] EARNSHAW WC, HONDA BM, LASKEY RA, THOMAS JO. Assembly of nucleosomes: the reaction involving *X. laevis* nucleoplasm. *Cell* 1980; **21**: 373-383.
- [37] EGGERT M, RADOMSKI N, LINDER D, TRIPIER D, TRAUB P, JOST E. Identification of novel phosphorylation sites in murine A-type lamins. *Eur J Biochem* 1993; **92**: 659-671.
- [38] FERNANDES DJ, DANKS MK, BECK WT. Decreased nuclear matrix DNA topoisomerase II in human leukemia cells resistant to V26 and m-AMSA. *Biochemistry* 1990; **29**: 4235-4241.
- [39] FERRARO A, EUFEMI M, CERVONI L, MARINETTI R, TURANO C. Glycosylated forms of nuclear lamins. *FEBS Lett* 1989; **257**: 241-246.
- [40] FERRARO A, GRANDI P, EUFEMI M, ALTIERI F, TURANO C. Crosslinking of nuclear proteins to DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum in intact cells. *FEBS Lett* 1992; **307**: 383-385.
- [41] FEUERSTEIN N, CHAN PK, MOND JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis as the nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 1987; **5**: 10608-10612.
- [42] FEUERSTEIN N, CHAN PK, MOND JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 1988; **263**: 10608-10612.
- [43] 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.
- [44] FIELDS AP, KAUFMANN SH, SHAPER JH. Analysis of the internal nuclear matrix. *Exptl Cell Res* 1986; **164**: 139-153.
- [45] FILSON AJ, LEWIS A, BLOBEL G, FISHER PA. Monoclonal antibodies prepared against the major *Drosophila* nuclear matrix-pore complex-lamina glycoprotein bind specifically to the nuclear envelope *in situ*. *J Biol Chem* 1985; **260**: 3164-3172.
- [46] FRANKE WW, SCHEER U, KROHNE G, JARASCH E-D. The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J Cell Biol* 1981; **91**: 39-50.
- [47] FRANKE WW, KLEINSCHMIDT JA, SPRING H, KROHNE G, GRUND Ch, TRENDELENBURG MF, STOEHR M, SCHEER U. A nucleolar skeleton of protein filaments demonstrated in amplified nucleoli of *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 1981; **90**: 289-299.
- [48] FREDERICK SE, MANGAN ME, CAREY JB, GRUBER PJ. Intermediate filament antigens of 60 and 65 kDa in the nuclear matrix of plants: their detection and localization. *Exptl Cell Res* 1992; **199**: 213-222.
- [49] FREEMAN JW, BUSCH RK, GYORKEY F, GYORKEY P, ROSS BE, BUSCH H. Identification and characterization of a human proliferation-associated nucleolar antigen with a molecular weight of 120,000 expressed in early G1 phase. *Cancer Res* 1988; **48**: 1244-1251.
- [50] FREEMAN JW, MCGRATH P, BONDADA V, SELLIAN N, OWNBY H, MALONEY T, BUSCH RK, BUSCH H. Prognostic significance of proliferation associated nucleolar antigen p120 in human breast carcinoma. *Cancer Res* 1991; **51**: 1973-1978.
- [51] GERACE L, BLOBEL G. Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1982; vol. XLVI, 967-978.
- [52] GETZENBERG RH, COFFEY DS. Tissue specificity of the hormonal response in sex accessory tissues is associated with nuclear matrix protein patterns. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 1336-1342.

- [53] GETZENBERG RH, PIANTA KJ, HUANG EY, COFFEY DS. Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate. *Cancer Res* 1991; **51**: 6514–6520.
- [54] GLASS JR, GERACE L. Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1047–1057.
- [55] GOLDMAN AE, MOIR RD, MONTAG-LOWY M, STEWART M, GOLDMAN RD. Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1992; **119**: 725–735.
- [56] GORCZYCA W, BRUNO S, MELAMED MR, DARZYKIEWICZ Z. Cell-cycle related expression of p120 nucleolar antigen in normal human lymphocytes and in cells of HL60 and MOLT-4 leukemic lines: effects of methotrexate, camptothecin and teniposide. *Cancer Res* 1992; **52**: 3491–3494.
- [57] GOUELI SA, AHMED K. Nuclear matrix as acceptor cAMP-binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; **109**: 1083–1088.
- [58] HADJOLOVA KV, MARTINOVA YS. An immunochemical study of the proliferating cell nuclear matrix antigen p125/6,5 during rat spermatogenesis. *J Cell Sci* 1989; **93**: 173–177.
- [59] HAKES DJ, BEREZNEY R. Molecular cloning of matrix F/G: a DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **88**: 6186–6190.
- [60] HAKES DJ, BEREZNEY R. DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 11131–11140.
- [61] HAREL A, ZLOTKIN E, NAINUDEL-EPSTEYN S, FEINSTEIN N, FISHER PA, GRUENBAUM Y. Persistence of major nuclear envelope antigens in an envelope-like structure during mitosis in *Drosophila melanogaster* embryos. *J Cell Sci* 1989; **94**: 463–470.
- [62] HARRIS SG, SMITH HC. SnRNP core protein enrichment in the nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **152**: 1383–1387.
- [63] HENDZEL MJ, DELCUVE GP, DAVIE JR. Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix. *J Biol Chem* 1991; **266**: 21936–21942.
- [64] HINSHAW JE, CARRAGHER BO, MILLIGAN RA. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 1992; **69**: 1133–1141.
- [65] HOCEVAR BA, BURNS DJ, FIELDS AP. Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7545–7552.
- [66] HOZAK P, HASSAN AB, JACKSON DA, COOK PR. Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* 1993; **73**: 361–373.
- [67] HČGER TH, KROHNE G, FRANKE WW. Amino acid sequence and molecular characterization of murine lamin B as deduced from cDNA clones. *Eur J Cell Biol* 1988; **47**: 283–290.
- [68] HČGER TH, KROHNE G, KLEINSCHMIDT JA. Interaction of *Xenopus* lamins A and LII with chromatin in vitro mediated by a sequence element in the carboxyterminal domain. *Exptl Cell Res* 1991; **197**: 280–289.
- [69] HČGER TH, GRUND CH, FRANKE WT, KROHNE G. Immunolocalization of lamins in the thick nuclear lamina of human synovial cells. *Eur J Cell Biol* 1991; **54**: 150–156.
- [70] HURT EC. A novel nucleoskeletal protein located at the nuclear periphery is required for the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1988; **7**: 4322–4334.
- [71] ISOMURA T, TAMIYA-KOIZUMI K, SUZUKI M, YOSHIDA S, TANIGUCHI M, MATSUYAMA M, ISHIGAKI T, SAKUMA S, TAKAHASHI M. RFP is a DNA binding protein associated with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 5305–5310.
- [72] IVANCHENKO M, AVRAMOVA Z. Interaction of MAR-sequences with nuclear matrix proteins. *J Cell Biochem* 1992; **50**: 190–200.
- [73] JANSEN VRP, HURT EC, KERN H, LEHTONEN H, CARMO-FONSECA M, LAPEYRE B, TOLLERVEY D. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol* 1991; **113**: 715–729.
- [74] JORDAN EG. Nucleolar nomenclature. *J Cell Sci* 1984; **67**: 217–220.
- [75] KALLAJOKI M, WEBER K, OSBORN M. A 210 kDa nuclear matrix protein is a functional part of the mitotic spindle; a microinjection study using SPN monoclonal antibodies. *EMBO J* 1991; **10**: 3351–3362.
- [76] KALLAJOKI M, HARBORTH J, WEBER K, OSBORN M. Microinjection of a monoclonal antibody against SPN antigen, non identified by peptide sequences as the NuMA protein, induces micronuclei in PtK2 cells. *J Cell Sci* 1993; **104**: 139–150.
- [77] KASAHARA K, CHIDA K, TSUNENAGA M, KOHNO Y, IKUTA T, KUROKI T. Identification of lamin B2 as a substrate of protein kinase C in BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20018–20023.
- [78] 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.

- [79] KAUFMANN SH, BRUNET G, TALBOT B, LAMARR B, DUMAS C, SHAPER JH, POIRIER G. Association of poly (ADP-ribose) polymerase with the nuclear matrix: the role of intramolecular disulfide bond formation, RNA retention, and cell type. *Exptl Cell Res* 1991; **192**: 524–535.
- [80] KHANUJA PS, LEHR JE, SOULE HD, GEHANI SK, NOTO AC, CHOUDHURY S, CHEN R, PIANTA KJ. Nuclear matrix proteins in normal and breast cancer cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 3394–3398.
- [81] KILIAŃSKA Z. Budowa i biologiczna rola matriks jądrowej. *Post Biol Kom* 1989; **16**: 61–86.
- [82] KILIAŃSKA Z, DITULIO P, CHIU J-F. Hepatoma associated non-histone proteins are phosphoproteins preferentially localized in nuclear matrix. *Int J Bioch* 1990; **22**: 969–975.
- [83] KILIAŃSKA Z, KRAJEWSKA WM, XIE R, KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L, CHIU J-F. Hepatoma-associated nuclear matrix nonhistone proteins. *J Cell Bioch* 1991; **45**: 303–310.
- [84] KILIAŃSKA Z. Matriks jądrowa. I. Izolowanie, skład chemiczny i ultrastruktura. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 1–16.
- [85] KITA K, OMATA S, HORIGOME T. Purification and characterization of a nuclear pore glycoprotein complex containing p62. *J Biochem* 1993; **113**: 377–382.
- [86] KITTEN GT, NIGG EA. The CaaX motif is required for isoprenylation, carboxyl methylation, and nuclear membrane association of lamin B2. *J Cell Biol* 1991; **113**: 13–23.
- [87] KROHNE G, HÓGER T. Functional analysis of nuclear lamins by mutagenesis. [w:] *Biochemical and Structural Dynamics of the Cell Nucleus*, Academic Press Inc, 1990; 61–73.
- [88] KROHNE G, WEIZENEGGER I, HÓGER TH. The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2003–2011.
- [89] LAFOND RE, WOODCOCK CL. Status of the nucleolar matrix in mature and embryonic chick erythrocyte nuclei. *Exptl Cell Res* 1983; **147**: 31–39.
- [90] LANG S, LOIDL P. Identification of proteins immunologically related to vertebrate lamins in the nuclear matrix of the myxomycete *Physarum polycephalum*. *Eur J Cell Biol* 1993; **61**: 177–183.
- [91] LEBEL S, LAMPRON C, ROYAL A, RAYMOND Y. Lamins A and C appear during retinoic acid-induced differentiation of mouse embryonal carcinoma cells. *J Cell Biol* 1987; **105**: 1099–1104.
- [92] LIN L, FISHER PA. Immunoaffinity purification and functional characterization of interphase and meiotic *Drosophila* nuclear lamin isoforms. *J Biol Chem* 1990; **265**: 12596–12601.
- [93] LISCHWE MA, SMETANA K, OLSON MOJ, BUSCH H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar proteins. *Life Sci* 1979; **25**: 701–708.
- [94] LISCHWE MA, OCHS RL, REDDY R, COOK RG, YEOMAN LC, TAN EM, REICHLIN M, BUSCH H. Purification and partial characterization of a nucleolar scleroderma antigen (Mr = 34000; pI 8,5) rich in NG,NG-dimethylarginine. *J Biol Chem* 1985; **260**: 14304–14310.
- [95] LUDERUS MEE, DE GRAAF A, MATTIA E, DEN BLAAUWEN JL, GRANDE MA, DE JONG L, VAN DRIEL R. Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 1992; **70**: 949–959.
- [96] LÜSCHER B, BRIZUELA L, BEACH D, EISENMAN RN. A role for the p34^{cdc2} kinase and phosphatases in the regulation of phosphorylation and disassembly of lamin B2 during the cell cycle. *EMBO J* 1991; **10**: 865–875.
- [97] MARRIDOR G, NIGG EA. cDNA sequences of chicken nucleolin/C23 and NO38/B23 two major nucleolar proteins. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 1286.
- [98] MARRIDOR G, KREK W, NIGG EA. Structure and developmental expression of chicken nucleolin and NO38: coordinate expression of two abundant non-ribosomal nucleolar proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1049**: 126–133.
- [99] MASUDA K, TAKAHASHI S, NOMURA K, ARIMOTO M, INOUE M. Residual structure and constituent proteins of the peripheral framework of the cell nucleus in somatic embryos from *Daucus carota* L. *Planta* 1993; **191**: 532–540.
- [100] MEIER J, CAMPBELL KHS, FORD CC, STICK R, HUTCHISON CJ. The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 1991; **98**: 271–279.
- [101] METZGER DA, KORACH KS. Cell-free interaction of the estrogen receptor with mouse uterine nuclear matrix: evidence of saturability, specificity and resistance to KCl extraction. *Endocrinology* 1990; **126**: 2190–2195.
- [102] METZGER DA, CURTIS S, KORACH KS. Diethylstilbestrol metabolites and analogs: differential ligand effects of estrogen receptor interactions with nuclear matrix. *Endocrinology* 1991; **128**: 1785–1791.
- [103] MILLER TE, BEAUSANG LA, WINCHELL LF, LIDGARD GP. Detection of nuclear matrix proteins in serum from cancer patients. *Cancer Res* 1992; **52**: 442–447.
- [104] NAKAYASU H, UEDA K. Small nuclear RNA protein complex anchors on the actin filaments in bovine lymphocyte nuclear matrix. *Cell Struc Funct* 1984; **9**: 317–325.
- [105] NAKAYASU H, BEREZNEY R. Nuclear matrices: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10312–10316.

- [106] NEHRBASS U, KERN H, MUTVEI A, HORSTMANN H, MARSHALLSAY B, HURT EC. NSP1: a yeast nuclear envelope protein localized at the nuclear pores exerts its essential function by its carboxy-terminal domain. *Cell* 1990; **61**: 979–989.
- [107] NELSON HC, FINCH JT, LUISI BF, KLUG A. The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* 1987; **330**: 221–226.
- [108] NEWPORT JW, WILSON KL, DUNPHY WG. A lamin-independent pathway for nuclear envelope assembly. *J Cell Biol* 1990; **111**: 2247–2259.
- [109] NICKERSON JA, HIE 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 Inc 1990; 3–25.
- [110] OCHS RL, LISCHWE MA, SPOHN WH, BUSCH H. Fibrillarin a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 1985; **54**: 123–134.
- [111] OCHS RL, REILLY MT, FREEMAN JW, BUSCH H. Intr nucleolar localization of human proliferating cell nucleolar antigen p120. *Cancer Res* 1988; **48**: 6523–6529.
- [112] OCHS R, SMETANA K. Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nucleolar matrix. *Exptl Cell Res* 1991; **197**: 183–190.
- [113] OLSON MOJ, WALLACE MO, HERRERA AH, MARSHALL-CARLSON L, HUNT RC. Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* 1986; **25**: 484–491.
- [114] OTTAVIANO Y, GERACE L. Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol Chem* 1985; **260**: 624–632.
- [115] PADAN R, NAINUDEL-EPSTEYN S, GOITEIN R, FAINSOD A, GRUENBAUM Y. Isolation and characterization of the *Drosophila* nuclear envelope otefin cDNA. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7808–7813.
- [116] PARK MK, D'ONOFRIO M, WILLINGHAM MC, HANOVER JA. A monoclonal antibody against a family of nuclear pore proteins (nucleoporins): O-linked N-acetylglucosamine is part of the immunodeterminant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 6462–6466.
- [117] PARTIN AW, GETZENBERG RW, CARMICHAEL MJ, VINDIVICH D, YOO J, EPSTEIN JJ, COFFEY DS. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer Res* 1993; **53**: 744–746.
- [118] PAYRASTRE B, NIEVERS, BOONSTRA J, BRETON M, VERKLEIJ AJ, VAN BERGEN EN HENEGOU-WEN PMP. A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase and phospholipase C in the nuclear matrix. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5078–5084.
- [119] PECULIS BJ, GALL JG. Localization of the nucleolar protein NO38 in amphibians oocytes. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1–14.
- [120] PEDRAZA-REYS M, ALVAREZ-GONZALEZ R. Oligo (3'-deoxyADP-ribose) ation of the nuclear matrix lamins from rat liver utilizing 3'-deoxy NAD as a substrate. *FEBS Lett* 1990; **277**: 88–92.
- [121] PIENTA KJ, GETZENBERG RH, COFFEY DS. Cell structure and DNA organization. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, CRC Press Inc 1991; **1**: 355–385.
- [122] PRATIER RS, SCHATTEN G. Construction of the nuclear matrix at the transition from maternal to zygotic control of development in the mouse: an immunocytochemical study. *Mol Reprod Develop* 1992; **32**: 203–208.
- [123] PRENDERGAST GC, ZIFF EB. Mbh1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization in vivo. *EMBO J* 1991; **10**: 757–766.
- [124] PUJOL MJ, SORIANO M, ALIQUÉ R, CARAFOLI E, BACHS O. Effect of α -adrenergic blockers on calmodulin association with the nuclear matrix of rat liver cells during proliferative activation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18863–18865.
- [125] RAZINS SV, VASSETZKY YS, HANCOCK R. Nuclear matrix attachment regions and topoisomerase II binding and reaction sites in the vicinity of a chicken DNA replication origin. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **177**: 265–270.
- [126] REJMAN J, LANDERS J, GOLDBERGER A, MC CORMICK DJ, GOSSE B, SPELSBERG TC. Purification of a nuclear protein (Receptor Binding Factor - 1) associated with the chromatin acceptor sites for the avian oviduct progesterone receptor. *J Prot Chem* 1991; **10**: 651–667.
- [127] ROBERGE M, DAHMUS ME, BRADBURY EM. Chromosomal loop/nuclear matrix organization of transcriptionally active and inactive RNA polymerases in HeLa nuclei. *J Mol Biol* 1988; **201**: 545–555.
- [128] RZEPECKI R, BUŁAJ G, SZOPA J. Endonuclease tightly associated with plant nuclear matrix affected DNA synthesis in vitro. *J Plant Physiol* 1989; **134**: 364–369.
- [129] RZEPECKI R, SZMIDZIŃSKI R, BODE J, SZOPA J. The 65 kDa protein affected endonuclease tightly associated with plant nuclear matrix. *J Plant Physiol* 1992; **139**: 284–288.
- [130] SASAKI I, UEYAMA H, UEDA K. Characterization of protein kinases in the nuclear matrix of HL-60 cells. *J Shiga Univ Med Sci* 1990; **5**: 99–110.

- [131] SASAKI I, UHEYAMA H, UEDA K. Increase of 63 kDa protein kinase in the nuclear matrix of HL-60 cells during differentiation by retinoic acid. *J Nutr Sci Vitaminol* 1990; **36**: 1–10.
- [132] 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.
- [133] SCHNEIDER HR, ISSINGER O-G. Nucleolin (C23), a physiological substrate for casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 1390–1297.
- [134] SCHRIER W, REDDY R, BUSCH H. Identification of an antigenic protein recognized by anti-Sm autoantibody. *Cell Biol Int Rep* 1982; **6**: 925–932.
- [135] SCHUHARD M, SUBRAMANIAM M, RUESINK T, SPELSBERG TC. Nuclear-matrix localization and specific matrix DNA binding by receptor binding factor I of the avian oviduct progesterone receptor. *Biochemistry* 1991; **30**: 9516–9522.
- [136] SENIOR A, GERACE L. Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1988; **107**: 202–2036.
- [137] SHIOMI Y, POWERS J, BOLLA RJ, VAN NGUYEN T, SCHLESSINGER D. Proteins and RNA in mouse L cell core nucleoli and nuclear matrix. *Biochemistry* 1986; **25**: 5745–5751.
- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] STARR CM, HANOVER JA. Glycosylation of nuclear pore protein p62. *J Biol Chem* 1990; **265**: 6868–6873.
- [141] STEINERT PW. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol* 1993; **100**: 729–734.
- [142] STEPHANOVA 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**: 287–295.
- [143] STUURMAN N, VAN DRIEL R, DE JONG L, MEIJNE AML, VAN RENSWOUDE J. The protein composition of the nuclear matrix of murine P19 embryonal carcinoma cells is differentiation-stage dependent. *Exptl Cell Res* 1989; **180**: 460–466.
- [144] STUURMAN N, MEIJNE AML, 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.
- [145] SUKEGAWA J, BLOBEL G. A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm. *Cell* 1993; **72**: 29–38.
- [146] SWEDLOW JR, SEDAT JW, AGARD DA. Multiple chromosomal populations of topoisomerase II detected *in vivo* by time-lapse, three-dimensional wide-field microscopy. *Cell* 1993; **73**: 97–108.
- [147] TAMIYA-KOIZUMI K, UMEKAWA H, YOSHIDA S, ISHIIHARA H, KOJIMA K. A novel phospholipase A2 associated with nuclear matrix: stimulation of the activity and modulation of the Ca²⁺ dependency by polyphosphoinositides. *Biochim Biophys Acta* 1989; **1002**: 182–188.
- [148] TODOROV IT, PHILIPOVA RN, JOSWIG G, WERNER D, FRANS CS, REMAEKERS FCS. Detection of the 125 kDa nuclear protein mitotin in centrosomes, the poles of the mitotic spindle, and the midbody. *Exptl Cell Res* 1992; **199**: 398–401.
- [149] TRAVIS J. Looking for cancer in the nuclear matrix proteins. *Science* 1993; **259**: 1258.
- [150] 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.
- [151] TUBO RA, BEREZNEY R. Nuclear matrix - bound DNA primase. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6637–6642.
- [152] UEYAMA H, NAKAYASU H, UEDA K. Nuclear actin and transport of RNA. *Cell Biol Int Rep* 1987; **11**: 671–677.
- [153] ULITZUR N, HAREL A, FEINSTEIN N, GRUENBAUM Y. Lamin activity is essential for nuclear envelope assembly in a *Drosophila* embryo cell-free extract. *J Cell Biol* 1992; **119**: 17–25.
- [154] VALKOV NJ, IVANOVA MJ, USCHEVA AA, KRACHIMAROV CP. Association of actin with DNA and nuclear matrix from Guerin ascites tumour cells. *Mol Cell Biochem* 1989; **87**: 47–56.
- [155] VAUGHN JP, DIJKWEL PÁ, MULLENDERS LHF, HAMLIN JL. Replication forks are associated with the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 1965–1969.
- [156] VERHEIJEN R, KUIJPERS H, VOOJIS P, VAN VENROOIJ W, REMAEKERS F. Distribution of the 70K U1 RNA - associated protein during interphase and mitosis. *J Cell Sci* 1986; **86**: 173–190.
- [157] VERHEIJEN R, KUIJPERS H, VOOJIS P, VAN VENRIJ W, REMAEKERS F. Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunochemical approach. *J Cell Sci* 1986; **80**: 103–122.

- [158] VERHEIJEN R, VENROOIJ WV, RAMAEKERS F. The nuclear matrix structure and composition. *J Cell Sci* 1988; **90**: 11–36.
- [159] VISHAWANATHA JK, JINDAL HK, DAVIS RG. The role of primer recognition proteins in DNA replication: association with nuclear matrix in HeLa cells. *J Cell Sci* 1992; **101**: 25–34.
- [160] VON KRIES JP, BUHRMESTER H, STRATLING WH. A matrix scaffold attachment region binding protein: identification, purification and mode of binding. *Cell* 1991; **64**: 123–135.
- [161] WENTE SR, ROUT MP, BLOBEL G. A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol* 1992; **119**: 70–723.
- [162] WĘSIERSKA-GĄDEK I, SAUERMANN G. Modification of nuclear matrix proteins by ADP-ribosylation. *Eur J Biochem* 1985; **153**: 421–428.
- [163] WILSON KL, NEWPORT J. A trypsin-sensitive receptor on membrane vesicles is required for nuclear envelope formation in vitro. *J Cell Biol* 1988; **107**: 57–68.
- [164] WOLDA S, GLOMSET JA. Evidence for modification of lamin B by a product of mevalonic acid. *J Biol Chem* 1988; **263**: 599–600.
- [165] WORMAN HJ, YUAN J, BLOBEL G, GEORGATOS SD. A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8520–8534.
- [166] WOZNIAK RW, BARTNIK E, BLOBEL G. Primary structure of an integral membrane glycoprotein of the nuclear pore. *J Cell Biol* 1989; **108**: 2083–2092.
- [167] XING Y, LAWRENCE JB. Preservation of specific RNA distribution within the chromatin-depleted nuclear substructure demonstrated by in situ hybridization coupled with biochemical fractionation. *J Cell Biol* 1991; **112**: 1055–1063.
- [168] XING Y, JOHNSON CV, DOBNER PR, LAWRENCE JB. Higher level organisation of individual gene transcription and RNA splicing. *Science* 1993 II 26; **259**: 1326–1330.
- [169] YAMAMOTO K, VČLKL A, HASHIMOTO T, FAHIMI HG. Catalase in guinea pig hepatocytes is localized in cytoplasm, nuclear matrix and peroxisomes. *Eur J Cell Biol* 1988; **46**: 129–135.
- [170] YUAN J, SIMOS G, BLOBEL G, GEORGATOS SD. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9211–9215.
- [171] ZBARSKY IB, KUZMINA SN, BULDYAEVA TV, BAZARNOVA TM. High molecular weight proteins of tumor nuclear matrix. [w:] Nuclear structure and function, JR Harris, Zbarsky IB, Plenum Press, New York 1990; 355–359.
- [172] ZBOREK A, KRZYŻOWSKA-GRUCA S, GRUCA S. Nuclear fraction enriched in interchromatin granules. *Cell Biol Int Rep* 1990; **14**: 79–88.
- [173] ZERLAUTH G, WĘSIERSKA-GĄDEK I, SAUERMANG. Fibronectin observed in the nuclear matrix of HeLa tumour cells. *J Cell Sci* 1988; **89**: 415–421.
- [174] ZINI N, MARTELLI AM, SABATELLI P, SANTI S, NEGRI C, ASTALDI RICOTTI GCB, MARALDI NM. The 180-kDa isoform of topoisomerase II is localized in the nucleolus and belongs to the structural elements of the nucleolar remnant. *Exptl Cell Res* 1992; **200**: 460–466.

Otrzymano: 14.03.1994 r.

Przyjęto: 24.03.1994 r.

Adres autorów: Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii UŁ
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

OOCYT I PRZEDIMPLANTACYJNY ZARODEK LUDZKI

OOCYTE AND PREIMPLANTATION HUMAN EMBRYO

ANNA NIEMIERKO

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: W pracy dokonano przeglądu najnowszych doniesień dotyczących oocytu i przedimplantacyjnego zarodka ludzkiego. W kolejnych podrozdziałach omówiono morfologię oocytu, receptory zapłodnienia osłony przejrzystej, możliwości aktywacji partenogenetycznej oocytu, mechanizmy powstawania i nowoczesne metody oceny aberracji chromosomowych. Przedstawiono również badania dotyczące transkrypcji genomu oocytu i genomu przedimplantacyjnego zarodka ludzkiego.

Słowa kluczowe: oocyt ludzki, partenogeneza, przedimplantacyjny zarodek ludzki, aberracje chromosomowe, transkrypcja genomu oocytu i zygoty.

Summary: This article is a review of topic knowledge about egg and preimplantation human embryo. Succeeding sections are considering following subjects: morphology of egg, zona pellucida receptors involved in fertilization, parthenogenetical activation of human eggs and new methods assesment of chromosomal aberration and also transcription of egg and zygote genoms.

Key words: Oocyte and preimplantation human embryo, parthenogenesis, chromosomal aberration, transcription of egg and zygote genoms.

MORFOLOGIA OOCYTU, ZAPŁODNIENIE, ROZWÓJ PRZEDJĄDRZY

Oocyt ludzki jest owulowany w stadium metafazy II podziału dojrzewania wraz z I ciałkiem kierunkowym, które powstaje po pierwszym podziale dojrzewania odbytym przed owulacją.

Wrzeciona I i II podziału dojrzewania oocytu ludzkiego są acentriolarne, a biegunami wrzeciona organizującymi mikrotubule są zgrupowania osmofilnego materiału pericentriolarnego [44, 49].

Owulowany oocyt ludzki, którego średnica wynosi 140 μm , otacza 10 μm osłona przejrzysta oraz 5–6 warstw komórek pęcherzykowych liczących 16–20 tysięcy komórek, tworzących wieniec promienisty [22,38]. Osłona przejrzysta oocytu pośrednicząca w zapłodnieniu i chroniąca zarodek przez okres przedimplantacyjny jest trójwymiarową siecią utworzoną z włókien [19]. W oocytach 48 godzin po owulacji grubość osłony ulega podwojeniu, co jest wynikiem zmiany struktury. W oocytach atretycznych lub długo hodowanych *in vitro* osłona staje się gładka, pozbawiona oczek, co powoduje zmniejszenie powierzchni i dostępności receptorów, a w konsekwencji utratę zdolności wiązania plemników [38]. Okres zapłodnialności oocytu ludzkiego wyznaczany właściwościami osłony jest znacznie krótszy od jego przeżywalności i oceniany jest do 15–18 godzin po owulacji [8].

Szczegółowe badania dotyczące genetyki zapłodnienia u człowieka są ograniczone ilością i dostępem do materiału, stąd większość badań przeprowadzono na oocytach myszy. Opracowane metody z powodzeniem wykorzystano w badaniach własności i genetyki osłony przejrzystej oocytu ludzkiego.

Trzy glikoproteidy osłony przejrzystej oocytu myszy różniące się funkcją, wielkością i procentowym udziałem w masie osłony syntetyzowane są przez rosnący diktiotenowy oocyt [35]. Największą cząsteczką osłony mysiej jest ZP1 (200 kD), która pełni rolę łącznika pomiędzy ZP2 i ZP3 i stanowi 10% jej masy. ZP2 (140 kD) stanowi 65% masy osłony i ulega modyfikacji biochemicznej pod wpływem peroksydaz zawartych w ziarnach korowych (patrz dalej). ZP3 (85 kD) stanowi 25% masy osłony mysiej i jest receptorem plemnika. Część cukrowa receptora inicjująca przyleganie plemnika do osłony oocytu i reakcję akrosomową ma końcówkę N-acetyloglukozaminy, którą wiąże się z galaktozylotransferazą błony komórkowej plemnika. Właściwym receptorem jest część białkowa ZP3, którą stanowi białko p44 łączące się z ligandem plemnika, białkiem p95, zlokalizowanym w rejonie postakrosomalnym główki plemnika. ZP3 gwarantuje specyficzność gatunkową zapłodnienia [17, 31, 58].

Osłona przejrzysta oocytu ludzkiego zbudowana jest z trzech glikoproteidów: ZP1(90–110 kD), ZP2(64–76 kD) i ZP3(57–73 kD) syntetyzowanych przez oocyt [47]. Podczas zapłodnienia oocytu ludzkiego modyfikacji ulega glikoproteid ZP1 [48].

Transkrypty glikoprotein ZP2 i ZP3 wykrywane są już w 10 μm diktiotenowym oocycie myszy [14]. Geny syntetyzujące glikoproteidy osłony są aktywowane przez czynnik transkrypcyjny ZAP-1 (*zona gene activating protein-1*) [35]. Gen kodujący mysz ZP2 jest pojedynczą kopią zlokalizowaną na chromosomie 7. Gen składa się z 18 eksonów i 17 intronów, a jego produkt jest białkiem zbudowanym z 745 aminokwasów. Ludzki gen ZP2 składa się z 19 eksonów kodujących białko ze 713 aminokwasów. Gen receptora ZP3 zlokalizowany na chromosomie 5 u myszy liczy tak jak ludzki 8 eksonów. Gen ZP3 mysz i ludzki kodują białko receptorów złożone z 424 aminokwasów wykazujących 67% homologii [14].

Obecnie trwają badania nad osłonami przejrzystymi oocytów zwierząt laboratoryjnych i podejmowane są próby uzyskania myszy transgenicznych z ekspresją ludzkich genów osłony. Wiąże się z tym nadzieje na poznanie genetycznych defektów osłony przejrzystej i jej receptorów, które są przypuszczalną przyczyną nieprawidłowości interakcji dojrzewającego oocytu z komórkami pęcherzykowymi, a w konsekwencji niepłodności.

Modyfikacja osłony przejrzystej, zwana też reakcją osłony, stanowi zabezpieczenie przed polispermia. Wywołana jest przez enzymatyczną zawartość ziaren korowych uwalnianych w drodze egzocytozy wywołanej mobilizacją i oscylacją wewnątrzkomórkowego wapnia po wnikięciu plemnika do cytoplazmy oocytu [36, 45].

Ziarna korowe oocytu uczestniczące w reakcji korowej powstają w kompleksie Golgiego podczas diplotenu profazy mejotycznej. Stadium diktiotenu profazy mejotycznej charakteryzujące się większym stopniem dekondensacji chromatyny niż w diplotenie występuje tylko u gryzoni. Liczne badania ultrastrukturalne oocytu ludzkiego wykazały istnienie dwóch populacji ziaren korowych. Ziarna typu pierwszego, określane jako G1, są jednorodnie elektronowo gęste, mają średnicę 350 nm i leżą bliżej błony oocytu. Ziarna G2 o średnicy 450 nm cechujące się granularną budową, są syntetyzowane podczas przedowulacyjnego wzrostu oocytu, leżą głębiej w warstwie korowej cytoplazmy, skąd przesuwają się do powierzchni w oocycie dojrzałym [27, 45].

Z nieznanых powodów w jajnikowym oocycie ludzkim może dojść do przedwczesnej reakcji korowej i reakcji osłony, co sugerowane jest jako jedna z przyczyn niepłodności [42]. Ziarna korowe ulegają przemieszczeniu w głąb cytoplazmy w oocytach 24–30 godzin po owulacji, jak również w oocytach zamrażanych w celu dłuższego przechowania (bankowanych) poddanych działaniu krioprotektorów (DMSO, propandiol). W takich oocytach dochodzi do zapłodnienia polispermicznego, co sprawiło zaniechanie stosowania metody bankowania przez zamrażanie oocytów na korzyść bankowania zygot lepiej znoszących procedury tej techniki [7, 46, 58].

Osłona przejrzysta poprzez receptory pośredniczy w zapłodnieniu i często dysfunkcja osłony jest jedną z przyczyn niepłodności. Część oocytów nie zapłodnialnych *in vitro* po zdjęciu osłony i reinseminacji, czyli ponownym zapłodnieniu, rozwija się do stadium blastocysty. Ta konkluzja zainspirowała do opracowania metod zapłodnienia polegających na mikroiniekcji plemnika pod osłonę lub bezpośrednio do cytoplazmy oocytu zwanej metodą ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*). Obecnie jest to najskuteczniejszy sposób postępowania w niepłodności. Około 49–39% zygot uzyskanych tą metodą implantuje się dając klinicznie potwierdzone ciążę, z których w ponad 30% stanowią ciążę donoszone. Metoda ta efektywnością ponad dwukrotnie przewyższa dotąd stosowane [56].

Wnikający do oocytu plemnik oprócz reakcji korowej i reakcji osłony powoduje dokończenie II podziału dojrzewania i wyrzucenie II ciała kierunkowego, po czym chromosomy żeńskie i jądro plemnika zaczynają tworzyć przedjądrze. Przedjądrze

żeńskie powstaje w wyniku dekonduensacji chromosomów w telofazie. Powstanie przedjądrza męskiego jest skomplikowanym procesem polegającym na wymianie protamin jądra plemnika na białka histonowe [61], a następnie na dekonduensacji chromatyny w przedjądrze [52]. Dekonduensacja chromatyny plemnika w przedjądrze, jak również wprowadzenie komórki jajowej w cykl komórkowy (dokończenie II podziału dojrzewania) odbywa się przy udziale produktów protoonkogenów plemnika. Zapładniający plemnik wnosi transkrypty protoonkogenów transkrybowanych podczas mejozy, których nie ma komórka jajowa. Transkrypty tych protoonkogenów mogą być czynnikami transkrypcji, białkami G, kinazami cytoplazmatycznymi lub jądroowymi lub receptorami z aktywnością kinazy tyrozyny [41]. Poza transkryptem protoonkogenu *c-mos* transkrybowanym również przez oocyt, który po zapłodnieniu jest zastępowany przez transkrypt męski *c-mos*, plemnik wnosi nieobecne w oocyocie transkrypty protoonkogenów *int-1*, *pin-1*, *N-ras* [54].

Na podstawie badań ultrastrukturalnych w rozwoju przedjądrza męskiego wyróżnia się cztery stadia [52]. Stadium I rozpoczyna się zanikiem otoczki jądrowej plemnika i wstępną dekonduensacją chromatyny z zachowaniem kształtu główki plemnika. Dekonduensująca chromatyna jest jednorodnie fibrylarno-granularna, z biegunami jądra plemnika związane są duże wakuole.

W stadium II rozpulchniona, zdekonduensowana chromatyna plemnika osiąga wymiary przedjądrza, lecz jeszcze nie ma własnej otoczki jądrowej. Otoczka jądrowa pojawia się w stadium III, w którym również pojawiają się niedojrzałe, niesyntetyzujące jąderka, zwane prekursorami jąderka. Kryterium stadium IV jest pojawienie się jąderka z trzyczęściową budową, typową dla dojrzałego syntetyzującego jąderka.

Powstanie przedjądrza męskiego jest wynikiem dwóch różnych procesów: przebudowy organizacji chromatyny w stadiach I–III i rozwoju przedjądrza w stadiach II–IV.

Badania dotyczące tempa rozwoju przedjądrzy, ultrastruktury oraz syntezy RNA i DNA przeprowadzono na oocytach, które nie uległy zapłodnieniu *in vitro* do 18 godziny po inseminacji, a które po pozbawieniu osłony przejrzystej reinseminowano *in vitro* [50]. Inkorporację H3-adenozyny przez przedjądrze męskie, świadcząca o syntezie RNA, stwierdzono w stadium III już w trzy godziny po inseminacji. Uważa się, że ta wczesna transkrypcja poprzedza właściwą nukleologenezę, odbywa się z rDNA i związana jest z tworzeniem białkowego zrębu przyszłego jąderka [50]. Równie wczesną aktywność transkrypcyjną przedjądrza męskiego stwierdzono w zygocie chomika i owcy [52].

Inkorporację H3-tymidyny wyznaczającą fazę S pierwszego cyklu komórkowego stwierdzono w stadium IV przedjądrza ok. 12 godziny po inseminacji [30].

Dokonując reinseminacji oocytów pozbawionych osłony przejrzystej, które były w stadium metafazy I i metafazy II, stwierdzono, że rozwój przedjądrza męskiego do stadium III może odbyć się w obu stadiach oocytu. Rozwój przedjądrza i podjęcie syntezy DNA następuje tylko w oocyocie w stadium metafazy II, które jest właściwym stadium dla zapłodnienia oocytu [53]. Rozwój przedjądrza męskiego kontrolowany

jest przez cytoplazmę oocytu, gdyż w polispermicznych oocytach tylko do 4 plemników przekształca się w syntetyzujące przedjądrza, o czym wydaje się decydować stosunek plazmojądrowy [53].

AKTYWACJA PARTENOGENETYCZNA OOCYTU LUDZKIEGO

Zdolność aktywacji partenogenetycznej oocytu ludzkiego *in vivo* jest intrygującym, ale nie rozwiązany problemem. *In vitro* oocyt ludzki trudno ulega aktywacji spontanicznej, jak i eksperymentalnej, co wyróżnia go wśród oocytów większości ssaków aktywowanych do rozwoju partenogenetycznego przez różne czynniki fizyczne i chemiczne [28]. Podczas zapłodnienia *in vitro* spontanicznej aktywacji ulega ok. 5% oocytów [6].

Nieskuteczne jako czynniki aktywacji partenogenetycznej oocytu ludzkiego okazały się czynniki działające na lub przez komponenty błony komórkowej, do których zaliczane są: hialuronidaza, szok termiczny niską temperaturą i szok osmotyczny aktywujące oocyty innych gatunków ssaków [1,6].

W eksperymentalnej indukcji partenogenetycznej czynniki, takie jak: jonofory wapnia i etanol powodujące uwalnianie wapnia wewnątrzkomórkowego, w większości prac opisane są jako mało efektywne dające 15% aktywacji [6], poza jedną pracą donoszącą o 60% aktywacji [57]. Przyczyną rozbieżności wyników jest prawdopodobnie różny stopień dojrzałości oocytów uzyskiwanych w drodze laparoskopii. Czas pojawiania się przedjądrzy w aktywowanych oocytach między 8 a 24 godziną przemawia za taką interpretacją. Opisane wcześniej zjawisko migracji ziaren korowych lub częściowej egzocytozy rozważane jest też jako przyczyna słabej odpowiedzi oocytu na czynniki uwalnijące jony wapnia.

Mało skutecznym aktywatorem oocytu ludzkiego okazał się też ester forbolu PMA działający na kinazę proteinową C [6], aktywujący blisko w 100% oocyt myszy [16].

Najskuteczniejszym czynnikiem aktywacji oocytów ludzkich okazał się inhibitor syntezy białek – puromycyna, przy której użyciu uzyskuje się 91% aktywacji [6]. Puromycyna i cykloheksimid w oocytach myszy, świni i krowy blokuje działanie czynnika cytostatycznego CSF, który zatrzymuje cykl komórkowy i utrzymuje chromatynę oocytu w stadium metafazy II do zapłodnienia. W skład CSF wchodzi białko p39 kinaza seryny i treoniny – produkt protoonkogeny *c-mos*. Kinaza ta fosforylując w oocycie wyłącznie cykliny B powoduje ich akumulację podczas fazy M cyklu mejozy [37, 39, 60].

Aktywowane partenogenetycznie oocyty ludzkie nie wyrzucają II ciała kierunkowego, co jest sporadycznym typem reakcji oocytów badanych gatunków ssaków na aktywację, a u myszy po zastosowaniu estru forbolu jedynym [16]. Powstawanie przedjądrzy po aktywacji puromycyną jest bardzo rozciągnięte w czasie i wynosi 45%

po 8 i 90% po 24 godzinach od aktywacji. Aktywowane oocyty ludzkie są zdolne do przejścia kilku podziałów bruzdkowania, lecz nie osiągają stadium blastocysty [6].

ABERRACJE CHROMOSOMOWE OOCYTÓW I ZARODKÓW PRZEDIMPLANTACYJNYCH

Aberracje chromosomowe powstają podczas gametogenezy, zapłodnienia oraz podczas rozwoju przedimplantacyjnego. Wśród niezapłodnionych oocytów w klinicznych próbach zapłodnienia *in vitro* stwierdza się do 10% hypohaploidów ($n-1$), 15% hyperhaploidów ($n+1$) oraz 6–8% niezredukowanych, czyli diploidalnych (dyzgenicznych) oocytów ($2n$), które nie przeszły I podziału dojrzewania i są potencjalnym źródłem dyzgenicznej triploidii [3,18,32,33].

Hyperhaploidalne oocyty są potencjalnymi trisomikami. Dokładna analiza hyperhaploidów wykazała, że dodatkowy "chromosom" jest pojedynczą chromatydą. Dotychczas przyjmowano, iż mechanizmem powstania trisomii u człowieka jest non-dysjunkcja biwalentów. Obecnie zgromadzone dane cytogenetyczne pozwalają przyjąć istnienie innego mechanizmu polegającego na przedwczesnym rozdziale chromatyd uniwalentu w anafazie I podziału dojrzewania. Pojedyncza chromatyda jest pasywnie poza wrzecionem przekazywana podczas II podziału dojrzewania, a jej pozostanie w zygocie powoduje trisomię [3].

W około 20% oocytów zapłodnionych *in vitro* stwierdza się blok metafazy II z jednoczesnym przedwczesnym wyróżnicowaniem się chromosomów plemnika, co jest przejawem niedojrzałości oocytu [3, 32, 33].

Nieprawidłowy kariotyp wykazuje 60% zygot z zapłodnienia *in vitro* [2]. Dominującymi typami anomalii chromosomowych są poliploidie (triploidia i tetraploidia) i trisomie [10, 29, 33, 34, 55]. Większość zygot poliploidalnych zostaje wyeliminowana na stadium przedjądrzy i pierwszego podziału bruzdkowania. Trzeciego dnia rozwoju (stadium moruli) procent zarodków z aberracjami spada do 30%, wśród których dominują trisomie chromosomów 13, 14, 15, 21 [1, 3]. Dane te obejmują również aberracje pochodzenia plemnikowego. W populacji plemników zdrowych mężczyzn ok. 1% plemników ma nadliczbowy chromosom autosomalny lub chromosom płciowy. Udział plemnika w trisomii chromosomów 13 i 18 ocenia się poniżej 10%, chromosomu 21 zaś ok. 20% [9].

Podczas zapłodnienia *in vitro* w 30% dochodzi do zapłodnień polispermicznych [4]. Większość polispermicznych zygot ludzkich zatrzymuje się na stadium przedjądrzy lub pierwszego podziału bruzdkowania [55]. W oocycie ludzkim centriola wniesiona przez plemnik po podwojeniu stanowi bieguny wrzeciona I podziału bruzdkowania [44]. Udział męskiej centrioli z nadliczbowego plemnika w podziałach bruzdkowania powoduje, że polispermiczne zygoty tworzą niefunkcjonujące, wielo-

biegunowe wrzeciona. Pewien wyjątek stanowią dispermiczne triploidy tworzące bipolarne wrzeciono z jednym biegunem z dwiema centriolami, dzielące zygotę na dwa blastomery [29, 55]. Triploidy pochodzenia dispermicznego, jak i dyzgenicznego osiągają stadium blastocysty i implantują się [4]. W przypadku utworzenia tripolarnego wrzeciona bruzdkowania, zygota dzieli się na trzy blastomery. Uważa się, że jest to mechanizm powstawania zarodków mozaikowych haploidalno-diploidalnych [34, 55].

Do poliploidyzacji genomu części komórek zarodka ludzkiego i powstania zarodków mozaikowych może dojść podczas bruzdkowania zygoty. Mechanizmem poliploidyzacji są zaburzenia cytokinezy kolejnych podziałów mogące doprowadzić komórkę do oktoploidii ($8n$) i dekaploidii ($10n$) [26]. Komórki poliploidalne częściej stwierdzane są w trofoblaście niż węzle zarodkowym blastocysty [10].

Częstość powstawania anomalii chromosomowych w zapłodnieniach *in vivo* i rozwoju przedimplantacyjnym nie jest znana. Aberracje chromosomowe stanowią w 20% przyczynę spontanicznych, wczesnych poronień klinicznie rozpoznanych ciąży. W 90% są to trisomie chromosomów 13,18,21, w 2% triploidia, resztę stanowią aberracje struktury chromosomów [9].

KRYTERIA I METODY OCENY KONSTITUCJI GENETYCZNEJ ZARODKA

Kryteriami stosowanymi do oceny żywych jednokomórkowych zygot są kryteria morfologiczne, którymi są liczba przedjądrzy i liczba ciałek kierunkowych świadczących o odbytych podziałach mejotycznych. Są one jednak ograniczone lub zawodne. Pierwsze ciało kierunkowe charakteryzuje się długą przeżywalnością, jego obecność stwierdza się w 76% oocytów w stadium metafazy II, w 10% oocytów degeneruje, a w 1% oocytów dzieli się na dwa i odtwarza interfazowe jądro, co jest cechą drugiego ciała kierunkowego [5].

Partenogenetycznie aktywowane oocyty ludzkie w 90% nie wyrzucają drugiego ciała kierunkowego, czyli są gynogenetycznymi diploidami. Oznacza to, że oba haploidalne zespoły chromosomów po II podziale dojrzewania pozostają w oocycie i odtwarzają jedno przedjądrze [6].

Liczba przedjądrzy i ciałek kierunkowych możliwa jest do oceny po odpadnięciu komórek pęcherzykowych ok. 12 godziny po inseminacji. Przedjądrza żeńskie i męskie zachowują autonomię do I podziału bruzdkowania, podczas którego tworzą wspólną płytkę metafazową. Niekiedy chromatyna męska i żeńska odtwarza jedno wspólne przedjądrze. Stosując w hybrydyzacji *in situ* sondę molekularną DYZ3 na specyficzną sekwencję DNA chromosomu Y stwierdzono, że 10% jedno przedjądrzowych oocytów zapłodnionych *in vitro* pochodzi z zapłodnienia [8].

Przedimplantacyjne zarodki ludzkie diagnozowane są klasycznymi metodami cytogenetycznymi opartymi na analizie chromosomów oraz metodami inżynierii genetycznej, które pozwalają na analizę chromatyny interfazowej. Pobranie z 8-blastomerowego zarodka jednej lub dwóch komórek nie upośledza jego rozwoju do stadium blastocysty. Blastocysty uzyskane z zarodków zbudowanych z 7 i 6 blastomerów mają mniejszą licznę komórek zachowując proporcje liczby komórek wężła zarodkowego do trofoblastu [25]. DNA komórek pobranych w biopsji po jego zamplifikowaniu może być hybrydyzowane z sondą molekularną dla specyficznych sekwencji centromeru chromosomów Y [6,10], X [10], chromosomu 18 [10] lub sondami primerów genów białek z palcem cynkowym, Zfy i Zfx wykazujących dymorfizm płciowy [23]. Wymienione metody pozwalają określić płeć i liczbę chromosomów płciowych w komórkach interfazowych. Zjawiska mozaikowości (miksoploidii), czyli występowanie obok prawidłowych komórek diploidalnych komórek o ploidii będącej wielokrotnością diploidii, jest poważnym ograniczeniem opisanych metod, ponieważ analiza pojedynczych komórek nie jest reprezentatywna dla całego zarodka.

ROZWÓJ PRZEDIMPLANTACYJNY I AKTYWNOŚĆ GENOMU ZARODKA LUDZKIEGO

Około 6 godzin po inseminacji *in vitro* stwierdza się obecność przedjądrzy. Pierwszy cykl komórkowy zarodka ludzkiego trwa ok. 20 godzin. Faza S tego cyklu trwa 4–6 godzin między 9 a 13 godziną po inseminacji [7]. W zygotach triploidalnych synteza DNA podczas I cyklu komórkowego odbywa się w podobnym tempie i czasie jak w diploidalnych, lecz cykl komórkowy jest dłuższy o 4–5 godzin poprzez wydłużenie faz M i G2 [4].

Po 33–36 godzinach od inseminacji zygota jest zarodkiem 2-komórkowym, po 56 godzinach 4–8-komórkowym. Stadium moruli po kompakcji (po powstaniu połączeń międzykomórkowych między blastomerami) osiągane jest ok. 110 godzin po inseminacji, 10 godzin później pojawia się blastocysta zbudowana z wężła zarodkowego, trofoblastu i entodermy pierwotnej [10,20]. Blastocysta 5–6-dniowa zawiera ok. 100 komórek, w tym ok. 40 komórek trofoblastycznych, których liczba ulega podwojeniu 7 dnia rozwoju [24]. Blastocysta oswobodzająca się z osłony *in vitro* 14 dnia rozwoju liczy średnio 283 komórki [24].

Niezapłodniony oocyt ludzki cechuje długa przeżywalność mająca swe źródło w jego aktywności syntetycznej opartej na transkryptach genomu maczynego powstałych podczas profazy mejotycznej. Niezmienione morfologicznie niezapłodnione oocyty wypłukiwano do 96 godziny po owulacji z jajowodu. Niezapłodnione oocyty

ludzkie wypłukiwane z macicy w okresie 96–144 godzin po owulacji miały zmniejszoną średnicę cytoplazmy (85 μm) [38].

Niezapłodniony oocyt ludzki do 50 godziny po owulacji aktywnie syntetyzuje białko (53 pg/godz.) i przyswaja znakowaną metioninę [13, 22]. Komórki pęcherzykowe również syntetyzują specyficzne dla siebie białka, a głównym produktem ich syntezy jest p44. Oocyt myszy w analogicznym doświadczeniu ze znakowaną metioniną wykazuje redukcję poziomu syntezy o 24% po 24 godz. i do 8% po 48 godz. [22]. Powyższe doświadczenia sugerowały stabilności mRNA oocyty oraz sugerowały, iż genom zygoty ludzkiej uaktywnia się po 50 godz. Przypuszczenia te zostały potwierdzone badaniami z użyciem α -amanityny.

Transkrypcja genomu zarodka ludzkiego rozpoczyna się na stadium 4 i 8 komórek. Obecność l-amanityny blokującej transkrypcję nie wpływa na zapłodnienie i brzdakowanie do stadium 4-komórkowego oraz syntezę białek odbywających się z matczynego RNA. Natomiast zapobiega syntezie nowego rodzaju białek stwierdzanych u zarodków nie traktowanych amanityną [12]. Do trzeciego cyklu komórkowego jąderka nie inkorporują radioaktywnej urydyny [30].

W dwukomórkowym zarodku ludzkim wykryto mRNA gonadotropiny kosmówkowej, glikoproteiny, która jest syntetyzowana na stadium blastocysty, co jest wydarzeniem rozwojowym wyznaczanym przez czas liczony od inseminacji. Synteza HCG rozpoczyna się ok. 160 godzin po inseminacji *in vitro* [20, 59]. Ilość syntetyzowanego hormonu koreluje z liczbą komórek trofoblastycznych. Między 150 a 265 godziną po inseminacji blastocysta ludzka produkuje dziennie 1,5 IU/litr HCG [59]. Blastocysty uzyskane z nieprawidłowych zygot głównie poliploidalnych, syntetyzują HCG w tym samym czasie co prawidłowe [59]. Również w stadium blastocysty produkowany jest IGF II-insulinopodobny czynnik wzrostu [47]. Dla porównania u myszy na stadium dwukomórkowym kierowanie rozwojem przejmują genom zygoty. Pierwszymi białkami zygotycznymi u myszy są IGF II oraz białka 70 kD (HSP – *heat shock protein*) [11, 21, 40].

Większość badań przedstawionych w niniejszym artykule przeprowadzono w zagranicznych ośrodkach wykonujących zapłodnienie *in vitro*. Jednocześnie z poszukiwaniem najskuteczniejszych sposobów zapłodnienia pozaustrojowego i metod transplantacji zygot, pogłębiona została wiedza dotycząca gamet i wczesnego rozwoju zarodka ludzkiego.

Prawodawstwo większości państw zachodnich stanowi o ochronie prawnej prawidłowych genetycznie oocytów zapłodnionych *in vitro*. Ochroną prawną nie są objęte po upływie 24 godzin oocyty niezapłodnione, poliploidalne i zygoty o nieprawidłowym opóźnionym rozwoju, które mogą być wykorzystywane do badań naukowych. Nad przestrzeganiem prawa czuwają komisje etyczne. Niektóre z cytowanych badań nad zarodkami przedimplantacyjnymi pochodzą z okresu przed uregulowaniem prawnym.

LITERATURA

- [1] ABRAMCZUK J, LOPATA A. Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. *Hum Reprod* 1990; **5**: 578–581.
- [2] ANGELL RR, AITKEN RJ, VAN LOOK PFA, LUMSDEN MA, TEMPLETON AA. Chromosome abnormalities in human embryos after in vitro fertilization. *Nature* 1993; **303**: 336–338.
- [3] ANGELL RR, XIAN J, KEITH J. Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1047–1054.
- [4] BAŁAKIER H. Tripronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1892–1897.
- [5] BAŁAKIER H, CASPER RS. A morphologic study of unfertilized oocytes and abnormal embryos in human in vitro fertilization. *J in Vitro Fert Embryo Transfer* 1993; **8**: 73–79.
- [6] BAŁAKIER H, CASPER RF. Experimentally induced parthenogenetic activation of human oocytes. *Hum Reprod* 1993; **8**: 740–743.
- [7] BAŁAKIER H, MACLUSKY NJ, CASPAR RF. Characterization of first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993; **59**: 359–365.
- [8] BAŁAKIER H, SQUIRE J, CASPER RF. Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, cytogenetics and *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 1993; **8**: 402–408.
- [9] BANDRIF BF, GORDON LA. Human sperm cytogenetics and the one-cell zygote. *Banbury Report 34: Biology of Mammalian Germ Cell Mutagenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990; 183–194.
- [10] BENHALIFA M, JANNY L, VYE P, MALET P, BOUCHER D, MENEZO Y. Assessment of polyploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent *in situ* hybridization. *Hum Reprod* 1993; **8**: 895–902.
- [11] BENSUADE O, BABINET C, MORANGE M, JACOB F. Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature* 1983; **305**: 331–333.
- [12] BRAUDE P, BOLTON V, MOORE S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; **332**: 459–461.
- [13] CAPMANY G, BOLTON VN. Polypeptide profiles of human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; **11**: 1901–1905.
- [14] CHAMBERLIN ME, DEAN J. Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6014–600.
- [15] CLEGG KB, PIKO L. RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature* 1982; **295**: 342–344.
- [16] CUTHBERSON KSR, COBBOLD PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca^{2+} . *Nature* 1985; **316**: 541–542.
- [17] DEAN J. Biology of Mammalian Fertilization: Role of the zona pellucida. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1055–1059.
- [18] DELHANTY JAD, GRIFFIN DK, HANDYSIDE AH, HARPER J, ATKINSON GHG, PIETERS MHE, WINSTON RML. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridisation, (FISH). *Hum Molec Genet* 1993; **2**: 1183–1185.
- [19] FAMILIARI G, NOTTOLA SA, MICARA G, ARAGONA C, MOTTA PM. Is the sperm-binding capability of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human in vitro fertilization. *J in vitro Fertil Embryo Transfer* 1988; **5**: 134–143.
- [20] FISHEL SB, EDWARDS RG, EVANS CJ. Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro. *Science* 1984; **223**: 816–818.
- [21] FLACH G, JOHNSON MH, BRAUDE PR, TAYLOR RAS, BOLTON UN. The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J* 1982; **1**: 681–686.
- [22] GIFFORD DJ, FLEETHAM JA, MAHADEVAN MM, TAYLOR PJ, SCHULTZ GA. Protein synthesis in mature human oocytes. *Gamete Res* 1987; **18**: 97–107.
- [23] HARDY K. Preimplantation prevention of X-linked disease, reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis and amplified Zfx and Zfy. *Hum Reprod* 1993; **2**: 768–770.
- [24] HARDY K, HANDYSIDE AH, WINSTON RML. The human blastocyst: cell number and allocation during the late pre-implantation development in vitro. *Development* 1989; **107**: 597–604.
- [25] HARDY K, MARTIN KL, LESSE HJ, WINSTON RML, HANDYSIDE AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; **5**: 708–714.
- [26] HARDY K, WINSTON RML, HANDYSIDE AH. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro-failure cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 549–559.

- [27] HINDUJA IN, KUMAR A, KUMAR TCA. Ultrastructure of the cortex in human egg. *Hum Reprod* 1990; **5**:66–70.
- [28] KAUFMAN MH. Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies. *Cambridge University Press* 1983.
- [29] KOLA I, TROUNSON A, DAWSON G, ROGERS P. Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol Reprod* 1987; **37**: 395–401.
- [30] KOPECNY V. High-resolution autoradiographic studies of comparative nucleogenesis and genome reactivation during early embryogenesis in pig, man and cattle. *Reprod Nutr Dev* 1989; **29**: 589–600.
- [31] LEYTON L, SALING P. 95 kD sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 1989; **57**: 1123–1130.
- [32] MA S, KALUSEK DK, ZOUVES CH, YUEN BH, GOMEL V, MOON YS. Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize in vitro. *Fertil Steril* 1989; **51**: 992–997.
- [33] MACAS E, FLOERSHEIM Y, HOTZ E, IMTHURN B, KELLER PJ, WALT H. Abnormal chromosomal arrangements in human oocytes. *Hum Reprod* 1990; **5**: 703–707.
- [34] MACAS E, SUCHANEK E, GRIZEL JV, PUHARIC I, SIMUNIC V. Chromosomal preparations of human triploid zygotes and embryos fertilized in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1988; **29**: 299–304.
- [35] MILLAR SE, LADER ES, DEAN J. ZAP-1 DNA binding activity is first detected at onset of zona pellucida gene expression in embryonic mouse oocytes. *Devel Biol* 1993; **158**: 410–413.
- [36] MIYAZAKI S, SHIRAKAWA H, NAKADA K, HONDA Y. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Devel Biol* 1993; **158**: 62–78.
- [37] O'KEEFE SJ, KIESSLING AA, COOPER GM. The *c-mos* gene product is required for cyclin B accumulation during meiosis of mouse eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7869–7872.
- [38] ORTIZ ME, SALVATIERRA AM, LOPEZ J, FERNANDEZ E, CROXATTO HB. Postovulatory aging of human ova: I. Light microscopic observation. *Gamete Res* 1982; **6**: 11–17.
- [39] PAULES RS, BUCCIONE R, MOSCHEL RC, VANDE WOUDE GF, EPIGG JJ. Mouse *mos* protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; **86**: 5395–5399.
- [40] PETZOLDT U. Survival of maternal mRNA in anucleate and unfertilized mouse eggs. *Eur J Cell Biol* 1990; **52**: 123–128.
- [41] PROBST F, ROSENBERG MP, VANDE WOUDE GF. Protooncogene expression in germ cell development. *Trends in Genetics* 1988; **4**: 183–187.
- [42] ROUSSEAU P, MEDA P, LECART C, HAUMONT S, FERIN J. Cortical granule release in human follicular oocytes. *Biol Reprod* 1977; **16**: 104–111.
- [43] SATHANANTHAN AH, CHEN CH. Sperm-oocyte membrane fusion in the human during monospermic fertilization. *Gamete Res* 1986; **15**: 177–186.
- [44] SATHANANTHAN AH, KOLA I, OSBORNE J, TROUNSON A, NG SC, BONGSO A. Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**: 4806–4810.
- [45] SATHANANTHAN AH, TROUNSON AO. Ultrastructure of cortical granule release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res* 1982; **6**: 225–234.
- [46] SCHALKOFF ME, OSKOWITZ SP, POWERS RD. Ultrastructural observation of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. *Biol Reprod* 1989; **40**: 379–393.
- [47] SCHULTZ GA, HAHNEL A, ARCELLANA-PANLILIO M, WANG L, GOUBAUS, WATSON A, HARVEY M. Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. *Molec Reprod Devel* 1993; **35**: 414–420.
- [48] SHABANOWITZ SHA, O'RAND MG. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* 1988; **82**: 151–161.
- [49] SZOLLOSI D, CALARCO P, DONAHUE RP. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J Cell Sci* 1972; **11**: 521–541.
- [50] TESARIK J, KOPECNY V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Exptl Cell Res* 1990; **191**: 153–156.
- [51] TESARIK J, KOPECNY V. Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. *J Reprod Fertil* 1989; **86**: 549–558.
- [52] TESARIK J, KOPECNY V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989; **24**: 135–149.
- [53] TESARIK J, KOPECNY V. Developmental control of the human male pronucleus by ooplasmic factors. *Hum Reprod* 1989; **4**: 962–968.
- [54] TORRY DS. Proto-oncogenes and germ-cell differentiation. *Amer J Reprod Immunol* 1992; **27**: 167–170.

- [55] VAN BLERKOM J, HENRY G, PORRECO R. Preimplantation human embryonic development from polypronuclear eggs after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; **41**: 686–696.
- [56] VAN STEIRTEGHEM AC, NAGY Z, JORIS H, LIU J, STAESSEN C, SMITZ J, WISANTO A, DEVROEY P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1061–1066.
- [57] WINSTON N, JOHNSON M, PICKERING S, BRAUDE P. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. *Fertil Steril* 1991; **56**: 904–912.
- [58] WOLF DP, LANZENDORF SE. Fertilization in Man, Overview of Mammalian Fertilization. B.S Dunbar and M.G.O'Rand (ed.). *Plenum Press, New York*, 1991; 385–400.
- [59] WOODWARD BJ, LENTON EA, TURNER K. Human chorionic gonadotrophin: embryonic secretion is a time-dependent phenomenon. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1463–1468.
- [60] YEW N, OSKARSSON M, DAAR , BLAIR DG, VANDE WOUDE GF. *mos* gene transforming efficiencies correlate with oocyte maturation and cytostatic factor activities. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 604–610.
- [61] ZIRKIN BR, SOUCEK DA, CHANG TSK, PERREAULT SD. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res* 1985; **11**: 349–365.

Otrzymano: 16.02.1994 r.

Przyjęto: 08.04.1994 r.

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

PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA STRATEGII ANTYSENSÓW W MEDYCYNIE DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

THE PERSPECTIVES OF ANTISENSE STRATEGY APPLICATION IN THE EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

Mariusz Z. RATAJCZAK, Tomasz SKÓRSKI

Zakład Cytologii Klinicznej CMKP i Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Streszczenie. W pracy przedstawiono możliwości wyłączenia ekspresji genów za pomocą strategii antysensów. Szczególną uwagę poświęcono wykorzystaniu w tym celu syntetycznych oligomerów DNA blokujących swoiście ekspresję genów na poziomie mRNA. W pracy przedstawiono teoretyczne podstawy stosowania oligomerów antysensowych, problemy związane z ich biochemią i biologicznym działaniem oraz farmakokinetyką. Przedstawiono również wyniki pierwszych prób zastosowania oligomerów antysensowych w modelach doświadczalnych na zwierzętach *in vivo*.

Summary. The possibility of a regulation of the gene expression, using antisense strategy was discussed in this paper. Especially, the possibility to regulate gene expression at mRNA level, by synthetic oligo-DNA (oligomers). The authors described different aspects concerning: oligomers biochemistry, biological activity and pharmacokinetics. This paper also included the review of the first trials of oligomer application *in vivo* in animal models.

Wykaz skrótów : dAMP – monofosforan deoksyadeninowy, dGMP – monofosforan deoksyguaninowy, γ GTP – gamma glutamylu-transpeptydaza, myszy SCID (ang. *severe combined immunodeficiency syndrome*) – myszy z wrodzonym ciężkim zespołem niedoborów immunologicznych, TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów.

WSTĘP

Potencjalna możliwość swoistego zniesienia ekspresji wybranych genów w komórce za pomocą techniki antysensów stanowi ciekawą i obiecującą strategię umożliwia-

jąca badanie funkcji genów zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu [12, 19, 32, 48, 55, 63, 65, 82]. Ma ona również niezwykle ważny aspekt kliniczny [2, 4, 86, 102]. Możliwość celowanego zniesienia ekspresji genów odpowiedzialnych za występowanie poszczególnych schorzeń otwiera bowiem nowe perspektywy lecznicze [25, 82]. Zablokowanie np. ekspresji protoonkogenów odpowiedzialnych za transformację nowotworową komórek może prowadzić do zahamowania ich proliferacji, a nawet zniszczenia. Oznacza to, że substancje swoiście znoszące ekspresję odpowiednich protoonkogenów znajdują praktyczne zastosowanie w onkologii klinicznej [7, 8, 44, 56, 67, 80, 84, 87]. Podobnie substancje blokujące geny odpowiedzialne za namnażanie wirusów lub pasożytów będą pomocne w leczeniu niektórych chorób wirusowych i pasożytniczych [2, 3, 20, 24, 77, 82].

W biologii molekularnej znane są dwa podstawowe sposoby celowanego blokowania ekspresji genów. Należą do nich tzw. homologiczna rekombinacja oraz strategia antysensów.

Homologiczna rekombinacja polega na zastąpieniu prawidłowego fragmentu chromosomalnego DNA genu, odcinkiem DNA zawierającym inaktywującą mutację. Prowadzi to do zahamowania prawidłowej ekspresji genu, który poddano homologicznej rekombinacji [10, 92, 100].

Strategia antysensów polega na wybiórczym zahamowaniu ekspresji genu w komórce za pomocą odcinków kwasów nukleinowych, które mogą swoiście hybrydyzować do komplementarnych sekwencji sensownych znajdujących się w chromosomalnym DNA genu lub w cząsteczkach mRNA kodowanych przez ten gen. Chcąc wyłączyć ekspresję genu za pomocą strategii antysensów można wykorzystywać cząsteczki zarówno mRNA, jak i DNA.

Blokowanie ekspresji genu za pomocą cząsteczek mRNA polega na wprowadzeniu do komórek plazmidów zawierających cDNA genu, którego ekspresję chcemy znieść [88]. Znajdujący się w plazmidzie cDNA wklonowany jest w orientacji antysensu. Zgodnie z powyższym w komórce syntetyzowany jest następnie zgodnie z informacją zawartą w cDNA plazmidu – antysens mRNA. Syntetyzowane następnie wewnątrzkomórkowo cząsteczki antysensu mRNA mogą swoiście hybrydyzować z cząsteczkami mRNA mającymi komplementarne sekwencje i tym samym wyłączać je z metabolizmu. Opisany mechanizm zniesienia ekspresji genu na poziomie mRNA za pomocą komplementarnych cząsteczek mRNA przypomina w pewnym stopniu fizjologiczną regulację ekspresji niektórych genów spotykaną u mikroorganizmów, gdzie obydwie nici genomowego DNA przepisywane są zarówno na mRNA sens, jak i hybrydujący z nim mRNA antysens [63, 88].

Znacznie łatwiejszą techniką jest wykorzystanie syntetycznych oligodeoksyrybonukleotydów (oligomerów). Oligomery takie penetrują do komórki ze środowiska zewnątrzkomórkowego poprzez błonę komórkową [26, 27, 58, 74]. Mogą być również podawane drogą mikroiniekcji bezpośrednio do cytoplazmy lub jądra [36]. Oligomery po wnikięciu do komórki swoiście hybrydują do komplementarnych

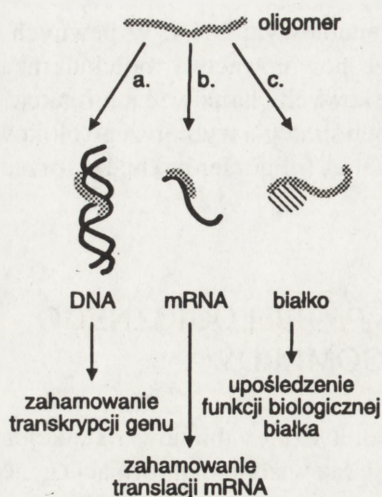
odcinków sensu w cząsteczkach mRNA lub genomowym DNA. W pewnych sytuacjach mogą również przyłączać się w drodze powinowactwa molekularnego do ważnych metabolicznie białek wewnątrzkomórkowych i hamować ich funkcje [65]. Ta rozwijająca się dynamicznie w ostatnich latach strategia wybiórczego blokowania ekspresji genów za pomocą antysensów oligo-DNA (oligomerów) będzie przedmiotem prezentowanej pracy.

MOLEKULARNE PODSTAWY BIOLOGICZNEGO DZIAŁANIA OLIGOMERÓW

Za pomocą strategii antysensów możemy teoretycznie zablokować funkcjonalnie wybrany gen na różnym poziomie jego ekspresji. Jak wiadomo, informacja genetyczna jest zakodowana w genach, które mieszczą się w chromosomalnym DNA. Z chwilą, gdy gen ulega ekspresji, informacja zawarta w sekwencji nukleotydów chromosomalnego DNA zostaje przepisana na komplementarną pod względem sekwencji nukleotydów nici pre-mRNA. Powstająca w procesie transkrypcji cząsteczka pre-mRNA ulega następnie obróbce molekularnej zwanej składaniem, w wyniku której z pre-mRNA usuwane zostają niekodujące odcinki nukleotydów zwane eksonami. W wyniku składania pre-mRNA powstaje więc cząsteczka dojrzałego czynnościowo mRNA, która opuszcza następnie jądro komórkowe i wnika do cytoplazmy. W cytoplazmie sekwencja nukleotydów cząsteczki mRNA zostaje „tłumaczona” na rybosomach w procesie, zwanym translacją, na odpowiednią sekwencję aminokwasów, które tworzą łańcuch peptydowy białka.

Jak przedstawiono na rysunku 1, syntetyczne oligodeoksynukleotydy mogą teoretycznie wpływać na ekspresję genu na wszystkich jej poziomach – od procesu transkrypcji genomowego DNA poprzez translację rybosomalną mRNA na polipeptyd aż do blokowania funkcji biologicznej samego już białka, które dany gen koduje.

Zgodnie z powyższym, w pewnych sytuacjach oligomer antysensowy może ułożyć się w wielkiej bruzdzie podwójnej spirali DNA i przyłączyć do komplementarnej sekwencji sensu jednej z nici. Tworzy się wówczas struktura molekularna zawana potrójną spiralą (rys. 1a). Ekspresja genu zostaje tym samym zablokowana na poziomie transkrypcji informacji genetycznej zawartej w sekwencji nukleotydów DNA na sekwencje nukleotydów cząsteczki pre-mRNA [45, 49, 65]. Wykazano ponadto, że oligonukleotydy, które zostaną skoniugowane z kompleksem: EDTA-Fe po utworzeniu potrójnej spirali mogą w dalszej kolejności generować powstawanie wolnych rodników i trwale uszkadzać strukturę chromosomu w obrębie genu, którego ekspresję chcemy wyłączyć [49, 51]. Przyjmuje się, że potrójna spirala powstaje w wyniku tworzenia tzw. wiązań Hogstena. Warunkiem niezbędnym ich powstania jest to, aby odcinek genomowego DNA, do którego przyłącza się oligomer, był bogaty w nukleo-



Rys 1. Różne możliwości interakcji oligomeru antysensowego z ekspresją genu – oligomer może hybrydyzować z: a – komplementarną sekwencją sensu w genomowym DNA (ang. *triple helix formation*) i hamować proces transkrypcji, b – komplementarną sekwencją sensu w cząsteczce mRNA i hamować proces jej rybosomalnej translacji na białko oraz c – przyłączać się na zasadzie powinowactwa molekularnego białko – kwas nukleinowy do cząsteczek niektórych białek wewnątrzkomórkowych upośledzając tym samym ich funkcję biologiczną

strategia ta może zostać zastosowana tylko w przypadku nielicznych genów. Chcąc zwiększyć liczbę genów, które można byłoby czynnościowo blokować w wyniku tworzenia struktur potrójnej spirali, próbuje się stosować oligomery mające tzw. zawias molekularny [65]. Stwarza to możliwość łączenia się cząsteczki oligomeru do odpowiedniego motywu na jednej nici, a drugiego jej fragmentu do odpowiedniego motywu na drugiej nici. Stosując powyższą strategię udało się już skutecznie zahamować w doświadczeniach *in vitro* ekspresję niektórych genów. Powyższą strategię zastosowano również z powodzeniem do „molekularnej mikro-amputacji” *in vitro* końca długiego ramienia czwartego chromosomu człowieka [65].

Drugim, a zarazem najczęściej stosowanym wariantem wykorzystania strategii antysensów (rys. 1b) jest wyłączenie ekspresji genu na poziomie cząsteczki mRNA [26, 27, 58, 65, 74]. Strategii tej poświęcimy głównie dalszą część prezentowanej pracy. U podłoża powyższej strategii leży zdolność do wzajemnej hybrydyzacji komplementarnych nici kwasów nukleinowych zgodnie z założeniami Watsona i Cricka. W jej wyniku adenina jednej z nici hybrydyzuje z tyminą lub uracylem drugiej nici, a guanina łączy się z cytozyną. Wiązania te mają charakter oddziaływań wodo-

tydy purynowe lub pirymidynowe. Musi zawierać tzw. motyw purynowy lub pirymidynowy [49, 51, 65]. Wiązania Hogstena powstają bowiem w wyniku interakcji tymidyny (T) oligomeru z parą: adenina-tymidyna (A-T) podwójnej nici tworząc tryplet TAT lub w wyniku interakcji protonowanej cytozyny C⁺ oligomeru z parą cytozyna-guanina (C-G) DNA z utworzeniem trypletu C⁺GC. Zgodnie z powyższym do bogatego w puryny motywu nici sensu cząsteczki genomowego DNA:

AGAAAGGAGAAAAAGGGG

może przyłączyć się, układając się w wielkiej bruzdzie pomiędzy niemi DNA, oligomer mający sekwencję: TC⁺TTTC⁺C⁺C⁺TTTTTC⁺C⁺C⁺C⁺. Ponieważ warunkiem niezbędnym utworzenia potrójnej spirali jest konieczność występowania w obrębie genu, którego ekspresję chcemy wyłączyć, odpowiednio długiego motywu pirymidynowego lub purynowego,

rowych. Zgodnie z powyższym syntetyczny oligomer antysensowy po wprowadzeniu do komórki może swoiście hybrydyzować do komplementarnej sekwencji sensu w cząsteczce mRNA i w ten sposób skutecznie blokować jej translację na odpowiedni łańcuch aminokwasowy białka.

Na rysunku 2 przedstawiono różne możliwości interakcji wewnątrzkomórkowej syntetycznego oligomeru antysensowego z cząsteczką mRNA. Jak przedstawiono, oligomer może :

(a) hybrydyzować do sekwencji sensu w cząsteczce pre-mRNA i zaburzać w ten sposób jej składanie ,

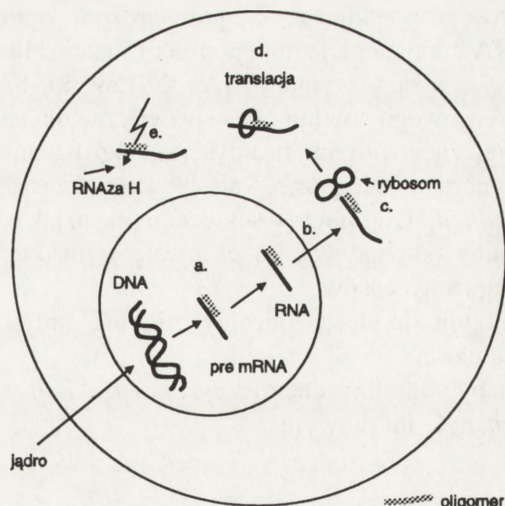
(b) łączyć się w jądrze komórkowym z cząsteczką mRNA i zaburzać tym samym jej translokację do cytoplazmy,

(c) znajdujący się w cytoplazmie oligomer może z kolei utrudniać proces przyłączania się mRNA do rybosomu, co jak wiadomo jest warunkiem niezbędnym do rozpoczęcia procesu translacji,

(d) w wyniku hybrydyzacji oligomeru do mRNA może dojść do upośledzenia procesu rybosomalnej translacji mRNA oraz wreszcie

(e) utworzony dimer: oligomer - mRNA może aktywować RNAzę H – enzym degradujący mRNA wewnątrz komórki [91].

Trzecia z potencjalnych możliwości wpływania oligomerów na ekspresję genu (rys. 1c) wynika z możliwości ich bezpośredniej interakcji z niektórymi białkami wewnątrzkomórkowymi. Oddziaływania takie są skutkiem wzajemnego powinowactwa biologicznego niektórych białek i kwasów nukleinowych [65, 82]. Zgodnie z powyższym zsyntetyzowany oligomer może wykazywać przypadkowe powinowactwo molekularne, do któregoś z białek pełniących ważną rolę w utrzymaniu homeostazy komórki, np.: do białka enzymatycznego, receptora lub białka biorącego udział w transdukcji sygnału. W wyniku interakcji z oligomerem może więc dojść do



Rys. 2. Różne możliwości interakcji oligomeru antysensowego z cząsteczką mRNA – oligomer może hybrydyzować do komplementarnej sekwencji sensu powodując: a – upośledzenie procesu składania pre-mRNA do mRNA, b – hamować translokację mRNA z jądra do cytoplazmy, c – hamować przyłączenie się mRNA do rybosomów, d – zaburzać bezpośrednio proces rybosomalnej translacji mRNA na białko oraz e – stanowić po zhybrydyzowaniu z mRNA substrat dla wewnątrzkomórkowej RNAzy H

zablokowania funkcji biologicznej cząsteczki białka i tym samym wyłączenia jej z metabolizmu wewnątrzkomórkowego. Przykładem takiego oddziaływania jest zniesienie za pomocą oligomerów funkcji biologicznej niektórych białek wewnątrzjądrowych regulujących procesy transkrypcji genów. Syntetyczne oligomery, które mają te same sekwencje, jakie występują fizjologicznie w promotorze genu, którego funkcje chcemy wyłączyć, mogą „wychwytywać” kompetencyjnie w komórce białka biorące udział w transkrypcji. Skutkiem powyższych interakcji jest zablokowanie na podanym przykładzie procesu transkrypcji genomowego DNA [63, 65, 82].

Ogólnie ujmując oligomery antysensowe okazały się efektywne w blokowaniu ekspresji genów kodujących białka, będących:

- czynnikami wzrostowymi [11, 43, 64, 85],
- receptorami powierzchniowymi komórki [46, 59, 60, 62, 75],
- cząsteczkami adhezyjnymi [14], drugimi przekaźnikami informacji [30, 52, 66, 70, 71, 72, 73, 83],
- czynnikami transkrypcyjnymi [9, 15, 16, 18, 26, 27, 33, 54, 57, 58, 93, 95, 96],
- enzymami, jak i białkami transportowymi i strukturalnymi [63, 65, 82].

Jak wspomniano wyżej, dalszą część pracy poświęcimy strategii wyłączania ekspresji genów na poziomie mRNA za pomocą syntetycznych oligomerów antysensowych. Strategia ta jest najczęściej stosowana w praktyce. Z tym rodzajem strategii autorzy pracy mają również największe doświadczenie własne.

BIOCHEMIA OLIGOMERÓW ANTYSENSOWYCH

Oligomer antysensowy powinien oddziaływać swoiście na proces ekspresji genu, którego funkcję chcemy wyłączyć. Swoiste działanie blokujące oligomeru antysensowego powinno zostać potwierdzone zmniejszeniem ekspresji odpowiedniego mRNA lub najlepiej zmniejszeniem stężenia białka kodowanego przez gen, którego funkcję chcemy wyłączyć [26, 27, 58, 59, 62, 70, 71, 72]. Działanie oligomeru antysensowego powinno być specyficzne dla jego sekwencji. Dlatego obok wpływu biologicznego oligomeru antysensowego badany jest równoległe efekt oddziaływania oligomeru mającego zarówno sekwencję sensu, jak i sekwencję niespecyficzną (ang. *scrambled*). Oligomery o sekwencji sensu, jak i mające sekwencję niespecyficzną nie powinny oddziaływać na ekspresję genu, który chcemy zablokować za pomocą strategii antysensów.

Przyjmuje się, że idealny oligomer antysensowy powinien mieć następujące właściwości:

- 1) być stabilny chemicznie *in vitro* i *in vivo* w środowisku zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowym;

2) być w stanie przenikać przez błonę komórkową, tak aby dotrzeć do sekwencji, przeciwko którym jest skierowany, w wystarczającym dla wywołania efektu biologicznego stężeniu;

3) wykazywać wystarczające powinowactwo i zdolność swoistej hybrydyzacji do sekwencji sensu, a wiązanie takie powinno być stabilne,

4) hybrydować selektywnie do sekwencji sensu tak, aby zminimalizować swoje ewentualne niespecyficzne działanie toksyczne.

Oligomery antysensowe są krótkimi odcinkami syntetycznego DNA długości od 10 do 30 par zasad. Jak się przyjmuje, oligomer o długości 15–17 par zasad będzie już miał unikalną sekwencję nie powtarzającą się w całym genomie ludzkim [65, 86]. Postępy w chemii fosforoamidów, jak i równoległy rozwój technologii automatycznej syntezy DNA umożliwiają obecnie otrzymywanie oligomerów na skalę pozwalającą m.in. na pierwsze podjęcie prób stosowania ich *in vivo* w żywych organizmach.

Jak wiadomo, tzw. zwykle niemodyfikowane oligomery fosforodwuestrowe są niszczone przez występujące w płynach ustrojowych enzymy rozkładające cząsteczki DNA: 5' i 3' egzonukleazy oraz tzw. endonukleazy [12, 19, 86]. Fakt ten znacznie ogranicza szersze wykorzystanie niemodyfikowanych pochodnych fosforodwuestrowych *in vivo*. W związku z powyższym przygotowując się do farmakologicznego zastosowania oligomerów w organizmach żywych opracowano szereg technologii pozwalających na syntezę opornych na działanie nukleaz modyfikacji oligomerów [82].

Ze względu na fakt, że endonukleazy degradują oligomery poprzez zniszczenie mostka fosforodwuestrowego występującego pomiędzy nukleotydami próbuje się przede wszystkim dokonać modyfikacji chemicznej powyższego miejsca. Mostek fosforodwuestrowy występujący pomiędzy nukleotydami modyfikuje się m.in. poprzez podstawienie w miejsce atomu wodoru siarki lub reszty metylowej (rys. 3). Utworzone w ten sposób pochodne fosfortiolowe i metylofosfonianowe są znacznie bardziej odporne na degradację w płynach ustrojowych [47, 81, 97, 101, 102]. Opisano również próby syntezy pochodnych: fosforodwutiolowych, fosforotrzystowych i fosforanowoselenianowych [63, 65, 82, 86].

Chcąc z kolei zapobiec degradacji oligomerów poprzez 3' i 5' egzonukleazy, które niszczą oligomery poczynając od nukleotydów końcowych, modyfikuje się końcowe nukleotydy łącząc je ze związkami blokującymi działanie egzonukleaz, np.: z akrydyną. Próbuje się również modyfikować oligomery zamieniając występujące w nich wiązanie glikozydowe z formy α w formę anomeryczną β [32, 82]. Pewna strategia w modyfikacji oligomerów, która ma zabezpieczać przed egzonukleazami, jest syntezą oligomerów, których tylko końcowe nukleotydy są modyfikowane. Oligomery takie, aczkolwiek odporne na działanie 3' i 5' egzonukleaz, są jednak nadal wrażliwe na działanie endonukleaz występujących w płynach ustrojowych.

Zsyntetyzowanie opornych na działanie nukleaz pochodnych oligomerów umożliwiło podjęcie pierwszych prób zastosowania ich najpierw *in vivo* w modelach

doświadczalnych u zwierząt [33, 50, 61, 69, 74], a obecnie u pierwszych pacjentów [4]. Modyfikacje chemiczne oligomerów prowadzą jednak do zmiany niektórych z ich właściwości fizyko-biochemicznych. W tabeli 1 porównano niektóre z właściwości niemodyfikowanych oligomerów fosforodwuestrowych z właściwościami oligomerów opornych na degradację w płynach biologicznych pochodnych fosforotiolowych i metylofosfonianowych.

Ciekawą alternatywę stanowi synteza tzw. kopolimerów fosforodwuestrowo-fosforotiolowych [28]. Pochodne takie zachowują w dużym stopniu właściwości fizykochemiczne oligomerów niemodyfikowanych i modyfikowanych. Są one np.: bardziej stabilne w płynach biologicznych niż oligomery fosforodwuestrowe, lecz za to lepiej hybrydują z cząsteczkami wewnątrzkomórkowymi mRNA niż pochodne fosforotiolowe.

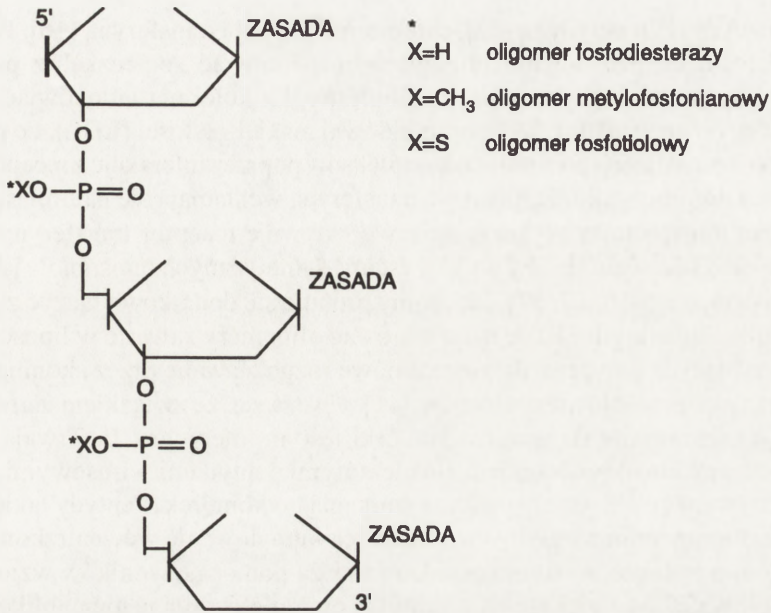
Interesującą modyfikację stanowią również zsyntetyzowane ostatnio tzw. pochodne peptydowo-nukleinowe (ang. *peptide-nucleic acids analogues* – czyli tzw. PNAs) [23, 55]. W pochodnych tych szkielet deoksyrybozowo-fosforanowy kwasu nukleinowego zastępuje się homomorficznym poliamidem składającym się z jednostek 2-aminoetylowych glicyny. Okazało się, że pochodne takie mogą się wiązać z genomowym DNA zarówno na zasadzie komplementarności zasad wg zasad hybrydyzacji Watsona-Cricka, jak również układając się w wielkiej bruzdzie spirali DNA i tworzyć strukturę nici potrójnej (ang. *triple helix*) [55].

TABELA 1. Niektóre z fizyko-chemicznych właściwości oligomerów niemodyfikowanych (fosforodwuestrowych) i ich pochodnych (fosforotiolowych i metylofosfonianowych).

Cecha	Oligomery		
	fosforodwuestrowe	metylofosfonianowe	fosforotiolowe
Stabilność biologiczna	–	+++	++
Zdolność kumulowania w komórkach	+	++	+/-
Wydajność hybrydyzacji	+++	+	++
Aktywacja RNAzy H	+++	–	+++

STRATEGIE ZWIEKSZAJĄCE EFEKTYWNOŚĆ WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO DZIAŁANIA BIOLOGICZNEGO OLIGOMERÓW ANTYSSENSOWYCH

Bezpośrednie podanie do komórki oligomerów antysensowych skoniugowanych z markerem immunofluorescencyjnym drogą mikroiniekcji wykazało, że kumulują się one stosunkowo szybko w jądrze komórkowym [42]. Z kolei jak wykazano oligomery dodane do pożywki, w której są hodowane komórki, gromadzą się głównie w lizosomach i endosomach [13, 21, 34]. Uwalnianie z wakuoli jest prawdopodobnie bardzo powolne, o czym świadczy fakt, że nie wykrywa się wtedy większych stężeń oligo-



Rys. 3. Najczęściej stosowane modyfikacje wiązania fosforodwuestrowego oligonukleotydu DNA mające zwiększyć jego oporność na degradację w płynach ustrojowych – normalny, nie modyfikowany oligomer ma w miejscu oznaczonym literą "X" wodór (H); podstawiając w to miejsce siarkę (S) otrzymujemy pochodną fosfotolową, podstawiając zaś grupę metylową (CH₃) pochodną metylofosfonianową

merów w jądrze. Z badań własnych autorów wynika jednak, że oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA onkogenów: bcr-abl i c-myc gromadzą się także w znacznych ilościach w jądrach komórek hemopoetycznych [74] i guzów litych [33].

Ogólnie ujmując, oligomery antysensowe z wyjątkiem pochodnych metylofosfonianowych są polianionami [82]. W związku z tym w przeciwieństwie do klasycznych leków przeciwnowotworowych, które są z reguły niskocząsteczkowymi substancjami hydrofilnymi, nie mogą przenikać biernie poprzez błonę komórkową. Transport ich do komórki jest zależny od: czasu, energii i temperatury [19]. Oznacza to, że jest on głównie procesem aktywnym. Ogólnie przyjmuje się, że oligomery antysensowe wnikają do komórek w wyniku pinocytozy lub endocytozy zależnej od receptorów. Opisano białko o ciężarze 80 kd pełniące rolę receptora błonowego dla oligomerów w procesie ich endocytozy [98]. Uważa się, że istnieje kilka takich białek [5, 29, 99]. W komórce oligomery znajdują się głównie w wakuolach. Mechanizmy umożliwiające ich uwolnienie z przedziału endosomalnego do cytozolu nie są w pełni wyjaśnione. Jak wspomniano, jedynie pochodne metylofosfonianowe dostają się do wnętrza komórek drogą biernej dyfuzji [47].

Obecnie trwają intensywne prace nad rozwojem strategii, które pozwoliłyby na zwiększenie dokomórkowego transportu oligomerów antysensowych. Zgodnie z powyższym oligomery łączy się z syntetycznymi polipeptydami, np. polipeptydem

polilizynowym [17], akrydyną [82], cholesterolem [40] i transferyną [16]. Polilizyna ma maskować ujemne ładunki oligomeru oraz ułatwiać „ucieczkę” z przedziału endosomalnego komórki do cytozolu. Cholesterol z kolei ma umożliwiać łączenie oligomerów do apoproteiny E i lipoproteidów o niskiej gęstości (LDL), co prowadzi finalnie do internalizacji powstałych kompleksów poprzez interakcję z receptorem dla LDL [40]. Oligomery skoniugowane z transferyną wchłaniają się natomiast poprzez mechanizm transportowy wykorzystujący efektywnie receptor transferynowy [16]. Podejmowane są również próby wykorzystania syntetycznych liposomów jako systemu transportującego [6, 17, 37]. Liposomy próbuje się dodatkowo łączyć z przeciwciałami monoklonalnymi, które mają kierować oligomery zawarte w liposomach do komórek mających antygeny powierzchniowe rozpoznawane przez skoniugowane z liposomem przeciwciało monoklonalne [41]. Uważa się, że związkami ułatwiającymi penetrację oligomerów do wnętrza komórki jest amfoterycyna B. Trwają również intensywne prace nad posłużeniem się niektórymi peptydami wirusowymi, które są wykorzystywane przez wirusy podczas wnikania do komórek. Peptydy takie skoniugowane z oligomerami mogłyby zwiększać ich kumulowanie wewnątrzkomórkowe. Zaobserwowano także, że stymulacja komórek za pomocą czynników wzrostowych prowadzi również do zwiększenia wychwytu oligomerów (dane nie publikowane).

Pracuje się również nad strategiami mającymi za zadanie zwiększenie biologicznej efektywności wewnątrzkomórkowego działania oligomerów. Oligomery koniuguje się z enzymami mogącymi niszczyć cząsteczki mRNA [78]. Należy do nich wspomniana powyżej rybonukleaza H oraz tzw. rybozomy. RNAza H, jak wspomniano, jest białkiem enzymatycznym rozkładającym zhybrydyzowane dimery: mRNA – oligomer antysensowy [91]. Rybozomy z kolei są unikalnymi fragmentami RNA mającymi aktywność RNAzy i tym samym mogącymi autokatalicznie rozkładać wewnątrzkomórkowo cząsteczki mRNA [78].

W strategii antysensów skierowanych przeciwko cząsteczkom mRNA najczęściej używa się niemodyfikowane 18 mery lub pochodne fosfotiolowe będące 24 merami. Oligomery najczęściej skierowane są przeciwko sekwencjom znajdującym się wokół miejsca inicjującego translację cząsteczki mRNA, której ekspresję chcemy zablokować. Efektywność działania oligomeru antysensowego zależy od wielu czynników. Nie bez znaczenia jest tutaj struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa docelowej cząsteczki mRNA. Jeżeli sekwencja sensu, przeciwko której zsyntetyzowano oligomery antysensowe, znajduje się ukryta głęboko wewnątrz łańcucha nukleotydów tworzących mRNA – hybrydyzacja może być utrudniona lub nawet niemożliwa. Dlatego uważa się, że tzw. odcinki wolne w cząsteczce mRNA są zdecydowanie lepsze do hybrydyzacji za pomocą oligomerów antysensowych niż odcinki biorące udział w zachowaniu struktury drugorzędowej mRNA [102]. Ustalając sekwencje antysensu do cząsteczki mRNA należy ponadto unikać sekwencji wykazujących duży stopień wewnętrznej homologii, gdyż może to prowadzić do tworzenia wewnątrz-

cząsteczkowych wiązań i w efekcie uniemożliwiać hybrydyzację z sekwencją sensu cząsteczki mRNA, przeciwko której zsyntetyzowano oligomer.

Ogólnie ujmując zachęcające wyniki uzyskano używając oligomery antysensowe skierowane przeciwko miejscom: inicjującym transkrypcję cząsteczki mRNA, rozpoczynającym jej translację, miejscom biorącym udział w procesie składania, jak i skierowanym do nieulegających translacji odcinków 3' cząsteczki mRNA. Pracując nad ustaleniem sekwencji antysensu wobec cząsteczki mRNA, której ekspresję chcemy w komórce zablokować, należy niekiedy wytestować skuteczność kilku różnych oligomerów skierowanych przeciwko różnym fragmentom cząsteczki mRNA tak, aby w końcu wybrać spośród nich oligomer działający najbardziej efektywnie.

PROBLEMY DOTYCZĄCE EFEKTYWNOŚCI DZIAŁANIA OLIGOMERÓW

Omawiając różne zagadnienia wykorzystania strategii antysensów należy omówić również problemy związane z ich biologiczną efektywnością. Podkreślić należy trzy podstawowe aspekty:

- 1) niespecyficzną toksyczność oligomerów,
- 2) problemy w uzyskaniu zniesienia ekspresji niektórych genów za pomocą antysensów
- 3) pełną powtarzalność wyników uzyskiwanych przez różne zespoły.

Uważa się, że niektóre z opisanych wyników mogą być związane z niespecyficznym działaniem toksycznym stosowanych oligomerów [48]. Według przyjętych poglądów najmniej toksyczne są pochodne metylofosfonianowe [47]. W przypadku oligomerów fosfotiolowych wyrażano pogląd, że oligomery, które zawierają w swojej cząsteczce sekwencje czterech następujących po sobie ganozyn (odcinek G-4), mogą hamować proliferację komórek w wyniku niespecyficznego mechanizmu niezależnego od efektu antysensu [101]. Należy również mieć na uwadze, że produkty degradacji oligomerów antysensowych, takie jak: tymidyna, 2'-deoksyadenozyna, dAMP czy dGMP, mogą działać niespecyficznie antyproliferacyjnie na komórki szczególnie hemopoetyczne [22, 48, 68]. Pochodne fosfotiolowe mogą się również wiązać z rybosomami i w ten sposób blokować niespecyficznie procesy translacji mRNA w komórkach [81]. Stwierdzono również, że pochodne fosfotiolowe skierowane przeciw wirusowemu mRNA mogą hamować proliferację wirusów w wyniku niespecyficznego blokowania wirusowej polimerazy lub utrudniając absorpcję komórkową wirusów poprzez blokowanie białek odpowiedzialnych za wnikanie wirusów do komórek [48].

O problemie związanym z wyłączeniem ekspresji niektórych genów wspomniano powyżej. Słaba efektywność działania antysensów może wynikać z niekorzystnej

struktury drugo- lub trzeciorzędowej cząsteczki mRNA, której ekspresję chcemy znieść [102]. Jak wspomniano, oligomery mogą nie docierać do sekwencji, przeciwko którym są skierowane. Problem ten można starać się ominąć porównując efektywność oligomerów skierowanych przeciwko różnym fragmentom cząsteczki mRNA tak, aby ustalić oligomer najlepiej działający.

Nie bez znaczenia jest również fakt, że wiele zespołów wskazuje na trudności w powtórzeniu wyników uzyskanych przez inne grupy. Wynikać to może:

- z różnicy w syntezie oligomerów, budowie chemicznej stosowanych pochodnych,
- z warunków modelu doświadczalnego,
- z różnicy we wrażliwości na oligomery podtypów linii komórkowych hodowanych w różnych laboratoriach, jak i wreszcie
- od doświadczenia zespołu stosującego tę strategię badawczą.

FARMAKOKINETYKA OLIGOMERÓW ANTYSSENSOWYCH

Przeprowadzono już pierwsze badania farmakokinetyczne oligomerów stosowanych w modelach *in vivo* [1, 35]. Oceniano ich poziom we krwi, półokres trwania, jak i rozmieszczenie wewnątrz ustroju po podaniu parenteralnym zwierzętom doświadczalnym. Półokres trwania pochodnych fosfotiolowych długości 20–27 par zasad podanych dożylnie myszom wynosił w surowicy od 40 do 72 godzin [35]. Degradacja metaboliczna podanych oligomerów w moczu była niewielka. Oligomery kumulowały się w wątrobie i nerkach, stężenie ich w powyższych narządach zaś znacznie przewyższało stężenie w surowicy. Iversen i wsp. pokazali, że w przypadku myszy oligomery gromadzą się też w mózgu, co przemawiałoby za ich skutecznym przenikaniem przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy u gryzoni [35].

U małą półokres trwania oligomerów w surowicy był podobny jak u gryzoni [35]. Oligomery kumulowały się najlepiej w nerkach, wątrobie, grasicy, szpiku kostnym, węzłach chłonnych, śliniankach, płucach i trzustce. Obserwowano również gromadzenie się podanych oligomerów w: mięśniach, przewodzie pokarmowym i tchawicy. Najślabiej gromadziły się natomiast w: mózgu, rdzeniu przedłużonym, chrząstce, skórze i gruczole krokowym.

W pierwszym opisanym w literaturze przypadku dożylnego podania fosfotiolowych pochodnych oligomerów antysensowych skierowanych przeciwko białku p53 u człowieka zaobserwowano niewielki wzrost poziomu γ GTP w surowicy. Pacjent skarżył się jedynie na uczucie metalicznego smaku w ustach, nudności i wymioty [4]. Chory otrzymywał dożylnie wlew oligomerów antysensowych w dawce: 0,05 mg/kg i godzinę. Całkowita podana dawka wynosiła 700 mg. Podanie dożylnie oligomerów okazało się więc w miarę bezpieczne.

Stosując ogólnoustrojowo oligomery antysensowe szczególnie w wyższych dawkach należy spodziewać się wystąpienia efektów ubocznych. Oligomery mogą działać toksycznie zarówno specyficznie, jak i niespecyficznie.

Działanie specyficzne wynika z blokowania ekspresji genu, przeciwko któremu są skierowane w komórkach nie tylko chorych, lecz również zdrowych. Efekt końcowy tego działania zależy oczywiście od stopnia różnicy we wrażliwości na zniesienie ekspresji danego genu pomiędzy komórkami chorymi i zdrowymi. Efekt niespecyficzny wynika natomiast z ich działania jako związku chemicznego nie występującego fizjologicznie w organizmie.

Z badań własnych wynika, że myszy, którym podawaliśmy za pomocą pomp osmotycznych przez dwa tygodnie antysensy skierowane przeciwko sekwencji mRNA ludzkiego białka transkrypcyjnego c-myc – w dawce 100 µg/dobę, nie wykazywały zmian morfologicznych w wątrobie ani nerkach. Obserwowano jedynie wystąpienie we krwi obwodowej małopłytkowości, która wynikała prawdopodobnie z ich niespecyficznego, niekorzystnego działania jako cząsteczek będących polianionami na trombocyty [33].

Oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA ludzkiego onkogenu bcr-abl, podawane dożylnie myszom SCID w dawce 1 mg na dobę przez 12 kolejnych dni osiągają stężenie terapeutyczne w tkankach, a także są wykrywalne w ludzkich komórkach białaczkowych rosnących u tych zwierząt. Przeprowadzono analizę anatopatologiczną narządów wewnętrznych myszy SCID otrzymujących oligomery przez 12 dni i nie wykazano większych zmian [74].

Niemniej jednak należy być przygotowanym, że efekty uboczne terapii oligomerami mogą być bardziej nasilone i zróżnicowane. Będą one zależne od budowy chemicznej stosowanej pochodnej, jej dawki, jak i stosowanej sekwencji. Wprowadzenie oligomerów do kliniki wymaga więc rzetelnie przeprowadzonych, poprzedzających badań toksykologicznych na modelach zwierzęcych – najpierw na myszach, a później na małpach.

POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA OLIGOMERÓW ANTYSENSOWYCH W MEDYCYNIE KLINICZNEJ

Trwają intensywne badania nad wprowadzeniem oligomerów antysensowych jako nowej generacji leków do kliniki. Najbardziej zaawansowane prace dotyczą ich potencjalnego zastosowania w:

- onkologii klinicznej,
- angioplastyce naczyń wieńcowych,
- chorobach neurologicznych,

– leczeniu niektórych chorób wirusowych i pasożytniczych.

Oligomery antysensowe stosowane jako leki przeciwnowotworowe mogą hamować swoiście ekspresję wielu protoonkogenów odpowiedzialnych za niekontrolowany wzrost komórek. Wynikiem ich działania może być zahamowanie proliferacji komórek złośliwych [61, 74, 83], indukcja apoptozy [63, 76] lub nawet cofnięcie ich nowotworowego fenotypu. Z tego powodu myśli się o praktycznym wykorzystaniu oligomerów w klinice zarówno w leczeniu białaczek, jak i guzów litych [25, 82].

Warunkiem poprzedzającym kliniczne zastosowanie oligomerów w leczeniu chorych jest uprzednie udokumentowanie ich korzystnego działania *in vivo* w modelach doświadczalnych na zwierzętach. Z pierwszych opublikowanych badań przeprowadzonych na zwierzętach *in vivo* wynika, że oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenom c-myc [61] i bcr-abl [74] spowolniły wzrost komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej wszczepionej myszom SCID. Oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenowi c-myc hamowały również wzrost komórek ludzkiego czerniaka u tych zwierząt [33]. Z kolei oligomery skierowane przeciwko protoonkogenowi c-HA-ras wykazywały działanie przeciwnowotworowe *in vivo* u myszy nude, którym wszczepiono komórki NIH-3T3 transformowane onkogenem c-HA-ras [30]. Wykazano również, że oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenowi c-myc hamowały *in vivo* ekspresję białka c-myc w limfocytach myszy transgenicznych będących nosicielami transgenu: wzmacniacz immunoglobulinowy – protoonkogen c-myc [96]. Aktywne *in vivo* okazały się również oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA czynnika transkrypcyjnego NF-kb [38, 39].

Osobnym zagadnieniem jest zastosowanie oligomerów antysensowych w usuwaniu komórek nowotworowych *ex vivo* ze szpiku kostnego przed autoprzeszczepami. Zaawansowane są próby kliniczne użycia antysensów skierowanych przeciwko mRNA protoonkogenowi c-myc i onkogenowi bcr-abl. Mechanizm molekularny działania oligomerów skierowanych przeciwko powyższym onkogenom polega na indukowaniu apoptozy w komórkach białaczkowych [63, 76].

Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem oligomerów antysensowych w profilaktyce restenozy naczyń wieńcowych po angioplastyce. Oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA protoonkogenów c-myc, cdc2 i PCNA podawane domiejscowo w momencie rozszerzenia balonikiem naczyń wieńcowych mają hamować ewentualną niepożądaną proliferację miocytów ściany naczyniowej po zabiegu [50, 79]. Badania przeprowadzone w modelach doświadczalnych u zwierząt potwierdziły efektywność takiej strategii *in vivo* [50].

Wszystko wskazuje również na to, że oligomery znajdą wkrótce zastosowanie kliniczne w neurofarmakologii klinicznej [15, 89, 94]. Oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenowi c-fos po podaniu miejscowym do mózgu hamowały ekspresję protoonkogenowi c-fos w komórkach znajdujących się w sąsiedztwie miejsca iniekcji. Stosując z kolei oligomery antysensowe skutecznie zablokowano

ekspresję receptora dla neuropeptydu Y oraz receptora metyloasparaginowego [90]. Uważa się, że szczególnie ostatni z wymienionych oligomerów może znaleźć praktyczne zastosowanie w leczeniu udarów mózgu zmniejszając ognisko uszkodzenia tkanki nerwowej. Pracuje się także nad syntezą oligomerów aptamerowych wiążących działające zakaźnie w układzie nerwowym cząsteczki białkowe, jakimi są priony [31].

Zaawansowane są również badania nad wykorzystaniem oligomerów w leczeniu chorób wirusowych i pasożytniczych [24, 77]. Wykazano ich efekt hamujący proliferację wirusów: opryszczki typu 1 [77], nabytych zespołów niedoborów immunologicznych [2], opryszczkowego zapalenia jamy ustnej [3], grypy, jak i wirusa wywołującego brodawczaki [20]. Uważa się, że oligomery antysensowe znajdują wkrótce praktyczne zastosowanie w leczeniu malarii [82].

Osobnym zagadnieniem jest zastosowanie oligomerów antysensowych w skojarzeniu z innymi formami terapii, takimi jak cytostatyki i immunoterapia [53, 61, 71]. Okazało się, że oligomery antysensowe mogą być skutecznie kojarzone z innymi lekami np. o działaniu przeciwnowotworowym. Z opublikowanych danych wynika, że oligomery skierowane przeciwko mRNA onkogenu bcr-abl w połączeniu z mafosfamidem znacznie bardziej skutecznie niszczyły komórki przewlekłej białaczki szpikowej [71]. Strategia kojarzenia oligomerów antysensowych z cytostatykami i immunoterapią okazała się również skuteczna w hamowaniu wzrostu komórek guzów litych [53]. Z naszych ostatnich, nie publikowanych jeszcze badań wynika ponadto, że oligomery antysensowe mogą być również skojarzone z działającymi przeciwnowotworowo cytokinami, jak np. TNF- α i interferonem α . Strategia taka umożliwia z jednej strony zmniejszenie dawki stosowanych oligomerów, a często zwiększa również ich efektywność farmakologiczną.

Obiecujące wyniki otrzymaliśmy również stosując jednocześnie dwa różne oligomery antysensowe hamujące ekspresję „współpracujących” ze sobą onkogenów. Oligomery takie wykazywały synergistyczny efekt przeciwnowotworowy, co pozwalało na znaczne zmniejszenie ich dawek.

PODSUMOWANIE

Dynamiczny rozwój badań nad strategią blokowania ekspresji genów za pomocą oligomerów antysensowych stwarza realne nadzieje, że wkrótce klinicyści będą dysponować nową generacją leków znoszących swoicie ekspresję genów odpowiedzialnych za występowanie poszczególnych schorzeń. Nad zagadnieniami tymi pracuje wiele zespołów badawczych zarówno w ośrodkach akademickich, jak i firmach biotechnologicznych. Publikacje dotyczące postępów tej dziedziny ukazują się w najlepszych pismach naukowych świata. Od trzech lat ponadto regularnie ukazuje się pismo „*Antisense Research and Development*”, które publikuje prace dotyczące tej problematyki. Pismo to podaje co roku liczbę ważniejszych oryginalnych publikacji, które ukazały się w piśmiennictwie międzynarodowym, a które dotyczyły problema-

tyki strategii antysensów. Według tych danych tylko w roku ubiegłym ukazało się ich ponad 1000. W chwili obecnej kilka zespołów uzyskało już zgodę na podjęcie pierwszych prób klinicznych leczenia chorych za pomocą oligomerów. Dotyczy to głównie białaczek i czerniaków. Oligomery próbuje się wykorzystać zarówno w leczeniu systemowym *in vivo*, jak i w próbach usuwania *ex vivo* komórek nowotworowych ze szpiku pobranego do przeszczepień autologicznych. Wkrótce powinny ukazać się pierwsze wyniki tych badań.

Wszystko wskazuje na to, że skoordynowany wysiłek chemików pracujących nad uzyskaniem na makroskalę nowych pochodnych oligomerów antysensowych, biologów oceniających ich działanie w modelach doświadczalnych, farmakologów śledzących ich farmakokinetykę, jak i lekarzy wdrażających ten nowatorski sposób leczenia w klinice spowodują, że w XXI wiek wkroczymy uzbrojeni w nową generację leków oddziałujących na poszczególne schorzenia poprzez wpływanie na ekspresję genów odpowiedzialnych za etiopatogenezę i przebieg różnych chorób.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AGRAWALS, TEMSAMANI J, TANG JY. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7595–7599.
- [2] AGRAWALS, TANG JY. GEM 91 – an antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate as a specific therapeutic agent for AIDS. *Antis Res Develop* 1992; **2**: 260–266.
- [3] AGRIS CH, BLAKE KR, MILLER PS, REDDY PM, TS'O POP. Inhibition of vesicular stomatitis virus protein synthesis and infection by sequence-specific oligodeoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 1986; **25**: 6268–6275.
- [4] BAYEVER E, IVERSEN P, SMITH L, SPINOLO J, ZON G. Guest editorial: Systemic human antisense therapy begins. *Antis Res Develop* 1992; **2**: 109–110.
- [5] BELTINGER CP, SMITH RM, SARGOVI HU, GEWIRTZ AM. Uptake mechanisms and intracellular trafficking of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Blood* 1993; **82** (suppl 1), 117 a.
- [6] BENNETT CF, CHIANG MY, CHAN H, SHOEMAKER JEE, MIRABELLI ChK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioated antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 1993; **41**: 1023–1033.
- [7] BISHOP MJ. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; **64**: 235–248.
- [8] BRUCK KB, LIU ET, LARRICK JW. Viruses and oncogenes. In: BRUCK KB, LIU ET, LARRICK JW. (eds) *Oncogenes: an introduction to the concept of cancer genes*. Springer-Verlag, New York, 1988; p 38–66.
- [9] CALABRETTA B, SIMS RB, VALTIERI M, CARACCILO D, SZCZYLIK C, VENTURELLI D, RATAJCZAK M, BERAN M, GEWIRTZ AM. Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: An in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2351–2355.
- [10] CAPECCHI M. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 1989; **5**: 70–76.
- [11] CARDOSO AA, LI MA, BATARD P, HATZFELD A, BROWN EL, LEVESQUE JP, SOOKEDO H, PANTERNE B, SANSILVESTRI NI, CLARK SC, HATZFELD J. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8707–8711.
- [12] CALABRETTA B, SKORSKI T, ZON G. Antisense oligodeoxynucleotides. *Seminars in Cancer Biology* 1992; **3**, 391–398.
- [13] CERRUZI M, DRAPER K, SCHWARTZ J. Natural and phosphorothioate-modified oligodeoxyribonucleotides exhibit a non-random cellular distribution. *Nucleosides Nucleotides* 1990; **9**: 679.
- [14] CHIANG MY, CHAN H, ZOUNES MA, FREIER SM, LIMA WF, BENNETT CF. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18162–18171.

- [15] CHIASSON BJ, HOOPER ML, MURPHY PR, ROBERTSON HA. Antisense oligonucleotide eliminates in vivo expression of c-fos in mammalian brain. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* 1992; **227**: 451–453.
- [16] CITRO G, PERROTTI D, CUCCO C, D'AGNANO SACCHI A, ZUPI G, CALABRETTA B. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7031–7035.
- [17] CLARENC JP, DEGOLS G, LEONETTI JP, MILHAUD P, LEBLEU B. Delivery of antisense oligonucleotides by poly(L-lysine) conjugation and liposome encapsulation. *Anti Cancer Drug Design* 1993; **8**: 81–94.
- [18] COLLINS JF, HERMAN P, SCHUCH Ch, BAGBY GC. c-myc antisense oligonucleotides inhibit the colony-forming capacity of colo 320 colonic carcinoma cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1523–1527.
- [19] COLMAN A. Antisense strategies in cell and developmental biology. *J Cell Sci* 1990; **97**: 399–409.
- [20] COWSERT LM, FOX MC, ZONG G, MIRABELLI CHK. In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: Potential treatment for genital warts. *Antimicrob Agents and Chemother* 1993; **37**: 171–177.
- [21] CROOKE RM. In vitro toxicology and pharmacokinetics of antisense oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 1991; **6**: 609–646.
- [22] DOIDA Y, OKADA S. Synchronization of L5178Y cells by successive treatment with excess thymidine and colcemid. *Exp Cell Res* 1967; **48**: 540–548.
- [23] FRANK-KAMENETSKIJ A change of backbone. *Nature* 1991; **354**: 505.
- [24] GAO WY, HANES RN, VAZGUEZ-PADUA MA, STEIN CA. Inhibition of herpes simplex virus type 2 growth by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 808–812.
- [25] GEWIRTZ AM. Therapeutic applications of antisense DNA in the treatment of human leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1992; **660**: 178–187.
- [26] GEWIRTZ AM, ANFOSSI G, VENTURELLI D, VALPREDAS, SIMS R, CALABRETTA B. G/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by c-myc. *Science* 1989; **245**: 180–183.
- [27] GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science* 1988; **245**: 1303–1306.
- [28] GHOSH MK, GHOSH K, COHEN JS. Phosphorothioate-phosphodiester oligonucleotide co-polymers: assessment for antisense application. *Anti Cancer Drug Design* 1993; **8**: 15–32.
- [29] GOODARZI G, WATABE M, WATABE K. Binding of oligonucleotides to cell membranes at acidic pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 1343–1351.
- [30] GRAY GD, HERNANDEZ OM, HEBEL D, ROOT M, POW-SANG JM, WICKSTROM E. Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice. *Cancer Res* 1993; **53**: 577–580.
- [31] HARRISON P. Antisense: into the brain. *Lancet* 1993; **342**: 254–255.
- [32] HIJIYA N, GEWIRTZ AM. Oncogenes, molecular medicine, and bone marrow transplantation. *J Hematother* 1992; **1**: 369–378.
- [33] HIJIYA N, ZHANG J, RATAJCZAK MZ, DeRIEL K, HERLYN M, GEWIRTZ AM. The biologic and therapeutic significance of c-Myb expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91** (w druku).
- [34] IVERSEN PL, ZHU S, MEYER A, ZON G. Cellular uptake and subcellular distribution of phosphorothioate oligonucleotides into cultured cells. *Antisense Res Dev* 1992; **2**: 211–222.
- [35] IVERSEN P. In vivo studies with phosphorothioate oligonucleotides: rationale for systemic therapy. In: Crooke ST & Lebleu B (eds) *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Ann Arbor 1993; 461–469.
- [36] JASKULSKI D, DeRIEL JK, MERCER WE, CALABRETTA B, BASERGA R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science* 1988; **240**: 1544–1546.
- [37] JULIANO RL, AKHTAR S. Liposomes as a drug delivery system for antisense oligonucleotides. *Antisense Res Development* 1992; **2**: 165–176.
- [38] KITAJIMA I, SHINOHARA T, MINOR T, BIBBS L, BILAKOVICS J, NERENBERG M. Human T-cell leukemia virus type I tax transformation is associated with increased uptake of oligodeoxynucleotides in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25881–25888.
- [39] KITAJIMA I, SHINOHARA T, BILAKOVICS J, BROWN DA, XU X, NERENBERG M. Ablation of transplanted HTLV-I Tax-transformed tumors in mice by antisense inhibition of NF- κ B. *Science* 1992; **258**: 1792–1795.
- [40] KRIEG AM, TONKINSON J, MATSON S, ZHAO Q, SAXON M, ZHANG LM, BHANJA U, YAKUBOV L, STEIN CA. Modification of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides by a 5' cholesteryl moiety increases cellular association and improves efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1048–1052.
- [41] LEONETTI JP, DEGOLS G, CLARENC JP, MECHTI N, LEBLEU B. Cell delivery and mechanisms of action of antisense oligonucleotides. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 1993; **44**: 143–166.

- [42] LEONETTI JP, MECHTI N, DEGOLS G, GAGNOR C, LEBLEU B. Intracellular distribution of microinjected antisense-oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **88**: 2702–2706.
- [43] LEVY Y, TSAPIS A, BROUET JC. Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest* 1993; **88**: 696–699.
- [44] LUESCHER B, EISENMAN RN. New light on Myc and Myb. Part II. *Myb. Genes Dev* 1990; **4**: 2235–2242.
- [45] MAHER JL, WOLD B, DERVAN PB. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. *Science* 1989; **245**: 725.
- [46] METHIA N, LOUCHE F, VAINCHENKER W, WENDLING F. Oligonucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993; **82**: 1395–1401.
- [47] MILLER PS. Oligonucleotide methylophosphonates as antisense reagents. *Biotechnology* 1991; **9**: 358.
- [48] MILLIGAN JF, MATTEUCCI MD, MARTIN JC. Current concepts in antisense drug design. *J Med Chem* 1993; **36**: 1923–1937.
- [49] MOFFAT AS. Triplex DNA finally comes of age. *Science* 1991; **252**: 1374–1375.
- [50] MORISHITA R, GIBBONS GH, ELLISON KE, NAKAJIMA M, ZHANG L, KANEDA Y, OGIHARA T, DZAU VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8474–8478.
- [51] MOSER HE, DERVAN PB. Sequence specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science* 1987; **234**: 645–650.
- [52] MUKHOPADHYAY T, TAINSKY M, CAVENDER AC, ROTH JA. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991; **51**: 1744–1748.
- [53] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, SKORSKI T, NAKASHIMA M, RATAJCZAK MZ, STEPLEWSKI Z, CALABRETTA B. Oncogene-targeted antisense oligodeoxynucleotides combined with chemotherapy or immunotherapy: a new approach for tumor treatment. *Folia Histochem Cytobiol* 1994; **32**, 35–40.
- [54] NIEBOROWSKA-SKORSKA M, RATAJCZAK MZ, CALABRETTA B, SKORSKI T. The role of c-myc protooncogene in chronic myelogenous leukemia. *Folia Histochem Cytobiol* 1994 (w druku).
- [55] NIELSEN PE, EGHOLM M, BERG RH, BUCHARGT O. Peptide nucleic acids (PNAs): Potential anti-sense and anti-gene agents. *Anti Cancer Drug Design* 1993; **8**: 53–63.
- [56] NOWELL PC, HUNGERFORD DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; **132**: 1497.
- [57] RASCHELLA G, NEGRONI A, SKORSKI T, PUCII S, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, ROMEO A, CALABRETTA B. Inhibition of proliferation by c-myb antisense RNA and oligodeoxynucleotides in transformed neuroectodermal cell lines. *Cancer Res* 1992; **52**: 4221–4226.
- [58] RATAJCZAK MZ, HIJIYA N, CATANI L, DeRIEL K, LUGER SM, McGLAVE PH, GEWIRTZ AM. Acute- and chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 1992; **79**, 1956–1961.
- [59] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DeRIEL K, ABRAHM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1710–1714.
- [60] RATAJCZAK MZ, LUGER S, GEWIRTZ AM. The c-kit proto-oncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Int J Cell Clon* 1992; **10**: 205–214.
- [61] RATAJCZAK MZ, KANT JA, LUGER SM, HIJIYA N, ZHANG J, ZON G, GEWIRTZ AM. In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myb antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11823–11827.
- [62] RATAJCZAK MZ, KUCZYNSKI W, ONODERA K, MOORE J, RATAJCZAK J, KREGENOW D, DeRIEL K, GEWIRTZ AM. A reappraisal of the role of the Insulin Like Growth Factor -1 (IGF-1) in the regulation of the human hematopoiesis. *J Clin Invest* 1994 (w druku).
- [63] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Oligonucleotide based therapeutics of human malignancies. *Nucleic Acids & Molecular Biology*, vol VIII, (red. F. Eckstein), Springer Verlag 1994 (w druku).
- [64] REISS K, PORCU P, SELL C, PIETRZKOWSKI Z, BASERGA R. The insulin-like growth factor 1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* 1992; **7**: 2243–2248.
- [65] RIORDAN ML, MARTIN JC. Oligonucleotide-based therapeutics. *Nature* 1991; **350**: 442–443.
- [66] SAISON-BEHMOARAS T, TOCQUE B, REY I, CHASSIGNOL M, THUONG NT, HELENE C. Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation include selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cell proliferation. *EMBO* 1991; **10**: 1111–1118.
- [67] SAWYERS CHL, DENNY ChT, WITTE ON. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* 1991; **64**: 337–350.

- [68] SCHARENBERG JGM, RIJKERS GT, TOEBES EAH, STALL GEJ, ZEGERS BJM. Expression of deoxyadenosine and deoxyguanosine toxicity at different stages of lymphocyte activation. *Scand J Immunol* 1988; **28**: 87-93.
- [69] SIMONS M, EDELMAN ER, DeKEYSER JL, LANGER R, ROSENBERG RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* 1992; **359**: 67-70.
- [70] SKORSKI T, SZCZYLIK C, RATAJCZAK MZ, MALAGUARNERA L, GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. Growth factor-dependent inhibition of normal hematopoiesis by N-ras antisense oligodeoxynucleotides. *J Exp Med* 1992; **175**: 743-750.
- [71] SKORSKI T, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, BARIETTA C, MALAGUARNERA L, SZCZYLIK C, CHEN ST, LANGE B, CALABRETTA B. Highly efficient elimination of Philadelphia leukemic cells by exposure to bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides combined with mafosfamide. *J Clin Invest* 1993; **92**: 194-202.
- [72] SKORSKI T, KANAKARAJ P, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, RATAJCZAK MZ, SZCZYLIK C, AR-LINGHAUS RB, GEWIRTZ AM, PERUSSIA B, CALABRETTA B. p210 GAP requirement in normal and malignant human hematopoiesis. *J Exp Med* 1993; **178**, 1923-1933.
- [73] SKORSKI T, KANAKARAJ P, KU DH, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, CANAANI E, PERUSSIA B, CALABRETTA B. Negative regulation of p120 GAP GTPase promoting activity by p210 bcr-abl: implication for RAS dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 1994 (w druku).
- [74] SKORSKI T, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, NICOLAIDES N, SZCZYLIK C, IVERSEN P, IOZZO RV, ZON G, CALABRETTA B. Suppression of Philadelphia leukemia cell growth in mice by bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; (w druku).
- [75] SMALL D, LEVENSTEIN M, KIM E, CAROW C, AMIN S, ROCKWELL P, WITTE L, BURROW CH, RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM, CIVIN CI. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**, 459-463.
- [76] SMETSERS TFCM, SKORSKI T, van der LOCHT LTF, WESSELS MMC, PENNINGHS AHM, deWITTE T, CALABRETTA B, MENSINK EIBM. Antisense bcr-abl oligodeoxynucleotides induce apoptosis in the Philadelphia chromosome positive cell line BV 173. *Leukemia* 1994; **8**: 129-140.
- [77] SMITH CC, AURELIAN L, REDDY M., MILLER PS, HOWLEY PM. Antiviral effect of an oligo (nucleotide methylphosphonate) complementary to the splice-junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. *Biochemistry* 1986; **83**: 2787-2791.
- [78] SNYDER DS, YAPING W, WANG JL, ROSI JJ, SWIDERSKI P, KAPLAN BK, FORMAN SJ. Ribozyme-mediated inhibition of bcr-abl gene expression in a Philadelphia chromosome-positive cell line. *Blood* 1993; **82**: 600-605.
- [79] SPEIR E, EPSTEIN SE. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Circulation* 1992; **86**: 538-547.
- [80] STANBRIDGE EJ, NOWELL PC. Origins of human cancer revisited. *Cell* 1990; **63**: 867-874.
- [81] STEIN CA, COHEN JS. Phosphorothioate oligodeoxynucleotide analogues. In: Oligodeoxynucleotides. Antisense inhibitors of gene expression. Cohen JS (ed.) Basingstoke, The Macmillian Press Ltd. 1989; 97-117.
- [82] STEIN CA, CHENG YC. Antisense oligonucleotide as therapeutic agents - is the bullet really magical? *Science* 1993; **261**: 1004-1012.
- [83] SZCZYLIK C, SKORSKI T, NICOLAIDES N, MANZELLA L, MALAGUARNERA L, VENTURELLI D, GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; **253**: 562-565.
- [84] TIDD DM. A potential role for antisense oligodeoxynucleotide analogues in the development of oncogene targeted cancer chemotherapy. *Anticancer Res* 1990; **10**: 1169.
- [85] TROJAN J, JOHNSON THR, RUDIN SD, ILAN J, TIKOCINSKI M, ILAN J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense Insuline-like growth factor I RNA. *Science* 1993; **259**: 94-96.
- [86] UHLAMANN E, PEYMAN A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chemical Rev* 1990; **90**: 543-584.
- [87] ULLRICH A, SCHLESSINGER J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; **61**: 203-212.
- [88] Van der KROL AR, MOL JNM, STUITJE AR. Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques* 1988; **6**: 958-976.
- [89] WAHLESTEDT C, GOLANOV E, YAMAMOTO S. Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature* 1993a; **363**: 260-263.

- [90] WAHLESTEDT C, MERLO E, PICH M, KOOB GF, YEE F, HEILIG M. Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligonucleotides. *Science* 1993b; **259**: 528-531.
- [91] WALDER RY, WALDER JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5011-
- [92] WALDMAN AS. Targeted homologous recombination in mammalian cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 1992; **12**: 49-64.
- [93] WATSON PH, PON RT, SHIU RPC. Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1991; **51**: 3996-4000.
- [94] WHITESELL L, GESELOWITZ D, CHAVANY C, FAHMY B, WALBRIDGE S, ALGER JR, NECKERS LM. Stability, clearance, and disposition of intraventricularly administered oligodeoxynucleotides: Implications for therapeutic application within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4665.
- [95] WICKSTORM EL, BACON TA, GONZALEZ A, FREEMAN DL, LYMAN GH, WICKSTORM E. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1028-1032.
- [96] WICKSTORM E, BACON TA, WICKSTORM EL. Down-regulation of c-Myc antigen expression in lymphocytes of Em-c-myc transgenic mice treated with anti-c-myc DNA methylphosphonates. *Cancer Res* 1992; **52**: 6741-6745.
- [97] WOOLF TM, JENNINGS CGB, REBAGLIATTI M, MELTON DA. The stability, toxicity and effectiveness of unmodified phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in *Xenopus* oocytes and embryos. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 1768-1769.
- [98] YAKUBOV LA, DEEVA EA, ZARYTOVA VF, IVANOVA EM, RYTE AS, YURCHENKO LV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6454-6458.
- [99] YAKUBOV L, KHALED Z, ZHANG LM, TRUNEN A, VLASSOV V, STEIN CA. Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18818-18823.
- [100] YAMAMURA K, WAKASUGI S. Manipulating the mouse genome: new approaches for the dissection of mouse development. *Develop Growth Differ* 1991; **32**: 93-100.
- [101] YASWEN P, STAMPFER MR, GOSH K, COHEN J. Effects of sequence of thioated oligonucleotides on cultured human mammary epithelial cells. *Antisense Res Dev* 1993; **3**: 67.
- [102] ZON G. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res* 1988; **5**: 539-549.

Otrzymano: 21.04.1994 r.

Przyjęto: 30.04.1994 r.

Adres autora: 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3

REGULATORY TRANSKRYPCJI U ROŚLIN WYŻSZYCH

TRANSCRIPTION REGULATORS IN HIGHER PLANTS

Marcin K. FILIPECKI, Stefan MALEPSZY

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, SGGW, Warszawa

Streszczenie. W ostatnich latach, w ślad za badaniami nad regulacją transkrypcji u zwierząt i grzybów, pojawiły się prace pokazujące udział białkowych czynników transkrypcyjnych w ważnych procesach u roślin. Roślinne regulatory transkrypcji wykorzystują z molekularnego punktu widzenia te same mechanizmy jak ich zwierzęce odpowiedniki, a domeny funkcyjne wykazują często duże podobieństwo sekwencji aminokwasów i struktury. Niektóre z nich odgrywają kluczową rolę w ważnych procesach rozwojowych roślin wyższych, takich jak: morfogeneza kwiatu rzodkiewnika i wyżłinu (rodzina MADS-box), różnicowanie włosków na liściach i pędach rzodkiewnika (*glabrous1*), determinacja komórek liścia kukurydzy (*knotted*), czy przebieg dojrzewania nasion kukurydzy (*viviparous-1*). Niewiele jednak wiadomo na temat genów struktury, na które wpływają wymienione regulatory. Więcej informacji istnieje o regulatorach transkrypcji i genach regulowanych w takich powszechnych szlakach biochemicznych, jak: synteza barwników antocyjanowych u kukurydzy (regulatory *cl* i *rl*), synteza białek zapasowych ziarniaka kukurydzy (*opaque-2*), ekspresja RubisCo u grochu (*3afl*, *gt-1*) i innych. Obok analizy mutantów i bibliotek ekspresyjnych wiele wysiłku poświęca się izolacji potencjalnych czynników transkrypcyjnych z ekstraktów jądrowych oraz analizie elementów w obrębie promotorów interesujących genów. Wiele prac dotyczy badania genów sklonowanych na podstawie podobieństwa do znanych regulatorów transkrypcji.

Summary. There are some papers showing the influence of transcription factors on important processes in plants, which appeared after significant progress had been done in research on transcription regulation in the animal and fungi systems. The plant transcription regulators act on the same molecular basis like these of animals or fungi, and their functional domains show significant similarities in aminoacid sequence and structure. Some of them play the key role in important developmental processes in the higher plants, i.e.: flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana* and *Antirrhinum majus* (the MADS-box family), trichome differentiation on leaves and shoots of *Arabidopsis thaliana* (*glabrous1*), cell determination of *Zea mays* leaves (*Knotted*), kernel maturation in maize (*viviparous-1*). However little is known about the structural genes, which are regulated by factors mentioned above. There is more information available about the transcription regulators and their target genes in some common biochemical pathways, i.e.: anthocyanin biosynthesis in maize (the regulators *cl* and *rl*), synthesis of seed storage proteins in maize kernels (*opaque-2*), RubisCo expression in pea (*3afl*, *gt-1*), etc. Besides the analysis of mutants and expression libraries there is much effort done in the isolation of the putative transcription factors from nuclear extracts and characterization of specific elements in the promoters of interesting genes. Many papers are concerning the genes, which are isolated based on sequence homology to know transcription factors.

1. WSTĘP

Transkrypcja jest podstawowym procesem w sekwencji zdarzeń składających się na ekspresję genów. W poprzedniej dekadzie pojawiło się wiele danych ujawniających wpływ specyficznych białek, nazwanych regulatorami transkrypcji, na przebieg tego procesu u grzybów i zwierząt. W ostatnich latach opublikowano podobne prace dotyczące roślin. Celem niniejszego opracowania jest przybliżenie tych ostatnich.

2. INFORMACJE OGÓLNE

Inicjowanie syntezy mRNA jest etapem, na którym zachodzi pierwotna kontrola i regulacja zróżnicowanej ekspresji genów. Różne wewnętrzne i zewnętrzne impulsy docierające do komórki wpływają pośrednio lub bezpośrednio na zmiany poziomu transkrypcji, aczkolwiek mechanizmy i szlaki biochemiczne, poprzez które komórki integrują i przetwarzają informacje, wciąż nie są dobrze poznane. Inicjowanie syntezy mRNA zależy ostatecznie od czynników reagujących w układzie *trans* ze specyficznymi sekwencjami DNA (elementami) w obrębie promotora, które w ten sposób oddziałują w układzie *cis* na transkrypcję przyległego genu. Oddziaływania *cis* mogą również zachodzić z enhancerami, to jest elementami bardziej oddalonymi od startu transkrypcji, zwykle w kierunku 5' niż promotor [19,31]. Do dnia dzisiejszego zbadano wiele takich genów, których transkrypcja jest ograniczona do konkretnych tkanek, organów, określonego momentu w czasie ontogenezy rośliny czy też jej stanu fizjologicznego. W specyficznym wzorze ekspresji tych genów ujawniono udział białkowych czynników transkrypcyjnych wiążących się z sekwencjami elementów promotora. Czynniki transkrypcyjne mogą współdziałać ze sobą oraz z polimerazą RNA i w efekcie regulować transkrypcję [25,31,40]. Występują one w bardzo małych ilościach, co jest znacznym utrudnieniem dla badań. Pomimo to, w ostatnich latach udało się sklonować wiele genów kodujących te białka u roślin i przeanalizować je pod względem struktury i funkcji [22]. Głównymi cechami tych białek regulatorowych są:

- (1) zdolność specyficznego wiązania się z sekwencjami DNA, co zwykle oznacza obecność określonych strukturalnych domen,
- (2) zdolność do współdziałania z białkami, takimi jak: polimeraza RNA II, aktywatory czy inne regulatory transkrypcji,
- (3) istnienie mechanizmów regulacji syntezy i aktywności (zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji) tych czynników w odpowiednim miejscu i czasie.

Najbardziej zaawansowane badania nad regulacją transkrypcji u *Eukaryota* dotyczą takich organizmów, jak: drożdże, muszka owocowa czy gryzonie. Stosunkowo niewiele zbadano roślinnych regulatorów transkrypcji, a rola, jaką spełniają w proce-

sach życiowych, oraz mechanizmy regulujące ich działanie pozostają w dużej mierze do wyjaśnienia. Ogólnie rzecz biorąc, roślinne białka regulatorowe wykorzystują z molekularnego punktu widzenia te same mechanizmy jak ich zwierzęce odpowiedniki [22]. Wykryto szereg podobieństw strukturalnych i funkcjonalnych w obrębie domen odpowiedzialnych za wiązanie DNA i oligomeryzację jednostek białkowych. Homologia w obrębie tych domen pomiędzy roślinami i zwierzętami sugeruje, że istniały już one, zanim królestwa te rozdzieliły się w trakcie ewolucji [14]. Natomiast zróżnicowanie poza wymienionymi domenami jest znaczne. Wykazano, że różnorodne właściwości regulacyjne powstają przez kombinację różnych domen funkcyjnych (struktura modułowa) [9]. Domeny funkcyjne białek regulatorowych opisuje się zwykle albo przez podobieństwo do dobrze już zbadanych, szeroko opisanych regulatorów (białek zawierających homeodomenę, SRF – ang. *serum responsive factor*, Myc, Myb), czy też wykorzystując strukturalne cechy decydujące o ich działaniu (HTH – ang. *helix-turn-helix*, HLH – ang. *helix-loop-helix*, palec cynkowy – ang. *zinc finger*, suwak leucynowy – ang. *leucine zipper*, rejon zasadowy, domena kwasowa) [25,31,36].

W niniejszej pracy zostaną zaprezentowane roślinne czynniki transkrypcyjne w następującym porządku:

- (1) regulatory mające wpływ na procesy rozwojowe roślin – rozdział 3, [1] (tab. 1),
- (2) regulatory ekspresji genów mechanizmu podstawowego (ang. *house keeping genes*) – rozdział 4 (tab. 2) oraz
- (3) kilka przykładów funkcji i/lub struktury pozostające jeszcze w znacznej mierze do wyjaśnienia – rozdział 5.

Oczywiście przyjęta kolejność omawiania roślinnych regulatorów transkrypcji nie wyklucza istnienia powiązań w obrębie sieci regulacji pomiędzy wymienionymi białkami.

3. REGULATORY TRANSKRYPCJI MAJĄCE WPŁYW NA PROCESY ROZWOJOWE ROŚLIN

Przełomowe znaczenie w poznaniu molekularnych mechanizmów morfogenezy u zwierząt, a później i u roślin, miały badania prowadzone nad mutacjami genów homeotycznych, czyli takich, których uszkodzenie powoduje powstanie innego organu zamiast normalnie występującego w typie dzikim danego organizmu (transformacja homeotyczna). Mutanty homeotyczne rozwoju kwiatów u wyżliny okazały się wygodnym modelem doświadczalnym, co doprowadziło do wyizolowania pierwszego homeotycznego genu roślinnego *deficiens* [45,48], a później szeregu innych (tab. 1). Mutacja *null* w obrębie tego locus powoduje powstanie kwiatu o zmienionym

porządku okółków organów kwiatowych; zamiast kwiatu typu dzikiego o układzie okółków: kielich-korona-pręcikowie-słupkowie powstaje kwiat mutanta o okółkach: kielich-kielich-słupkowie-słupkowie (rys. 1). Istnieje szereg allelicznych mutantów, gdzie gen *deficiens* nie jest całkowicie wyłączony, co powoduje powstanie fenotypów pośrednich. Niemal równocześnie badania nad mutantami homeotycznymi kwiatów rzodkiewnika doprowadziły do sklonowania genu *agamous* [52], którego mutacja powoduje powstanie kwiatu o następującym układzie okółków: (kielich-korona-korona)_n, gdzie n=2–7, co oznacza prawie nieograniczone pojawianie się okółków organów kwiatowych (rys. 1). Obydwa opisywane geny pełnią więc kluczową rolę w ustaleniu tożsamości okółków kwiatowych. Dalsza genetyczna i molekularna analiza tych i innych genów warunkujących morfogenezę kwiatu doprowadziła do stworzenia uproszczonego modelu, zgodnie z którym w formowaniu kwiatu biorą udział geny o trzech funkcjach: *a*, *b* i *c* (rys. 1). Funkcja *a* odpowiada za pierwszy i drugi okółek, funkcja *b* – za drugi i trzeci okółek, a *c* – za trzeci i czwarty okółek. W pierwszym i czwartym okółku (działki kielicha i słupek) geny funkcji, odpowiednio *a* i *c*, działają niezależnie, podczas gdy organogeneza w drugim i trzecim okółku (płatki korony i pręciki) jest zależna od kombinacji działania genów funkcji *a* i *b* oraz *b* i *c* [46]. Dodatkowo geny funkcji *a* i *c* działają antagonistycznie zawężając wzajemnie swoje działanie odpowiednio do pierwszego i drugiego oraz trzeciego i czwartego okółka. Przykładem potwierdzającym słuszność takiego twierdzenia jest to, że u innego mutanta rzodkiewnika, nazwanego *apetala2*, gdzie wyłączona jest funkcja *a* (w miejsce działek kielicha i płatków korony powstają odpowiednio struktury słupkopodobne i pręciki), gen *agamous* (funkcja *c*) ulega ekspresji we wszystkich czterech okółkach, podczas gdy w roślinie typu dzikiego występuje tylko w trzecim i czwartym okółku [7].

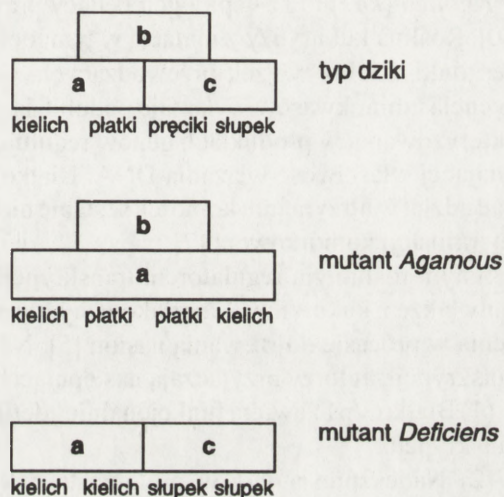
Wspólną cechą produktów omawianych genów jest wysoka homologia na odcinku 59 aminokwasów do dwóch znanych regulatorów transkrypcji MCM1 (ang. *micro-*

TABELA 1. Ważniejsze roślinne regulatory transkrypcji biorące udział w procesach rozwojowych

Nazwa genu	Gatunek	Domena funkcyjna kodowanego białka	Funkcja	Piśmiennictwo
<i>deficiens, globosa, plena</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	MADS-box	homeotyczna transformacja organów kwiatowych	[4,45,46,48]
<i>squamosa</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	MADS-box	transformacja z merystemu kwiatostanowego w kwiatowy	[20]
<i>apetala1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>			[27]
<i>floricaula</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	domena kwasowa	podobna jak s <i>Squamosa</i>	[6]
<i>leafy</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>		i bogata w prolinę	[51]
<i>agamous, apetala3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MADS-box	homeotyczna transformacja organów kwiatowych	[21,52]
<i>glabrous1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	jak w Myb	różnicowanie włosków	[28,35]
<i>knotted</i>	<i>Zea mays</i>	jak homeodomena	utrzymanie komórek w stanie nieodróżnicowanym?	[47,50]
<i>viviparous-1</i>	<i>Zea mays</i>	domena kwasowa	dojrzewanie nasion	[5,18]

chromosome maintenance, drożdże) i SRF (ang. *serum responsive factor*, człowiek). Podobieństwo to było podstawą do zaproponowania wspólnej nazwy tego rejonu białka jako MADS-box (MCM1-Agamous-Deficiens – SRF) [45]. MADS-box składa się z domeny wiążącej DNA, tj. grupy aminokwasów o silnym ładunku dodatnim i o strukturze HTH, oraz z domeny silnie hydrofobowej, prawdopodobnie dimeryzacyjnej. Wyniki symulacji komputerowej i dedukcji na podstawie homologii, zostały potwierdzone doświadczalnie. Domena wiążąca DNA oddziałuje z elementem zwanym P-box [46] oraz z sekwencjami zbliżonymi, prawdopodobnie obecnymi w promotorach genów regulowanych [32]. Domena dimeryzacyjna powoduje, w przypadku czynnika Deficiens, powstanie heterodimeru z innym czynnikiem z rodziny MADS-box, Globosa (także funkcja *b*) [46]. Zarówno wspomniany czynnik Deficiens, Agamous, jak i inne z rodziny MADS-box u wyżlinu i rzodkiewnika w większości ulegają bardzo specyficznej ekspresji, ograniczonej do primordiów, potem niektórych tkanek w organach kwiatowych przyporządkowanych funkcji danego genu (*a*, *b* lub *c*). W dalszych badaniach wyizolowano z wyżlinu i rzodkiewnika jeszcze kilka genów typu MADS-box, uczestniczących w morfogenezie kwiatu – *apetala1* i 3, *plena* i *squamosa* [4,20,21,27] (tab. 1). Jednak ten ostatni odpowiada za transycję merystemu vegetatywnego w kwiatowy, wobec czego nie należy do żadnej z omawianych funkcji i działa we wcześniejszym okresie rozwoju.

Coen et al. [6] badając geny homeotypyczne kontrolujące tworzenie merystemu kwiatowego wyżlinu sklonowali gen *floricaula* (*flo*) [6], który ulega ekspresji w primordiach kwiatowych i prawdopodobnie bierze udział we wcześniejszych procesach niż geny opisywane wyżej. Gen ten nie wykazuje istotnej homologii do sekwencji kodującej MADS-box, ale przypuszczalne białko zawiera bogaty w prolinę N-koniec oraz odcinek o znacznej kwasowości, co wskazuje na możliwość wiązania DNA i prawdopodobnie wpływu na transkrypcję. Autorzy spekulują o możliwej roli czynnika *Floricaula* w aktywacji genów ulegających ekspresji przy przejściu od merystemu



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie funkcji *a*, *b* i *c* genów typu MADS-box, biorących udział w morfogenezie kwiatu; poszczególne okółki opisane są następująco: kielich, korona, przęciki, słupek; kielich powstaje przy ekspresji genów funkcji *a*, korona przy równoczesnej ekspresji genów funkcji *a* i *b*, przęciki przy *b* i *c*, słupek przy *c*; fenotyp mutantu *Agamous* u rzodkiewnika powstaje, gdy uszkodzona jest funkcja *c*, a geny funkcji *a* ulegają ekspresji we wszystkich okółkach; fenotyp mutantu *Deficiens* powstaje, gdy wyłączona jest funkcja *b* (przerysowane za [7], częściowo zmienione)

kwiatostanowego do kwiatowego. Odpowiednikiem i homologiem genu *flo* u daleko spokrewnionego rzodkiewnika jest gen *leafy (lfy)* [51].

Kolejnym przykładem udziału regulatorów transkrypcji w procesach rozwojowych roślin jest gen *glabrous1 (gl1)* [28], który wyizolowano z rzodkiewnika. *Gl1* jest włączony w mechanizm różnicowania pojedynczych komórek epidermy liści i pędu podczas powstawania włosków. Gen wyizolowano, a jego hipotetyczny produkt wykazuje homologię z rodziną białek typu Myb (także białka wiążące DNA). Przypuszcza się, że *Gl1* aktywuje produkcję w przylistkach określonego morfogenu, który dyfunduje do liści i powoduje rozwój swoistych komórek epidermy we włoski [35].

Knotted (kn1) to następny gen będący prawdopodobnie regulatorem transkrypcji [50]. Roślina kukurydzy z mutacją w tym locus tworzy na liściach charakterystyczne kieszonki wzdłuż wiązek przewodzących. Gen sklonowano, a wydedukowana sekwencja aminokwasów wykazuje podobieństwo do homeodomeny, pierwotnie scharakteryzowanej w produktach genów regulujących embriogenezę muszki owocowej i mającej właściwość wiązania DNA. Białko KN1 w roślinach typu dzikiego może brać udział w utrzymaniu komórek w stanie niezróżnicowanym i działać jako regulator determinacji komórkowej [47].

Innym roślinnym regulatorem transkrypcji jest gen *viviparous-1 (vp-1)* wyizolowany także z kukurydzy. Zaindukowany transpozonom mutant wykazuje silne zaburzenia w procesie dojrzewania nasion [5]. Na poparcie hipotezy, że jest to regulator transkrypcji, autorzy przytaczają następujące argumenty:

(1) Białko Vp1 zawiera funkcjonalnie zdefiniowaną, kwasową domenę aktywującą transkrypcję.

(2) Nadekspresja *vp1* w protoplastach kukurydzy daje silną, specyficzną dla promotora aktywację kontransfekowanego konstruktu *em-gus* (gdzie promotor genu *em* jest przypuszczalnym obiektem docelowego działania Vp1, *gus* jest genem reporterowym, kodującym glukuronidazę).

(3) Domena aktywująca Vp1 zachowuje swoją funkcję, gdy połączyć ją z domeną wiążącą DNA z drożdżowego GAL4 (regulator genów szlaku metabolicznego galaktozy), aktywując transkrypcję genu reporterowego z elementem rozpoznawanym przez GAL4 w promotorze [18]. Komputerowa analiza przypuszczalnej struktury białka potwierdziła specyficzne właściwości naładowanej ujemnie domeny [5].

4. REGULACJA TRANSKRYPCJI NA SZLAKACH BIOCHEMICZNYCH

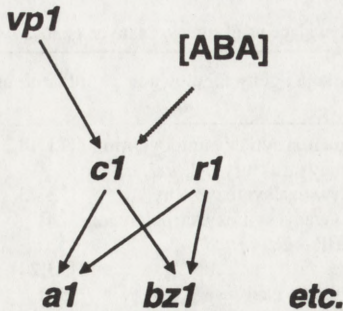
Dużą grupę zbadanych sekwencji stanowią czynniki przejawiające aktywność w innych niż morfogeneza procesach życiowych rośliny, takich jak regulacja pigmentacji i produkcji białek zapasowych czy aktywacja syntezy polimeraz. Lista obejmuje oczywiście różne gatunki i różne geny (tab. 2).

TABELA 2. Ważniejsze roślinne regulatory transkrypcji wpływające na ekspresję znanych genów

Nazwa genu	Gatunek	Domena funkcyjna kodowanego białka	Funkcja i geny regulowane	Piśmiennictwo
<i>c1</i>	<i>Zea mays</i>	jak w Myb	regulacja syntezy antocyjanin	[11,18,37,41]
<i>r1</i>	<i>Zea mays</i>	jak w Myc	– geny struktury: <i>a1</i> , <i>bz1</i> , <i>a2</i> etc.	
<i>opaque-2</i>	<i>Zea mays</i>	bZip	aktywacja syntezy zeiny	[23,43]
<i>3 afl</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	palce cynkowe	aktywacja syntezy karboksylazy RuBP – geny <i>rbcS</i>	[24]
<i>gt1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	HTH	jw.	[13,24]
<i>taf-1</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	BZip	regulacja ekspresji genów z elementami <i>G-box</i> i Motywem I w promotorze, jak <i>rbcS</i> , <i>rab</i> <i>16A-D</i> (ryż), <i>lea</i> (bawełna) i in.	[34]
<i>hbp1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	jw.	ekspresja genu histonu <i>h3a</i>	[49]
<i>embp-1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	jw.	ekspresja genu <i>em</i>	[15]
<i>tfIID</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	jak w TFIID	transkrypcja przy udziale polimerazy RNAII – wiąże się do <i>TATA-box</i>	[10]

* ang. *basic zipper* = suwak leucynowy + rejon zasadowy

Szlak biosyntezy antocyjanin u kukurydzy jest doskonałym systemem do badań nad molekularnymi podstawami regulacji genów roślinnych. Dzięki bogatej kolekcji mutantów sklonowano wiele genów regulatorowych (*b*, *c1*, *p1*, *r*, *vp1*, *dek*) i genów struktury szlaku biosyntezy antocyjanin (*c2*, *a1*, *a2*, *bz1*, *bz2*, *pr*) oraz scharakteryzowano interakcje między nimi. Gen regulatorowy *c1* jest potrzebny do syntezy antocyjanin w warstwie aleuronowej i tkankach skutellum ziarniaków kukurydzy. Molekularna analiza wykazała homologię do protoonkogenu *myb* w części kodującej zasadową sekwencję, która jest odpowiedzialna za wiązanie DNA [11, 37]. Białko C1 zawiera również krótką domenę kwasową o funkcji aktywatorowej. Alleliczna forma tego genu, *c1-I*, także hamuje tworzenie barwnika. Jest to dominujący mutant o działaniu negatywnym, prawie identyczny w obrębie domeny wiążącej DNA, natomiast w obrębie domeny kwasowej ładunek ujemny jest zmniejszony [38]. Gen *c1-I* w układzie heterozygotycznym nie wpływa na poziom transkryptu *c1*. Wskazuje to na działanie *c1-I* jako represora transkrypcji. Innym genem regulatorowym szlaku biosyntezy antocyjanin jest *r1*, którego produkt zawiera strukturę *helix-loop-helix*, homologiczną do domeny wiązania DNA białka Myc. Pomiędzy *r1* i *c1* prawdopodobnie zachodzi interakcja przy aktywacji niektórych genów struktury szlaku antocyjanin [41] (rys. 2). Do sieci współdziałania genów regulujących biosyntezę antocyjanin należy wspomniany już gen *vp1*, który obok regulacji procesu dojrzewania nasion i obecności enzymów w warstwie aleuronowej warunkuje gromadzenie barwników antocyjaninowych w zarodku [18]. Mutacja *vp1* powoduje zablokowanie wymienionych procesów, a także wykazuje obniżoną wrażliwość na kwas absycynowy (ABA, hormon roślinny, ważny podczas dojrzewania nasion). Pomiędzy *vp1* i *c1* ma miejsce oddziaływanie epistatyczne, co przejawia się brakiem ekspresji genu *c1* u mutantu *vp1*. Hamowanie syntezy antocyjanin spowodowane jest przez mutację genu



Rys. 2. Schemat regulacji biosyntezy antocyjanin u kukurydzy; geny regulatorowe *c1* i *r1* wymagane są do ekspresji genów strukturalnych *a1* i *bz1*; *Vp1* i nieznanym regulator, zależny od ABA, regulują *c1* w czasie dojrzewania nasion (przerysowane za [18])

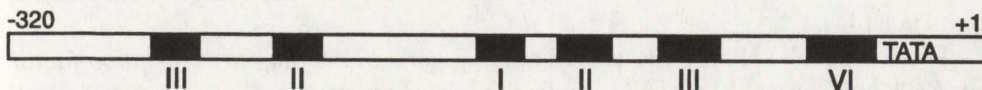
vp1 jest jednak warunkowe i może być zniesione przez usunięcie ziarniaków z kolby przed desykcją i dalsze ich kiełkowanie na pożywce i na świetle. W efekcie dochodzi do normalnej akumulacji antocyjanin w skutelum i warstwie aleuronowej. Doświadczenia wykonane nad delecyjnymi pochodnymi promotora genu *c1* wskazują na aktywację transkrypcji *c1* przez czynnik *Vp1* wraz z innym, jeszcze nie zbadanym regulatorem transkrypcji zależnym od ABA [18] (rys. 2). Przeglądając biblioteki cDNA jęczmienia i kukurydzy wyizolowano klony homologiczne do genu *c1* i innych z rodzi-

ny *myb* [29]. Dlatego należy się spodziewać, że w miarę poznawania ich funkcji hierarchiczna sieć regulacji aktywności genów będzie uzupełniana.

Innym regulatorem transkrypcji znalezionym u kukurydzy jest produkt genu *opaque-2* (*o2*) aktywujący syntezę zeiny (22 kD) białka z grupy prolamin – białek zapasowych ziarniaka [23]. Mutacja genu *o2* powoduje redukcję akumulacji zeiny o 60–80%. Białko O2 zawiera moduł o strukturze suwaka leucynowego (odpowiedzialny za dimeryzację) przylegający do grupy aminokwasów zasadowych (odpowiedzialnych za wiązanie DNA), a oddziaływanie białka z DNA sprawdzono *in vitro* i *in vivo* (w komórkach drożdży) przeprowadzając wiązanie O2 do promotora zeiny [43]. Badania nad ekstraktami jądrowymi endospermu kukurydzy wykazały obecność, oprócz O2, kilku innych białek rozpoznających charakterystyczny element w promotorze zeiny. Powyższy przykład jasno wskazuje na istnienie wielu czynników reagujących jednocześnie z promotorem pojedynczego genu. Występowanie w obrębie promotora kilku elementów rozpoznawanych przez różne czynniki pomnaża możliwości regulacji. Dobrym przykładem obrazującym powyższe stwierdzenie jest regulacja ekspresji białka małej podjednostki karboksylazy rybulozo-1,5-bisfosforanu, kluczowego enzymu do szlaku asymilacji CO₂. Białko to jest kodowane przez wielogenową rodzinę – *rbcS*, a jego ekspresja jest zależna od światła. U grochu, w promotorach tych genów, wyróżniono na odcinku 170 nukleotydów sześć konserwatywnych sekwencji – Box I do VI (rys.3) elementów, do których wiążą się różne czynniki jądrowe. Jednym z nich, wiążącym się do konstytutywnego elementu Box VI w promotorze *rbcS-3A* u tytoniu jest białko 3AF1 [24], którego wydedukowana sekwencja aminokwasów wykazuje istnienie domeny o strukturze palców cynkowych. Innym czynnikiem regulującym ekspresję *rbcS-3A* u grochu jest białko GT-1 (z domeną o strukturze HTH), wiążące się do dwóch elementów o promotorze – BoxII i BoxIII [13]. Analiza interakcji GT-1 z BoxII wskazuje na udział tego regulatora w reakcji *rbcS-3A* na światło [24]. W promotorach *rbcS* roślin dwuliściennych, oprócz

wymienionych powyżej sześciu konserwatywnych sekwencji, istnieją bardziej oddalone od miejsca startu transkrypcji *cis*-elementy.

Najszerzej bodaj przebadanym elementem jest sekwencja określana *G-box* [8,30]. Znajduje się ona również w promotorach wielu innych genów, takich jak: *chs* (ang. *chalcone synthase*) z pietruszki i wyżłinu oraz *adh* (ang. *alcohol dehydrogenase*) z rzodkiewnika, choć czasem w zmienionej trochę wersji [17,30]. Motyw I to nieco inny



Rys. 3. Schematyczne rozmieszczenie niektórych elementów w promotorze genu *rbcS-3A* u grochu, do których wiążą się czynniki 3AF1 (BoxVI) i GT-1 (BoxII, BoxIII) [13, 24]

element występujący w promotorach genów *rab16A-D* (ang. *rice ABA responsive*, ryż) i *lea* (ang. *late embryogenesis abundant*, bawełna), ale wykazujący wysoką homologię do *G-box*. TAF-1 (ang. *trans-acting factor*) jest czynnikiem wyizolowanym z tytoniu, wiążącym się do Motywu I i do *G-box* [34]. TAF-1 ma na C-końcu charakterystyczną strukturę suwaka leucynowego (dimeryzacja) z przylegającą sekwencją aminokwasów zasadowych (wiązanie DNA), a na N-końcu domenę kwasową, co sugeruje zdolność do aktywacji innych białek. W obrębie sekwencji zasadowej TAF-1 wykazuje wysoką homologię do innych roślinnych białek wiążących DNA jak HBP1 (ang. *h3a binding protein*) [49] i EmPB-1 (*em binding protein*) [15]. Sekwencje DNA rozpoznawanych przez nie elementów są bardzo podobne, co powoduje wiązanie zarówno TAF-1, jak i HBP1 do promotora genu histonu *h3a* pszenicy [34]. Wymienione HBP1 i EmBP-1 są roślinnymi regulatorami transkrypcji, zawierającymi strukturę suwaka leucynowego i sekwencję zasadową. Regulują one geny, odpowiednio *h3a* i *em* u pszenicy.

5. GENY WYIZOLOWANE NA ZASADZIE PODOBIENSTWA DO ZNANYCH REGULATORÓW TRANSKRYPCJI I INNE SPOSOBY ICH IDENTYFIKACJI

Większość wymienionych czynników transkrypcji została wyizolowana przez analizę mutantów lub z biblioteki ekspresyjnej przez wiązanie określonego elementu *in vitro*. Pojawia się także wiele doniesień o klonowaniu genów będących roślinnymi czynnikami transkrypcji, jedynie na podstawie homologii do zbadanych już genów z innych gatunków. Molekularne badania nad czynnikami transkrypcji u wyżłinu i rzodkiewnika unaocznili możliwość istnienia podobnego systemu regulacji rozwoju

kwiatu u wszystkich dwuliściennych. Potwierdzeniem tego stało się wyizolowanie ośmiu klonów cDNA z pomidora *tm-1/8* (ang. *tomato MADS-box*) [39], dwóch z petunii *fbp1* i *fbp2* (ang. *floral binding protein*) [2] i z tytoniu *ntglo* (*Nicotiana tabacum globosa*) [16], należących do rodziny MADS-box, które w dużej części charakteryzowały się ściśle określoną specyfiką ekspresji w obrębie kwiatu. Mechanizm regulacji morfogenezy kwiatu, oparty o aktywność genów typu MADS-box, wydaje się także działać u jednoliściennych, gdyż u kukurydzy wykryto homologi genu *agamous* z rzodkiewnika – *zag1* i *zag2* (*Zea mays agamous*), o podobnej specyfice ekspresji w okółkach [44].

W taki sposób sklonowano także homolog genu *tflIID* (ang. *transcription factor for RNA polymerase II*) z rzodkiewnika, kodujący podstawowy czynnik transkrypcji wiążący się z sekwencją *TATA-box* [10], oraz geny wykazujące podobieństwo do białek zawierających homeodomenę u muszki owocowej [42]. Jeden z tych ostatnich, *athb-1* (*Arabidopsis thaliana homeobox*) zawiera, obok homeodomeny wiążącej DNA, suwak leucynowy. W podobny sposób wyizolowano klony cDNA niehistonowych, chromosomowych białek HMG (ang. *high mobility group*) z kukurydzy [12], które u zwierząt wiążą sekwencje bogate w A/T przy udziale domeny zwanej HMG-box. Białka HMG wydają się oddziaływać na transkrypcyjnie aktywną chromatynę i są obecne w niezróżnicowanych, szybko dzielących się komórkach. Przypuszcza się więc, że niektóre białka HMG stymulują transkrypcję przez ułatwienie tworzenia aktywnych kompleksów inicjujących na matrycy DNA [33]. Dużo prac dotyczy badania funkcji wyizolowanych na podstawie podobieństwa, chociaż dla wielu z nich nie są znane mutanty lub też są one niezdolne do życia. Część mutantów przypuszczalnie pojawi się wkrótce jako efekt mutagenyzy przy pomocy transpozonów czy T-DNA. Natomiast inne geny uda się być może scharakteryzować przy użyciu transformacji konstrukcjami antysensownymi. Prowadzone są też inne badania, które wkrótce powinny doprowadzić do poznania nowych regulatorów transkrypcji. Należy do nich poszukiwanie i izolacja z ekstraktów jądrowych białek wiążących charakterystyczne elementy w promotorach różnych genów. Do równie ważnych badań należy szczegółowa analiza promotorów genów przez tworzenie hybryd: fragment promotora + gen reporterowy i funkcjonalne sprawdzenie *in vivo*, w roślinie lub w innym dogodnym układzie [3,26].

LITERATURA

- [1] AESCHBACHER RA, BENFEY PN. Genes that regulate plant development. *Plant Sci* 1992; **83**: 115–126.
- [2] ANGENENT GC, BUSSCHER M, FRANKEN J, MOL JNM, VANTUNEN A J. Differential expression of two MADS box genes in wild-type and mutant petunia flowers. *Plant Cell* 1992; **4**: 983–993.
- [3] BENFEY P N, CHUA N-H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 1990; **250**: 959–966.
- [4] BRADLEY D, CAPRENTER R, SOMMER H, HARTLEY N, COEN E. Complementary Floral Homeotic Phenotypes Result from Opposite Orientations of a Transposon at the *plena* Locus of *Antirrhinum*. *Cell* 1993; **72**: 85–95.

- [5] McCARTY D R, HATTORI T, CARSON C B, VASIL V, LAZAR M, VASIL I K. The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 1991; **66**: 895–905.
- [6] COEN E S, ROMERO J M, DOYLE S, ELLIOTT R, MURPHY G, CARPENTER R. *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 1990; **63**: 1311–1322.
- [7] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 1991; **353**: 31–37.
- [8] DONALD R G K, CASHMORE A R. Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J* 1990; **9**: 1717–1726.
- [9] FRANKEL A D, KIM P S. Modular structure of transcription factors: Implications for gene regulation. *cell* 1991; **65**: 717–719.
- [10] GASCH A, HOFFMANN A, HRIKOSHI M, ROEDER R G, CHUA N-H. *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature* 1990; **346**: 390–394.
- [11] GOFF S, CONE K C, FROMM M E. Identification of functional domains in the maize transcriptional activator *C1*: Comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes & Dev* 1991; **5**: 298–309.
- [12] GRASSER K D, FEIX G. Isolation and characterisation of maize cDNAs encoding a high mobility group protein displaying a HMG-box. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 2573–2577.
- [13] GREEN P J, KAY S A, CHUA N-H. Sequence-specific interactions of pea nuclear factor with light responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J* 1987; **6**: 2543–2549.
- [14] GUARENTE L, BIRMINGHAM-MCDONOGH O. Conservation and evolution of transcriptional mechanisms in eucaryotes. *TIG* 1992; **8**: 27–32.
- [15] GUILTINAN M J, MARCOTTE W R jr, QUATRANO R S. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 1990; **250**: 267–271.
- [16] HANSEN G, ESTRUCH J J, SOMMER H, SPENA A. *NTGLO*: a tobacco homologue of the *GLOBOSA* floral homeotic gene of *Antirrhinum majus*: cDNA sequence and expression pattern. *Mol Gen Genet* 1993; **239**: 310–312.
- [17] HARRISON M J, LAWTON M A, LAMB C J, DIXON R A. Characterisation of a nuclear protein that binds to three elements within the silencer region of a bean chalcone synthase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2515–2519.
- [18] HATTORI T, VASIL V, ROSENKRANS L, HANNAH L C, MCCARTHY D R, VASIL I K. The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *C1* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes & Dev* 1992; **6**: 609–618.
- [19] HORST A. Regulacja ekspresji genów eukaryotów. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 161–196.
- [20] HUIJSER P, KLEIN J, LOENNIG W-E, MEIJER H, SAEDLER H, SOMMER H. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J* 1992; **4**: 1239–1249.
- [21] JACK T, BROCKMAN L L, MEZEROWITZ E M. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* 1992; **68**: 683–697.
- [22] KATAGIRI F, CHUA N-H. Plant transcription factors: present knowledge and future challenges. *TIG* 1992; **8**: 22–27.
- [23] KODRZYCKI R, BOSTON R S, LARKINS B A. The *opaque-2* mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* 1989; **1**: 105–114.
- [24] LAM E, KANO-MURAKAMI Y, GILMARTIN P, NINER B, CHUA N-H. A metal dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell* 1990; **2**: 857–866.
- [25] LATCHMAN D S. Eucaryotic transcription factor. *Biochem J* 1990; **270**: 281–289.
- [26] LEYVA A, LIANG X, PINTOR-TORO J A, DIXON R A, LAMB C J. *Cis*-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 1992; **4**: 263–271.
- [27] MANDEL M A, GUSTAFSON-BROWN C, SAVIDGE B, YANOFSKY M F. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 1992; **360**: 273–277.
- [28] MARKS M D, FELDMAN K A. Trichome development in *Arabidopsis thaliana*. I. T-DNA tagging of the *Galbrous-1* gene. *Plant Cell* 1989; **1**: 1043–1050.
- [29] MAROCCO A, WISSENBACH M, BECKER D, PAZ-ARES J, SAEDLER H, SALAMINI F, ROHDE W. Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the *myb* oncoproteins. *MGG* 1989; **216**: 183–187.
- [30] DE LISLE A J, FERL R J. Characterisation of the *Arabidopsis Adh* G-box binding factor. *Plant Cell* 1990; **2**: 547–557.
- [31] MITCHELL P J, TIJAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 1989; **245**: 371–378.

- [32] NACKEN W K F, HUIJSER P, BELTRAN J-P, SAEDLER H, SOMMER H. Molecular characterisation of two stamen-specific genes, *tap1* and *fill*, that are expressed in the wild type, but not in the *deficiens* mutant of *Antirrhinum majus*. *Mol Gen Genet* 1991; **229**: 129–136.
- [33] NER S S. HMGs everywhere. *Current Biol* 1992; **2**: 208–210.
- [34] OEDA K, SALINAS J, CHUA N-H. A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds two a G-box-like motif conserved in plant genes. *EMBO J* 1991; **10**: 1793–1802.
- [35] OPPENHEIMER D G, HERMAN P L, SIVAKUMARAN S, ESCH J, MARKS M D. A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* 1991; **67**: 483–493.
- [36] PABO C O, SAUER R T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 1992; **61**: 1053–1095.
- [37] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, PETERSON P A, SAEDLER H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to *myb* proto-oncogene products with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO J* 1987; **6**: 3553–3558.
- [38] PAZ-ARES J, GHOSAL D, SAEDLER H. Molecular analysis of the C1-I allele from *Zea mays*: a dominant mutant of the regulatory C1 locus. *EMBO J* 1990; **9**: 315–321.
- [39] PNUELI L, ABU-ABEID M, ZAMIR D, NACKEN W, SCHWARZ-SOMMER ZS, LIFSCHITZ E. The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *Plant J* 1991; **1**: 255–266.
- [40] PTASHNE M, GANN A A F. Activators and targets. *Nature* 1990; **346**: 329–331.
- [41] ROTH B A, GOFF S A, KLEIN T M, FROMM M E. C1 and R1 dependent expression of the maize Bz1 gene requires sequences with homology to mammalian *myb* and *myc* binding sites. *Plant Cell* 1991; **3**: 317–325.
- [42] RUBERTI I, SESSA G, LUCCHETTI S, MORELLI G. A novel class plant proteins containing a homeodomain with closely linked leucine zipper motif. *EMBO J* 1991; **10**: 1787–1791.
- [43] SCHMIDT R J, KETUDAT M, AUKERMAN M J, HOSCHEK G. Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 1992; **4**: 689–700.
- [44] SCHMIDT R J, VEIT B, MANDEL M A, MENA M, HAKE S, YANOFSKY M F. Identification and molecular characterisation of ZAG1, the maize homolog of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOUS. *Plant Cell* 1993; **5**: 729–737.
- [45] SCHWARZ-SOMMER ZS, HUIJSER P, NACKEN W, SAEDLER H, SOMMER H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 1990; **250**: 931–936.
- [46] SCHWARZ-SOMMER ZS, HUE I, HUIJSER P, FLOR P J, HANSEN R, TETENS F, LOENNIG W-E, SAEDLER H, SOMMER H. Characterisation of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J* 1992; **11**: 251–263.
- [47] SMITH L G, GREENE B, VEIT B, HAKE S. A dominant mutation in the maize homeobox gene, *Knotted-1* causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates. *Development* 1992; **116**: 21–30.
- [48] SOMMER H, BELTRAN J-P, HUIJSER P, PAPE H, LOENNIG W-E, SAEDLER H, SCHWARZ-SOMMER ZS. *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J* 1990; **9**: 605–613.
- [49] TABATA T, TAKASE H, TAKAYAMA S, MIKAMI K, NAKATSUKA A, KAWATA T, NAKAYAMA T, IWABUCHI M. A protein that binds to a *cis*-acting element of wheat histone genes has a leucine zipper motif. *Science* 1989; **245**: 965–967.
- [50] VOLLBRECHT E, VEIT B, SINHA N, HAKE S. The development gene *Knotted-1* is a member of a maize homeobox gene family. *Nature* 1991; **350**: 241–243.
- [51] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, YANOFSKY M F, MEYEROWITZ E M. *Leafy* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 1992; **69**: 843–859.
- [52] YANOFSKY M F, MA H, BOWMAN J L, DREWS G N, FELDMANN K A, MEYEROWITZ E M. Agamous: an *Arabidopsis* homeotic gene whose product resembles transcription factors. *Nature* 1990; **346**: 35–39.

Otrzymano: 15.01.1994 r.

Przyjęto: 30.03.1994 r.

Adres autora: Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych, SGGW,
ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

AKTUALNE POGLĄDY NA REGULACJĘ HORMONALNĄ CIAŁKA ŻÓŁTEGO

CURRENT UNDERSTANDING THE HORMONAL REGULATION OF LUTEAL FUNCTION

Ewa GREGORASZCZUK

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanki, Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Pomimo podania w przedstawionej pracy ważnych i drobiazgowych danych dotyczących funkcji CL, nasza wiedza na temat czynników kontrolujących i mechanizmów odpowiedzialnych za długość fazy lutealnej, jest szczątkowa. Proces regresji ciała żółtego pod koniec cyklu jest nadal niewyjaśniony. Różnorodność parakrynowych i autokrynowych czynników w połączeniu z hormonami gonadotropowymi i steroidowymi uświadamia ważność dodatniego i ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy nimi w procesach steroidogenezy zachodzącej w CL. Większość tych czynników odkryto badając obecność w tkankach gonadalnych czynników, które pierwotnie identyfikowano w innych narządach. Do dziś nie jest wyjaśnione, jaka jest rola większości z nich w przekazywaniu lokalnych sygnałów regulujących funkcje gonad.

Słowa kluczowe: ciało żółte, steroidogeneza, regulacja endo-, para- i autokrynowa.

Summary. Despite the important advances detailed in this review, our understanding of the factors and mechanisms controlling the function of the corpus luteum is rudimentary. „Self-destructed process at the end of the cycle remains a mystery. The variety of numerous paracrine and autocrine factors along with gonadotropic and steroid hormones is shown and the importance of their positive and negative interactions for final differentiation of the CL are emphasized. The discovery of the various peptide factors in the gonads followed different paths. Most recently a number of factors has been identified because immunological or molecular probes have been used to search gonadal tissue for factors originally discovered elsewhere. Our understanding of the relationship of most of these peptides to the local signals necessary for gonadal function is still very elementary. For many of the factors local receptors have not yet been identified. As cellular and molecular approaches combine with physiological techniques, new information will be available to understand the issues of luteal dysfunction.

Key words: corpus luteum, paracrine and autocrine factors

WSTĘP

Ciałko żółte jest szczególnym gruczołem dokrewnym rozwijającym się ze ściany pęcherzyka jajnikowego po owulacji. W normalnym cyklu długość aktywności hormonalnej ciała żółtego jest ściśle określona. Po zapłodnieniu, w zależności od gatunku, jest gruczołem aktywnym steroidogenicznie do momentu utworzenia łożyska lub przez cały okres ciąży. Na podstawie aktualnych badań wiadomo, że regulacja funkcji lutealnej CL jest procesem kompleksowym. Po pierwsze CL syntetyzuje i wydziela inne hormony poza steroidami. Badania kodującej sekwencji mRNA dla białek endokrynowych (np. insulinę czy relaksynę) wskazują na szerszą zdolność sekrecyjną tkanki lutealnej niż sądzono wcześniej. Po drugie substancje produkowane lokalnie w tkance jajnikowej regulują funkcję lutealną w drodze parakrynowo-autokrynowej. Metabolity sterydów, kwasu arachidowego, czynniki wzrostu i cytokiny mogą działać jako regulatory wewnątrzlutealne.

Po trzecie prosty model działania hormonu na zasadzie łączenia się z receptorem został zastąpiony bardziej skomplikowanym, włączając w to regulatory, jakimi są białko G i metabolizm fosfoinozytoli, które mogą stymulować bądź hamować mechanizmy wewnątrzkomórkowe.

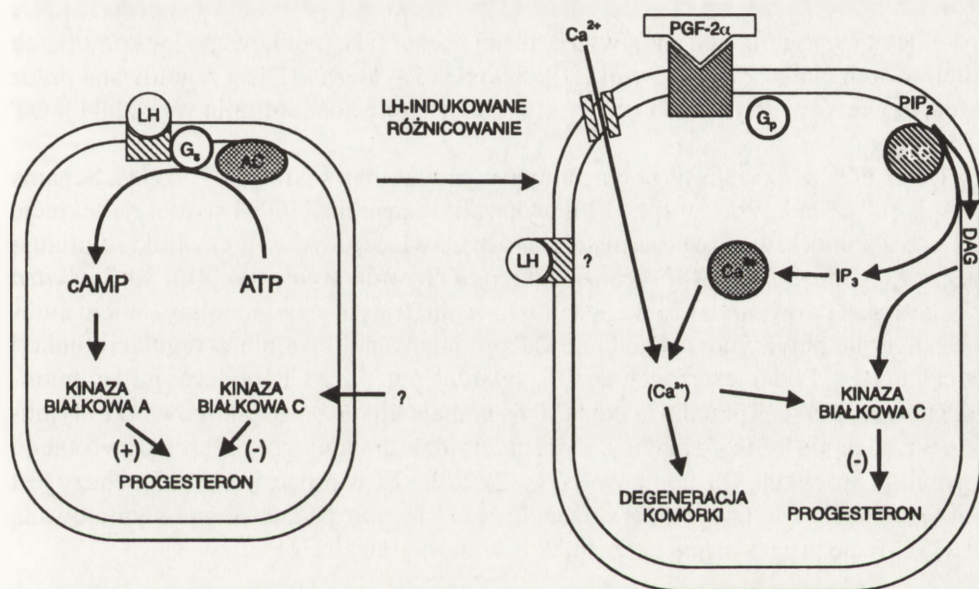
Po czwarte, identyfikacja morfologicznie i funkcjonalnie różnych subpopulacji komórek powiązanych ściśle ze sobą sugeruje skomplikowany układ komórkowy w tkance lutealnej. Doniesienie na temat czynników biorących udział w regulacji procesów steroidogenezy w CL wydaje się interesujące ze względu na zmiany w sposobie interpretacji endokrynowej i auto-parakrynowej regulacji funkcji CL.

SKŁAD KOMÓRKOWY CIAŁKA ŻÓLTEGO

Większość badaczy zajmujących się funkcją i regulacją hormonalną ciałek żółtych (CL) traktowało je jako strukturę jednorodną komórkowo. Bardzo długo uważano komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka za główny składnik tworzący po owulacji CL. Udział komórek osłonki wewnętrznej w tym procesie był pomijany. Dopiero w ostatnich latach zwrócono uwagę na ich rolę w funkcji CL. Wyizolowano i scharakteryzowano komórki duże i małe i przekonano się, że te dwie populacje komórkowe różnią się nie tylko wielkością, ale także funkcją i są regulowane przez różne czynniki auto- i endokrynowe. Pierwsze doniesienia o różnicy w regulacji steroidogenezy w komórkach dużych (KD) i komórkach małych (KM) pochodzą z badań prowadzonych na ciałkach żółtych zwierząt domowych. Wykazano, że LH jest hormonem stymulującym sekrecję progesteronu przez KM w drodze aktywacji systemu cAMP/kinaza białkowa A. Stwierdzono natomiast, że aktywacja kinazy C powoduje obniżenie

sekrecji progesteronu przez KM, nie jest wiadomo jednak, który hormon aktywowałby ten system w KM [105].

Oprócz wpływu na sekrecję progesteronu przez KM hormon luteinizujący stymuluje różnicowanie się KM w KD. Wprawdzie wykazano obecność receptora LH również w KD, nie stwierdzono jednak stymulacyjnego wpływu tego hormonu na sekrecję progesteronu. KD mają natomiast receptory $\text{PGF}_{2\alpha}$. Hormon ten, poprzez aktywację kinazy białkowej C działa hamująco na sekrecję progesteronu oraz na aktywację kinazy białkowej C w KM (rys. 1).



Rys. 1. Schemat przedstawiający różne mechanizmy kontroli sekrecji progesteronu przez komórki duże (KD) i komórki małe (KM) ciała żółtego [105]

ENDOKRYNOWA REGULACJA FUNKCJI CIAŁKA ŻÓŁTEGO

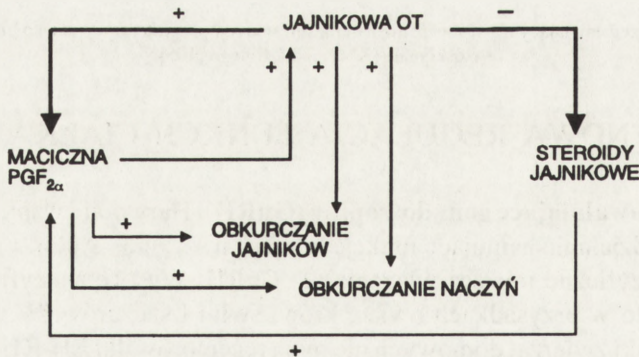
Czynniki uwalniające gonadotropiny (GnRH). Harwood i współ. [39] wykazali, że GnRH ma działanie hamujące funkcję lutealną u szczura. Autorzy ci wykazali, że jajnik ma specyficzne miejsca wiązania dla GnRH. Wysoce specyficzne receptory GnRH wykryto w przysadkach owiec, krów, świń i szczurów. W odróżnieniu od szczurów jajniki zwierząt domowych nie mają receptorów dla LH-RH. GnRH obniża stymulowaną przez folikulostymulinę (FSH) i prolaktynę (PRL) sekrecję progesterono-

nu poprzez wpływ na enzymy biorące udział w biosyntezie progesteronu i stymulowanie rozkładu progesteronu do nieaktywnych metabolitów [17, 78].

Luteolityczne działanie GnRH podanego *in vivo* stwierdzono u szczurów [3], małp [24,43] i kobiet [78]. W ostatnich latach [60] wykazano, że wprawdzie podanie egzogenego GnRH w 2–8 dniu cyklu powoduje statystycznie istotny wzrost sekrecji progesteronu, to jednak znosi wrażliwość komórek luteinowych na LH. Autorzy ci sugerują występowanie drugiego szczytu GnRH indukującego sekrecję LH w 8. dniu cyklu, co w konsekwencji daje wzrost wydzielania progesteronu z zanikiem jednak wrażliwości komórek luteinowych na późniejszą stymulację gonadotropinami.

Hormony nerwowej części przysadki: Lokalną syntezę oksytocyny (OT) potwierdzono wykazaniem ekspresji genu OT w CL krowy [4] oraz obecnością mRNA oksytocyny w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego i w komórkach luteinowych ciała żółtego świni [20]. Sekrecja i synteza OT jest regulowana przez wiele czynników. Wykazano ważną, stymulującą rolę gonadotropin w produkcji OT [53, 88].

Także $\text{PGF}_{2\alpha}$ okazała się potencjalnym stymulatorem sekrecji OT *in vivo*. Schams i współ. [88], Shukovski i współ. [100] wykazali, że insulina i IGF-I stymulują sekrecję OT przez komórki warstwy ziarnistej *in vitro*. Co więcej obydwa te czynniki stymulują ekspresję genu OT [26, 44]. Wzrost sekrecji OT zarówno *in vivo* [40], jak i *in vitro* [58, 59] obserwowano także po podaniu norepinefryny i acetylocholiny. Wielu autorów sugeruje parakrynowe działanie OT produkowanej lokalnie w regulacji funkcji lutealnej [61]. Podanie egzogennej OT powoduje luteolizę CL, podczas gdy immunizacja przeciwko OT przedłuża cykl [104]. Istnieje hipoteza, że jajnikowa OT stymuluje wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ z macicy, która na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego stymuluje produkcję OT jajnikowej (rys. 2). Rola OT w procesie steroidogenezy jest mniej poznana. Tan i współ. [97] wykazali, że OT hamuje podstawową i stymulowaną hCG sekrecję progesteronu przez ludzkie komórki lutealne *in vitro*.



Rys. 2. Postulowana droga luteolitycznego wpływu oksytocyny (OT) i jej interakcja z prostaglandyną $\text{F}_{2\alpha}$, wpływ stymulujący wpływ hamujący [52]

Krótko po wykazaniu obecności OT w jajniku szcurek, Wathes [105] donosi o obecności *arginino-wazopresyny* (AVP) w ludzkim i krowim jajniku. Stężenie tego hormonu jest jednak ponad trzykrotnie niższe niż OT. Obecność tego peptydu stwierdzono także w płynie pęcherzykowym u kobiet [99, 105]. Lim i współ. [56] wykazali obecność immunoreaktywnej AVP w komórkach luteinowych, a także supresyjny wpływ gonadotropin na poziom AVP. mRNA arginino-wazopresyny stwierdzono w jajnikach szcurek [25] i w CL krowy [47]. Niewiele jest danych dotyczących wpływu wazopresyny na produkcję steroidów przez jajnik. Przypisuje się jej podobnie jak OT działanie parakrynowe. Z badań Vargi i współ. [103] wynika, że AVP obniża sekrecję estradiolu i progesteronu w jajniku szcurek, ale działanie to związane jest raczej ze zmniejszeniem światła naczyń. Nie obserwowano bowiem zmian w sekrecji progesteronu przez komórki luteinowe szcurek po podaniu AVP *in vitro* [71]. Z drugiej strony Pitzel i współ. [80] obserwowali obniżenie podstawowej i stymulowanej przez LH produkcji progesteronu i androstenedionu oraz brak wpływu AVT na sekrecję estradiolu przez komórki luteinowe świni *in vitro*.

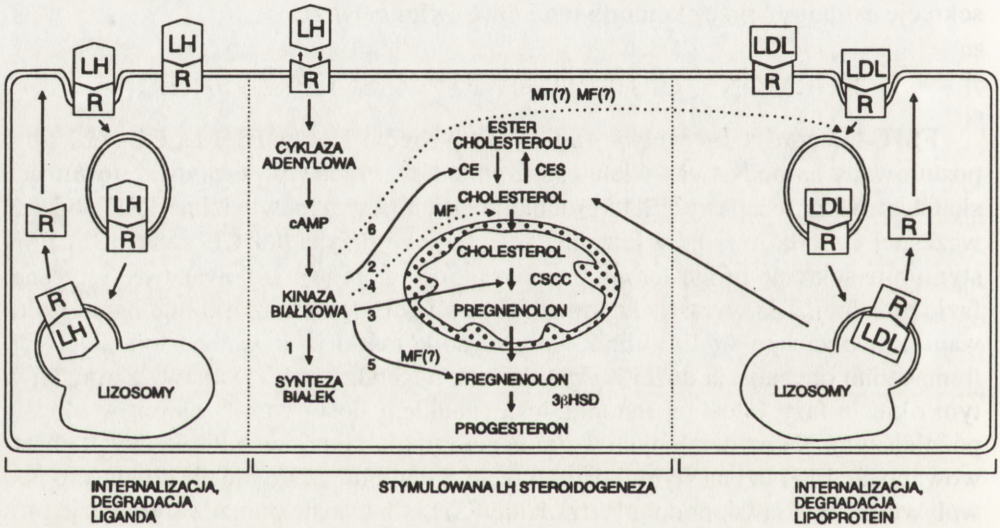
HORMONY GRUCZOŁOWEJ CZĘŚCI PRZYSADKI

FSH – bezpośredni wpływ na CL. Bezpośredni wpływ FSH na CL kobiet był postulowany na podstawie wielu eksperymentów. *In vitro* wykazano, że formujące się CL zawiera receptory FSH i produkuje estradiol w odpowiedzi na FSH podczas wczesnej i środkowej fazy lutealnej [46, 66]. W przypadku CL świni [31] FSH stymuluje sekrecję progesteronu przez komórki luteinowe izolowane we wczesnej fazie lutealnej. Ten wyraźny luteotropowy wpływ FSH na komórki luteinowe izolowane z tworzącego się CL i brak wpływu na komórki izolowane z dojrzałego CL tłumaczono obecnością dużej ilości komórek pochodzących z warstwy ziarnistej w tym okresie fazy lutealnej i stopniowym spadkiem ilości tych komórek w okresie późniejszym. Na rozdzielonych w gradiencie fikołu komórkach luteinowych obserwowano, że FSH działa stymulując sekrecję estradiolu, czego nie obserwowano pod wpływem LH. Prawdopodobnie działanie FSH odbywa się poprzez stymulację aromatazy w komórkach luteinowych, co obserwowali Erickson i współ. [21]. Wykazanie, że dożylnie wstrzyknięcie oczyszczonego FSH kobietom we wczesnej i środkowej fazie lutealnej powoduje wzrost poziomu estradiolu, a nie progesteronu w krążącej krwi, dostarcza dodatkowych dowodów, że FSH może uczestniczyć w regulacji produkcji estradiolu podczas cyklu menstruacyjnego [77].

LH – MECHANIZM DZIAŁANIA W CL

W CL zarówno kobiet, jak i naczelnych wykazano obecność wysoce specyficznych miejsc wiązania dla LH/hCG. W tkankach docelowych wiązanie LH/hCG z recepto-

rem błonowym powoduje aktywację cykazy adenylanowej i produkcję cAMP z adozynotrifosforanu (rys. 3). W dalszym łańcuchu reakcji następuje aktywacja zależnej od cAMP kinazy białkowej A, czego wynikiem jest fosforylacja wewnątrzkomórkowa białek i w konsekwencji zmiany w aktywności komórek. Aktywacja kinazy białkowej zależnej od cAMP wydaje się odgrywać ważną rolę w regulacji steroidogenezy przez LH. Ilość receptorów LH/hCG zmienia się podczas trwania fazy lutealnej, wzrasta od wczesnej do środkowej fazy lutealnej i spada w późnej fazie lutealnej [9]. Zmiana ilości receptorów jest ściśle skorelowana z reaktywnością na gonadotropiny, aktywnością cykazy adenylanowej i produkcją progesteronu przez ciało żółte. Sugeruje to jakościowe i funkcjonalne powiązanie między ilością receptorów i odpowiedzią wewnątrzkomórkową [22, 35].



Rys. 3. Schemat przedstawiający wewnątrzkomórkowy mechanizm steroidogenezy stymulowanej hormonem luteinizującym (LH); LH wiąże się z receptorem błonowym i aktywując cyklazę adenylanową powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cAMP i aktywację kinazy białkowej; aktywacja kinazy białkowej stymuluje: (1) syntezę białek, (2) aktywację estrów cholesterolu (CE), (3) aktywację kompleksu enzymów biorących udział w odszczepieniu bocznego łańcucha cholesterolu (MF), (4) stymulację transportu cholesterolu do mitochondrium, (5) stymulację transportu pregnenolonu poza mitochondrium, (6) ułatwia wykorzystanie niskocząsteczkowych lipoprotein (LDL) [75]

Indukcja receptorów lipidów o niskiej masie cząsteczkowej (LDL) w komórkach warstwy ziarnistej pod wpływem hCG [27] i stymulacja esterazy cholesterolowej pod wpływem LH [75] pozwala wnioskować, że hormon luteinizujący wpływa na wykorzystanie cholesterolu jako prekursora syntezy progesteronu. W ostatnich latach wy-

kazano, że gonadotropiny regulują poziom dehydrogenazy hydroksysteroidowej (Δ^5 , 3β -HSD) enzymu konwertującego pregnenolon do progesteronu w komórkach luteinowych [11].

PROLAKTYNA (PRL) – ROLA W REGULACJI FUNKCJI LUTEALNEJ

W ostatnich latach wykazano zależny od dawki wpływ PRL na sekrecję progesteronu przez luteinizujące komórki warstwy ziarnistej izolowane z pęcherzyków świni [10] i komórki luteinowe izolowane z ciałek żółtych szczura [28]. Obecność receptorów dla PRL wykryto w błonach komórek luteinowych świni [6], ludzi [7, 63]. W pracach: Stokłosowa i Gregoraszczyk [95] oraz Gregoraszczyk [33, 34] wykazano, że PRL dodana do hodowli komórek luteinowych świni izolowanych na krótko po owulacji stymuluje sekrecję progesteronu. Wykazano także [32], że duże komórki luteinowe (KD) są odpowiedzialne za wzrost sekrecji progesteronu pod wpływem PRL sugerując, że jest ona jednym z hormonów gonadotropowych decydującym o steroidogenezie ciałka żółtego bezpośrednio po owulacji. Rillema i współ. [83] badając wpływ PRL na gruczoł mleczny myszy sugerowali inozytylotrifosforan (IP_3) i diacylglicerol (DAG) jako drugie przekaźniki w regulacji steroidogenezy pod wpływem PRL. W ostatnich latach sugeruje się rolę PRL w zużytkowaniu lipidów o masie cząsteczkowej zarówno wysokiej [68], jak i niskiej [10].

PARAKRYNOWA I AUTOKRYNOWA REGULACJA FUNKCJI CL

CL produkuje liczne substancje, które modułują lokalnie funkcję CL poprzez działanie autokrynowo-parakrynowe. Należą do nich : sterydy, prostaglandyny, białka jajnikowe, takie jak : inhibina, relaksyna, czynniki wzrostu, cytokiny.

STEROIDY: Estrogeny. Rola estradiolu w funkcji komórek luteinowych jest nadal niejasna. Hormon ten uważany był za czynnik luteolityczny u naczelnych i kobiet, ponieważ podanie systemowe lub bezpośrednio do CL powodowało jego regresję. Natomiast u świni hormon ten uważany był za czynnik luteotropowy u [14]. Nowsze badania Van Meuleon [102] wskazują, że podanie małych fizjologicznych dawek E_2 do światła macicy pozostaje bez wpływu na długość życia ciałka żółtego u świn nieciążarnych. Brak luteotropowego wpływu E_2 potwierdziły badania Teketey i Armstrong [100], którzy obserwowali obniżenie stymulowanej LH sekrecji progesteronu przez małe komórki luteinowe oraz podstawowej i stymulowanej LH sekrecji progesteronu przez komórki duże pod wpływem E_2 . Rosenkraus i współ. [86] uważają, że estradiol działa hamująco na sekrecję $PGF_{2\alpha}$ oraz zmienia stosunek $PGE:PGF_{2\alpha}$. Gregoraszczyk [34] sugeruje, że wzrastający poziom estradiolu może być czynnikiem wpływającym na wzrost pęcherzyków następnej generacji.

Ponieważ estrogeny działają na komórkę poprzez specyficzne receptory, wykrycie ich obecności w poszczególnych tkankach i w różnych okresach cyklu potwierdziłoby para-autokrynowe działanie tego hormonu. Badania immunocytochemiczne prowadzone w celu wykrycia receptorów estradiolu w CL małp dały zaskakujące rezultaty. Receptory estrogenowe wykryto w jajowodzie małp, a także w króliczym CL. Nie stwierdzono natomiast ich obecności w jajniku małp. Wskazywałoby to na inne pozareceptorowe działanie estradiolu u naczelnych. Prawdopodobna jest droga przez zahamowanie aktywności enzymu 3β -hydroksy/ Δ^{4-5} izomerazy lub stymulację metabolizmu kwasu arachidowego. Rola estrogenów w funkcji ciała żółtego pozostaje nadal nie wyjaśniona.

Androgeny. Hild-Petito i wspł. [42] wykazali obecność receptorów androgenów w komórkach luteinowych małp. Gregoraszczuk [33] wykazała, że dodanie testosteronu do hodowli komórek luteinowych świni izolowanych z wczesnych, tworzących się ciałek żółtych powodował spadek sekrecji progesteronu i pozostawał bez wpływu na sekrecję estradiolu. Dodanie natomiast testosteronu do hodowli komórek luteinowych uzyskanych z dojrzałych ciałek żółtych powodował znaczny wzrost sekrecji progesteronu. Autorka wykazała, że począwszy od 10 dnia po owulacji testosteron staje się głównym hormonem luteotropowym, który w połączeniu z LH i PRL stymuluje wzrost syntezy progesteronu.

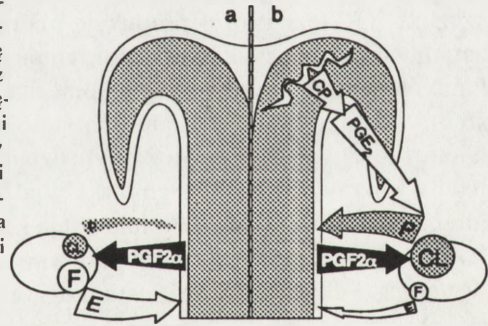
Progesteron. Stosując metody immunocytochemiczne wykazano obecność receptorów progesteronu w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka, w komórkach stromy jajnika i komórkach luteinowych małp [41]. Wykazano także ścisłą pozytywną korelację pomiędzy ilością receptorów a poziomem progesteronu. Wynika z tego, że progesteron może regulować funkcję lutealną w drodze autokrynowo-parakrynowej. Rola progesteronu w rozwoju, funkcji i regresji CL jest mało poznana. Ostatnie badania Gregoraszczuk [37] wykazały, że *in vitro* egzogenny progesteron hamuje indukowaną testosteronem produkcję estradiolu przez komórki lutealne świni izolowane podczas środkowej i późnej fazy lutealnej. Działa więc tu jako inhibitor aromatazy w okresie, gdy wysoki poziom estradiolu byłby zjawiskiem niewskazanim. Z innych bowiem doniesień Gregoraszczuk [36] wynika, że w środkowym okresie fazy lutealnej wysoki poziom estradiolu obniża stymulowaną hCG produkcję progesteronu *in vitro*.

Prostaglandyny: dualizm działania (pobudzająco-hamujący). $\text{PGF}_{2\alpha}$ uważana jest za klasyczny czynnik luteolityczny działający w drodze parakrynowo-autokrynowej. Potwierdzeniem działania lokalnego jest fakt stwierdzenia istnienia receptorów $\text{PGF}_{2\alpha}$ w komórkach ciała żółtego. Wysoki poziom syntezy $\text{PGF}_{2\alpha}$ obserwowano w CL we wczesnej fazie lutealnej, później spadek jej syntezy w środkowej fazie lutealnej i ponowny wzrost w późnej fazie lutealnej [48]. Prostaglandyna $\text{F}_{2\alpha}$ inhibuje stymulowaną gonadotropinami produkcję progesteronu przez komórki luteinowe izolowane w środkowej i późnej fazie lutealnej. Działanie hamujące $\text{PGF}_{2\alpha}$ obserwowano także *in vivo* po bezpośrednim podaniu do CL począwszy od środko-

wej fazy cyklu [109]. Masson i wspł. [61] wskazują na bezpośredni hamujący wpływ $\text{PGF}_{2\alpha}$ na sekrecję progesteronu przez komórki luteinowe izolowane podczas wczesnej fazy lutealnej cyklu menstruacyjnego. W odróżnieniu do $\text{PGF}_{2\alpha}$ traktowanie komórek luteinowych izolowanych z ciałek żółtych kobiet prostaglandyną E_2 (PGE_2) lub prostaglandyną I_2 (PGI_2) powoduje wzrost sekrecji progesteronu. Podobnie, inkubacja małych komórek luteinowych z PGD_2 , $6\alpha\text{PGI}$ i PGE_2 stymuluje produkcję cAMP [70] i sekrecję progesteronu [109]. Ponadto infuzja prostaglandyn E_2 , D_2 i I_2 razem z $\text{F}_{2\alpha}$ bezpośrednio do CL zabezpiecza przed przedwczesną luteolizą wywołaną przez egzogenną $\text{PGF}_{2\alpha}$ [108]. Najwyższą produkcję PGE_2 i PGI_2 *in vivo* obserwowano we wczesnej fazie lutealnej [38]. Stąd wniosek, że prostaglandyny są czynnikami zabezpieczającymi rozwijające się CL przed luteolizą.

Działanie pobudzające niektórych prostaglandyn odbywa się poprzez aktywację cyklazy adenylanowej i drugiego przekaźnika, jakim jest cAMP. Jednakże badania ostatnich lat wskazują, że $\text{PGF}_{2\alpha}$ aktywuje także fosfoinozytole. Ponadto, poprzez aktywację fosfolipazy C inhibuje stymulowaną gonadotropinami cyklazę adenylanową. Przedstawione powyżej dane potwierdzają bezpośrednią rolę prostaglandyn i innych metabolitów kwasu arachidowego w parakrynowo-autokrynowej regulacji funkcji CL (rys. 4).

Rys. 4. Model przedstawiający interakcję pomiędzy (a) macicą i jajnikiem podczas luteolizy i (b) macicą, jajnikiem i płodem podczas wczesnej ciąży; w trakcie luteolizy $\text{PGF}_{2\alpha}$ wydzielana przez macicę indukuje luteolizę przez wpływ na obniżenie sekrecji progesteronu przez ciało żółte (CL); następuje wzrost następnej generacji pęcherzyków, wzrost sekrecji estradiolu i w konsekwencji zahamowanie sekrecji $\text{PGF}_{2\alpha}$; w trakcie wczesnej ciąży wydzielane przez płód (CP) powoduje wzrost sekrecji PGE_2 przez macicę antagonizując działanie $\text{PGF}_{2\alpha}$; konsekwencją tego jest utrzymanie sekrecji progesteronu na wysokim poziomie, zahamowanie wzrostu pęcherzyków i sekrecji estradiolu [75]



HORMONY BIAŁKOWE

Inhibina. Na podstawie badań immunocytochemicznych wykazano istnienie podjednostki α inhibiny zarówno w komórkach warstwy ziarnistej, jak i luteinowych. mRNA dla podjednostek α i β inhibiny wykryto w muralnych komórkach warstwy ziarnistej [106] oraz komórkach luteinowych u naczelnych [16, 90]. Kontrowersyjna jest natomiast obecność mRNA inhibiny w komórkach luteinowych szczura [15, 67], owcy [84, 100]. Kaneko i wspł. [50] wykazali, że inhibina jest ważnym czynnikiem hamującym sekrecję FSH podczas środkowej fazy lutealnej. Wykazali także, że

immunoneutralizacja krążącej inhibiny powoduje gwałtowny wzrost dużej ilości pęcherzyków.

Relaksyna. Głównym źródłem relaksyny jest ciało żółte ciążowe. Odkryto jednak jej obecność wprawdzie w znacznie mniejszej ilości niż w CL ciąży, także w CL cyklu u świni [92]. Kontrola syntezy, sekrecji i rola relaksyny u nieciążarnych zwierząt nie jest wyjaśniona. Podczas ciąży u świni poziom relaksyny wzrasta ok. 20. dnia ciąży i osiąga maksimum ok. 110. dnia, aby potem obniżyć się gwałtownie 16 godz. przed porodem. Taylor i Clark [97, 98] wykazali, że sekrecja relaksyny przez komórki luteinowe kobiet izolowane podczas ciąży wzrasta po podaniu PGE₂ i jest hamowana po podaniu hCG, podczas gdy OT pozostaje bez wpływu.

Czynniki wzrostu. Czynniki wzrostu stanowią różnorodną grupę białek, które rozpoczynają lub podtrzymują wzrost komórek i ich różnicowanie. Odkrycie lokalnej syntezy i działania na miejscu czynników wzrostu w tkankach pęcherzyka jajnikowego sugeruje, że działają one jako wewnątrzjajnikowe regulatory follikulogenezy. Podobny model działania może istnieć także w CL.

Insulino-podobny czynnik wzrostu. Polipeptyd ten o niskiej masie cząsteczkowej, strukturą cząsteczki i sekwencją aminokwasów przypomina insulinę. W komórkach warstwy ziarnistej u gryzoni obserwowano ekspresję genów insulinowego czynnika wzrostu (IGF-I) [72]. IGF-I wpływa na wzrost produkcji cAMP stymulowany przez FSH oraz na wzrost ilości receptorów LH w szczurzych komórkach warstwy ziarnistej. W badaniach porównawczych na komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka szczura IGF-I zwiększa produkcję androgenów stymulowaną przez hCG. Można zatem wnioskować, że IGF-I koordynuje follikulogenezę poprzez parakrynowe działanie na syntezę androgenów w komórkach osłonki wewnętrznej oraz przez bezpośrednie autokrynowe działanie na steroidogenezę w komórkach pęcherzykowych. Nieliczne są jednak dane o lokalnym działaniu IGFs na ciało żółte. McArdle i Holtorf [64] wykazali, że IGF-I stymuluje wydzielanie progesteronu i OT przez komórki luteinowe krowy *in vitro*. Preinkubacja komórek luteinowych z PGs niweluje wpływ IGF-I na sekrecję OT, ale nie wpływa na sekrecję progesteronu. Można więc przypuszczać, że PG i czynniki wzrostu mogą współdziałać regulując w ten sposób aktywność sekrecyjną ciała żółtego. Erickson i współ. [21] wykazali np., że IGF-I stymuluje sekrecję estrogenów w luteinizujących *in vitro* ludzkich komórkach warstwy ziarnistej. Wykazano [76] obecność receptorów IGF w ludzkich CL, a ponadto nasilenie proliferacji receptorów IGF po zastosowaniu *clomiphenu*. Potwierdzono koncepcję, że IGF odgrywają ważną rolę w regulacji funkcji komórek luteinowych.

Fibroblastyczny czynnik wzrostu. Występuje w organizmie w postaci dwóch homologicznych form, kwaśnej aFGF i zasadowej bFGF, łączących się z tym samym receptorem. W CL zidentyfikowano tylko formę zasadową. Gospodarowicz i współ. [29] wykazali, że bFGF działa mitogennie na komórki endotelialne izolowane z CL. Neufeld i współ. [74] wykazali obecność mRNA swoistego dla bFGF w hodowanych komórkach warstwy ziarnistej krowy. Wykazali także, że bFGF i ekstrakt uzyskany

z tych komórek działają na ich aktywność podziałową, sugerując autokrynową rolę FGF. Działanie mitogenne bFGF stwierdzono także w okresie płodowym, co świadczyłoby o ważnej roli tego czynnika w procesie follikulogenezy rozwijającego się jajnika [30]. Miyamoto i współ. [69] wykazali, że bFGF, transformujący czynnik wzrostu (TGF β) oraz nerwowy czynnik wzrostu (NGF) działają bezpośrednio na CL regulując jego funkcję lutealną. Sugerują oni, że bFGF, TGF β i NGF są auto- i/lub parakrynowymi regulatorami funkcji lutealnej.

INNE CZYNNIKI MODULUJĄCE FUNKCJĘ LUTEALNĄ

Sugeruje się ścisłą korelację pomiędzy układem endokrynnym i immunologicznym. Obecność makrofagów monocytów i limfocytów stwierdzono m.in. w ciałkach żółtych [5]. Komórki te produkują substancję, takie jak: interleukiny (IL-1), interferon γ (INF γ) czy czynnik martwicy nowotworu (TNF) [73], będące ważnymi czynnikami regulującymi funkcję lutealną [82]. Rola tych czynników jest raczej hamująca. Interleukina 1 (IL-1) i interferon γ (INF γ) hamują stymulowaną FSH produkcję progesteronu, tworzenie się receptorów LH w komórkach warstwy ziarnistej [23, 51, 107], natomiast TNF α inhibuje sekrecję progesteronu i estradiolu przez komórki luteinowe [85]. Pepperel i współ. [79] wykazali, że neutrofile odgrywają ważną rolę w czynnościowej i strukturalnej regresji ciałka żółtego.

HORMONY BIAŁKOWE PIERWOTNIE IDENTYFIKOWANE W INNYCH GRUCZOŁACH

Propiomelanokortyna (POMC). Do białek określanych jako POMC należą:

- hormon adrenokortykotropowy (ACTH),
- hormon melanotropowy (MSH) i
- β -endorfiny.

Wprawdzie obecność tych białek pierwotnie wykryto w innych tkankach, później zlokalizowano je także w gonadach. Obecność POMC w jajnikach potwierdzono przez stwierdzenie obecności POMC mRNA [13]. Obecność immunoreaktywnego ACTH i β -endorfiny stwierdzono w komórkach luteinowych, komórkach warstwy ziarnistej i komórkach interstycjalnych [57, 96] szczura i myszy.

Proenkefaliny i prodynorfiny. W jajnikach szczura, chomika i owcy [54], a także w macicy i jajowodzie szczura i chomika [55] wykryto mRNA proenkefaliny identyczne jak w mózgu. Zarówno w jajniku, jak i jądrach wykryto obecność immunoreaktywnej met-enkefaliny, której mRNA mimo podobieństwa do mózgowego stanowi < 4% zawartości spotykanej w mózgu. Obecność mRNA prodynorfiny stwierdzono zarówno w tkance jajnika, jak i jądra. Gonadalny typ mRNA prodynorfiny jest krótszy o 200 nukleotydów od mózgowej [19]. Nie ma jednoznacznych doniesień dotyczących obecności tych substancji w ciałku żółtym.

System renina-angiotensyna II. Immunoreaktywną reninę zlokalizowano w komórkach osłonki wewnętrznej pęcherzyka kobiet. Stwierdzono także, że komórki te w hodowli wydzielają reninę do pożywki [18]. Cabrera i współ. [8] wykazali obecność reniny w komórkach luteinowych szczura. Poziom reniny w jajniku jest zależny od poziomu gonadotropin. Wzrost aktywności reniny obserwowano w okresie owulacji, a także po podaniu hCG [45]. Receptory angiotensyny II odkryto w gonadach, co wskazywałoby na jej znaczenie w regulacji parakrynowo-autokrynowej. Autoradiograficznie zlokalizowano angiotensynę II w komórkach warstwy ziarnistej dużych i małych pęcherzyków. Wykryto także mRNA dla angiotensyny w jajnikach szczurów. Pomimo zlokalizowania angiotensyny II w gonadach jej funkcja tutaj nie jest jasna. Stirling i współ. [94] wykazali, że angiotensyna II hamuje stymulowaną hCG produkcję progesteronu przez komórki luteinowe krowy i jest to w ścisłej korelacji z obniżeniem zawartości mRNA dla P450_{scc}. Wprawdzie dane na temat roli angiotensyny II na gonady są nieliczne, przypuszcza się, że może ona grać rolę w procesie owulacji, luteolizy i atrezji [1].

Inhibitory wiązania gonadotropin. LH-RBI – obecność tego czynnika zlokalizowano w ciałku żółtym szczurów. LH-RBI inhibuje steroidogenezę komórek luteinowych stymulowaną LH i hCG w sposób zależny od dawki poprzez obniżenie zdolności wiązania się gonadotropin z ich receptorami. Aktywność cząsteczki LH-RBI ekstrahowanego z jajników szczurzych różni się znacznie od aktywności LH-RBI ekstrahowanego z jajników świni. Jednakże zarówno w jednym, jak i drugim przypadku inhibitor ten występuje w postaci dwóch form cząsteczkowych (>10 000 Da i 3 800 Da) [1].

PODZIĘKOWANIE

Składam bardzo serdeczne podziękowanie Pani Profesor Stanisławie Stokłosowej za przeczytanie manuskryptu i Jej cenne krytyczne uwagi.

LITERATURA

- [1] ACKLAND JF, SCHWARTZ NB, MAYO KE, DODSON RE. Neurosteroidal signals originating in the gonads. *Physiol Rev* 1992; 72: 731–787.
- [2] AMSTERDAM A, ROTMENSCHS. Structure-function relationship during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev* 1987; 8: 309–337.
- [3] ATEN RF, BEHRMAN HR. Antigonadotropic effects of the bovine ovarian gonadotropin-releasing hormone-binding inhibitor/histone H2A in rat luteal and granulosa cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 11072–11075.
- [4] ATTARDI B, KEEPING HS, WINTER SJ, KOTSUJI F, TROEN P. Effect of inhibin from primate sertoli cells and GnRH on gonadotropin subunit mRNA in rat pituitary cell cultures. *Mol Endocrinol* 1989, 3: 1236–1242.

- [5] BAGAVANDROSS P, KUNKEL SL, WIGGINS RC, KEYES PL. Tumor necrosis factor- α (TNF α) production and localization of macrophages and T-lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 1988; **122**: 1185–1187.
- [6] BRAMLEY TA, MENZES GS. Receptors for lactogenic hormones in the porcine corpus luteum: properties and luteal phase concentrations. *J Endocrinol* 1987; **113**: 355–364.
- [7] BRAMLEY TA, STIRING D, SWANSTON IA, MENZIES GS, McNEILLY AS, BAIRD DT. Specific binding sites for gonadotropin-releasing hormone, LH/chorionic gonadotrophin, low-density lipoprotein, prolactin and FSH in homogenates of human corpus luteum. II. Concentrations throughout the luteal phase of the menstrual cycle and early pregnancy. *J Endocrinol* 1987; **113**: 317–327.
- [8] CABERA RR, GUARDIA DG, DeVITO E. Arenin-like enzyme in luteal tissue. *Mol Cell Endocrinol* 1986; **47**: 269–273.
- [9] CAMERON JL, STOUFFER RL. Gonadotropin receptors of the primate corpus luteum. II Changes in available luteinizing hormone and chorionic gonadotropin-binding sites in macaque luteal membranes during the nonfertile menstrual cycle. *Endocrinology* 1982; **110**: 2068–2075.
- [10] CHEDRESE PJ, RAJKUMAR K, LY H, MURPHY BP. Dose response of luteinized porcine granulosa cells to in vitro prolactin: dependency on pre-exposure to human chorionic gonadotropin. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; **66**: 1337–1340.
- [11] CHEDRESE PJ, THE VL, LOBRIE F, JUORIO AV, MUROPHY BB. Evidence for the regulation of 3 β hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA by human chorionic gonadotropin in luteinized porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990; **126**: 2228–2243.
- [12] CHEGINI N, LEI ZM, RAO CV, HANSEL W. Cellular distribution and cycle phase dependency of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea. *Biol Reprod* 1991; **45**: 506–513.
- [13] CHEN CL, CHANG CC, KREGER DT, BARDIN CW. Expression and regulation and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology* 1986; **118**: 2382–2389.
- [14] CONLEY AJ, FORD SP. Direct luteotrophic effect of oestradiol-17 β on pig corpora lutea. *J Reprod Fert* 1989; **89**: 125–139.
- [15] DAVIS SR, DEUCH F, MIKOLAIDIS J, CLEMENTS JA, FORAGA RG, KROZOWSKI Z, BURGER HG. Inhibin α subunit gene expression in the ovaries of immature female rats is stimulated by pregnant mare serum gonadotropins. *Biochem Biophys Res Comm* 1986; **138**: 1191–1195.
- [16] DAVIS SR, KROZOWSKI Z, McLACHLAN RI, BURGER HG. Inhibin gene expression in the human corpus luteum. *J Endocrinol* 1987; **115**: R21–R23.
- [17] DEVOTO L, VEGAM, NEVARRO V, SIR T, ALBA F, CASTRO O. Regulation of steroid hormone synthesis by human corpora lutea: failure of follicle-stimulating hormone to support steroidogenesis in vivo and in vitro. *Fertil Steril* 1989; **51**: 628–631.
- [18] DO YS, SHERROD A, LOBO RA, PAULSON RJ, SHINAGAWA T, CHEN S, KJOS S, HSUEH AW. Human ovarian theca cells are a source of renin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1957–1961.
- [19] DOUGLASS J, COX B, QUINN B, CIVELLI O, HERBERT E. Expression of the prodynorphin gene in male and female mammalian reproductive tissues. *Endocrinology* 1987; **120**: 707–713.
- [20] EISPANNIER R, PITZEL L, WUTTKE W, HAGENDORFF G, PREUB K, KARDALINAN E, SCHEIT KH. Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. *FEBS Lett* 1986; **204**: 37–40.
- [21] 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.
- [22] EYSTER KM, STOUFFER RL. Adenylate cyclase in the corpus luteum of the rhesus monkey. III Changes in basal and gonadotropin-sensitive activities during the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology* 1985; **117**: 1571–1583.
- [23] FAIRCHILD DL, PATE JL. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon γ . *Biol Reprod* 1991; **44**: 357–363.
- [24] FRASER HM, NESTOR JJ, VICKLEY BH. Suppression of luteal function by a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist during the early luteal phase in the stump-tailed macaque monkey and the effects of subsequent administration of human chorionic gonadotropin. 1987; **121**: 612–618.
- [25] FULLER PJ, CLEMENTS JA, TREGEAR GW, NIKOLAODIS PL, WHITFIELD PL, FUNDER JW. Vasopressin-neurophysis II gene expression in the ovary: studies in Sprague Dawley, Long Evans and Brattleboro rats. *J Endocrinol* 1985; **105**: 317–321.
- [26] FURUYA KC, McARKLE CA, IVELL KI. The regulation of oxytocin gene expression in early bovine luteal cells. *Mol Cell Endocr* 1990; **70**: 81–88.

- [27] GALOS TG, AUGUST AM, STRAUSS JF. Expression of low density lipoprotein receptor in cultured human granulosa cells: regulation by human chorionic gonadotropin, cAMP and sterol. *J Lipid Res* 1986; **27**: 1089–1096.
- [28] GITAY H, LINDERBAUM ES, KRAIEM Z. Prolactin action and interaction with gonadotropins in the ovary. W: Abstr. of the Proceedings of Bard Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy and Maintenance of the Corpus Luteum. Tel Aviv Israel 1988; 303.
- [29] GOSPODAROWICZ D, MASSOGILIA S, CHENG J, FUJII DK. Effects of fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex, brain cortex and corpus luteum capillaries. *J Cell Physiol* 1986; **127**: 121–136.
- [30] GOSPODAROWICZ DJ, PLONET J, FUJII KD. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express in gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology* 1989; **125**: 1266–1276.
- [31] GREGORASZCZUK EL. Effect of various doses of FSH upon luteal cell function in tissue culture. *Endocr Exper* 1989; **23**: 195–203.
- [32] GREGORASZCZUK EL. Different response of porcine large and small luteal cells to PRL in terms of progesterone and estradiol secretion in vitro. *Exp Clin Endocr* 1990; **96**: 234–237.
- [33] GREGORASZCZUK EL. The interaction of testosterone and gonadotropins in stimulating estradiol and progesterone secretion by cultures of corpus luteum cells isolated from pigs in early and midluteal phase. *Endocr Jap* 1991; **38**: 229–237.
- [34] GREGORASZCZUK EL. Is porcine corpus luteum autonomous with respect to LH, FSH and PRL through the entire luteal phase? Proc. of the 12th International Congress on Animal Reprod. 1992; **2**: 951–953.
- [35] GREGORASZCZUK EL. The dynamics of steroid hormone secretion and morphological changes of porcine corpora lutea isolated in 4 different time intervals of the luteal phase. *Endocr Regul* 1992; **4**:
- [36] GREGORASZCZUK EL, ZIEBA D. Effect of estradiol 17 β on basal and hCG stimulated progesterone secretion by porcine luteal cells isolated in various stages of the luteal phase. *Endocr J (Japan)* in press.
- [37] GREGORASZCZUK EL. Is progesterone a modulator of luteal steroidogenesis in pig? A tissue culture approach. *Folia Histochem Cytobiol* in press.
- [38] HAMBERGER L, HAHLIN M, LINDBLOM B. The role of prostaglandins and catecholamines for human corpus luteum function. W: The primate ovary. Stouffer RL. (ed.) New York: Plenum Press. 1987; 191–223.
- [39] HARWOOD PJ, CLAYTON RN, CATT KJ. Ovarian gonadotropin-releasing hormone receptors. I Properties and inhibition of luteal cell function. *Endocrinology* 1980; **107**: 407–413.
- [40] HEAP RB, WALTERS DE, HAMON MH, DAVIS AJ, FLINT APE, FLEEP IR, GOODE JA. Neurotransmitters and lymphatic-vascular transfer of prostaglandin F_{2 α} stimulate ovarian oxytocin output in sheep. *J Endocrinol* 1989; **122**: 147–158.
- [41] HILD-PETITO SA, STOUFFER RL, BRENNER RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988; **123**: 1896–1907.
- [42] HILD-PETITO SA, STOUFFER RL, BRENNER RM. Localization of the androgen receptor in the follicle and corpus luteum of the primate ovary during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 1991; **123**, 1896–1934.
- [43] HODGES JK, GREEN DI, COTTINGHAM PG, SAUER MJ, EDWARD SC, LIGHTMAN SL. Induction of luteal regression in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) by a gonadotropin-releasing hormone antagonists and the effects on subsequent follicular development. *J Reprod Fert* 1988; **82**: 743–752.
- [44] HOLTROF AP, FURUYA K, IVELL R, McARKLE CA. Oxytocin production and oxytocin messenger ribonucleic acid levels in bovine granulosa cells are regulated by insulin and insulin-like growth factor I: dependence on developmental status of the ovarian follicle. *Endocrinology* 1989; **125**: 2612–2620.
- [45] HSKOVITZ J, SEALEY JE, GLORIOSO N, LARAGH JG, ROSENWAKS Z. The ovarian prorenin-angiotensin system. *Ann NY Acad Sci* 1988; **541**: 179–189.
- [46] HUNTER MG, BAKER TG. Effect of hCG, cAMP and FSH on steroidogenesis by human corpora lutea in vitro. *J Reprod Fert* 1981; **63**: 285–294.
- [47] IVELL R, RICHLER D. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. *EMBO J* 1984; **3**: 2351–2354.
- [48] JOHNSON MS, OTTOBRE AC, OTTOBRE JS. Prostaglandin production by corpora lutea of rhesus monkeys; Characterization of incubation conditions and examination of putative regulators. *Biol Reprod* 1988; **39**: 839–846.
- [49] JONES LS, OTTOBRE JS, PATTE JL. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured luteal cells. *Mol Cell Endocr* 1992; **85**: 33–39.
- [50] KANEKO H, NAKAMISKI Y, TAYA K, KISKI II, WATANABE G, SASAMOTO S, HASEGAWA Y. Evidence that inhibin is an important factor in the regulation of FSH secretion during the mid-luteal phase in cows. *J Endocrinol* 1992; **136**: 35–41.

- [51] KASSON BG, GAROSPE WC. Effects of interleukins 1,2 and 3 on follicle stimulating hormone-induced differentiation of rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **62**: 103–111.
- [52] KHAN-DAWOOD FS, DAWOOD MY. Paracrine regulation of luteal function. *Clin Endocr Metab* 1986, **15**: 171–184.
- [53] KIEHMAN DJ, WALTERS DL, DANIEL SAJ, ARMSTRONG DT. Preovulatory biosynthesis and granulosa cell secretion of immunoreactive oxytocin by goat ovaries. *J Reprod Fert* 1989; **87**: 485–493.
- [54] KILPATRICK DL, HOWELLS RD, NOE M, BAILEY LC, UDEFRIENDS S. Expression of proenkephalin-like mRNA and its peptide products in mammalian testis and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 7467–7469.
- [55] KILPATRICK DL, ROSENTHAL JL. The proenkephalin gene is widely expressed within the male and female reproductive systems of the rat and hamster. *Endocrinology* 1986; **19**: 370–374.
- [56] LIM ATW, LOLAIT SJ, BARLOW JW, AUTELITANO DJ, TOH BH, BOUBLIK J, ABRAHAMS J, JOHNSTONCI, FUNDER JW. Immunoreactive arginine-vasopressin in Battleboro rat ovary. *Nature Lond* 1984; **310**: 61–64.
- [57] LOLAIT S, AUTELITANO DJ, LIM ATW, SMITH AI, TOH BH, FUNDER JW. Ovarian immunoreactive β endorphin and estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 1985; **117**: 161–168.
- [58] LUCK MR. Cholinergic stimulation through muscarine receptor of oxytocin and progesterone secretion from bovine granulosa cells undergoing spontaneous luteinization in serum free culture. *Endocrinology* 1990; **126**: 1256–1263.
- [59] LUCK MR, JUNCLAS B. The time course of oxytocin secretion from cultured bovine granulosa cells, stimulated by ascorbate and catecholamines. *J Endocrinol* 1988; **166**: 247–258.
- [60] MARTIN TL, SWANSON LV, APPELL LH, ROWE KE, STORMSHAK F. Response of the bovine corpus luteum to increased secretion of luteinizing hormone induced by exogenous gonadotropin releasing hormone. *Domestic Anim Endocrinol* 1990; **7**: 27–34.
- [61] MASSON S, JARRY H, TEICHMANN A, RATH W, KUHN W, WUTTKE W. Paracrine action of oxytocin, prostaglandin F_{2 α} and estradiol within the human corpus luteum. *J Clin Endocr Metab* 1992; **74**: 306–312.
- [62] MATHER JP, WOODRUFF TK, KRUMMEN LA. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Exp Biol Med* 1992; **210**: 1–15.
- [63] MATSUYAMA S, SHIOTA K, TAKAHASKI M. Possible role of transforming growth factor β as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology* 1990; **127**: 1561–1567.
- [64] McARDLE CA, HOLTROF AP. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: effects of insulin-like growth factor I, insulin and prostaglandin. *Endocrinology* 1989; **124**: 1278–1281.
- [65] MEDURI G, VUHAI-LUUTHI MT, JOLIVET A, MILGROM E. New functional zonation in the ovary as shown by immunohistochemistry of luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 1992; **131**: 366–373.
- [66] McNEILLY AS, KEVIN J, SWANSON IA, BRAMLEY TA, BAIRD DT. Changes in the binding of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin to human corpora lutea and pregnancy. *J Endocrinol* 1980; **87**: 315–323.
- [67] MEUNIER H, RIVIER C, EVANS RM, VALE W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin α , β A and β B subunits in various tissue predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 247–251.
- [68] MENON M, PEEGEL H, MENON KMJ. Lipoprotein augmentation of human chorionic gonadotropin and prolactin stimulated progesterone synthesis by rat luteal cells. *J Steroid Bioch* 1985; **22**: 79–84.
- [69] MIYAMOTO A, OKUDA K, SCHWEIGER J, 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* 1991; **135**: 103–114.
- [70] MOLSKNES TA, VANDE VOORT CA, STOUFFER RL. Stimulatory and inhibitory effects of prostaglandins on the gonadotropin-sensitive adenylate cyclase in the monkey corpus luteum. *Prostaglandins* 1987; **34**: 279–284.
- [71] MUKHOPADHYAY AK, KUMAR A, TAMS R, BOHNET HG, LEIDENBERGER FA. Oxytocin and vasopressin have no effect on progesterone production and cAMP accumulation by rat luteal cells in vitro. *J Reprod Fert* 1984; **72**: 137–141.
- [72] MURPHY LJ, BELL GI, FRIESEN HG. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 1987; **120**: 1279–1282.
- [73] NATHAN CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; **79**: 319–326.
- [74] NEUFELD G, FERRARA N, SCHWEIGERER R, MITCHELL R, GOSPODAROWICZ D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987; **121**: 579–603.
- [75] NISWENDER GD, NETT TM. The corpus luteum and its control. W: The physiology of reproduction. Knobil E and Neill J (eds.) New York Raven Press 1988; 489.
- [76] OBASIOLUCC, KHAN-DAWOOD FS, DAWOOD MY. Insulin-like growth factor I receptors in human corpora lutea. *Fertil Steril* 1992; **57**: 1235–1240.

- [77] OHARA A, TAI S, MORI T. Stimulatory effects of purified human follicle-stimulating hormone on estradiol production in the human luteal phase. *J Clin Endocr Met* 1989; **68**: 359–363.
- [78] PELLICER, MIRO F. Steroidogenesis in vitro of human granulosa-luteal cells pretreated in vivo with gonadotropin-releasing hormone analogs. *Fertil Steril* 1990; **2**: 590–596.
- [79] PEPPERELL JR, WOLCOTT K, BEHRAMN HR. Effects of neutrophils in rat luteal cells. *Endocrinology* 1992; **130**: 1001–1008.
- [80] PTZEL L, PROBSTI, JARRY H, WUTTKE W. Inhibitory effect of oxytocin and vasopressin on steroid release by cultured porcine luteal cells. *Endocrinology* 1988; **122**: 1780–1785.
- [81] POYSER NL. Prostaglandins in animal reproduction. *Biotech News and Inform* 1992; **4**: 17N–25N.
- [82] RILEY JCM, BEHRMAN HR. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology* 1991; **128**: 1749–1753.
- [83] RILLEAMA JA, ETINDI RN, OFENSEIN JP, WATERS SA. Mechanisms of prolactin action. W: The physiology of reproduction. E.Knobel and J.Neill (eds.). Raven Press, New York. 1988; 2714–2734.
- [84] RADGER RJ, STUCHBERY SJ, FINDLAY JK. Inhibin mRNAs in ovine and bovine ovarian follicles and corpora lutea throughout the estrous cycle and gestation. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **62**: 95–101.
- [85] ROBY K, WEED J, LYES R, TERRANOVA P. Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**: 1096–1102.
- [86] ROSENKRANS CF, PARIJA BC, DAVIS DL, MILLIKEN G. Synthesis of prostaglandin by pig blastocysts cultured in medium containing estradiol or catechol estrogen. *Prostagl* 1992; **43**: 309–319.
- [87] SCHAEFFER JM, LIU L, HSUEH AJW, YEN SSC. Presence of oxytocin and arginine vasopressin in human ovary, oviduct and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **63**: 928–930.
- [88] SCHAMS D. Luteal peptides and intercellular communication. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987; **34**: 87–99.
- [89] SCHAMS D, KILL 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.
- [90] SCHWALL RH, MASON AJ, WILCOX JM, BASSETT SG, ZELEZNIK AJ. Localization of insulin/activin subunit messenger RNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol* 1990; **4**: 75–79.
- [91] SEALEY JE, QUIMBY FW, ITSKOVITZ J, RUBATTU S. The ovarian renin-angiotensin system. *Frontiers in Neuroendocrinol* 1990; **11**: 213–237.
- [92] SHERWOOD OD, RUTHERFORD JE. Relaxin immunoactivity levels in ovarian extracts obtained from rats during various reproductive states and from adult cycling pigs. *Endocrinology* 1981; **108**: 1171–1177.
- [93] SHUKOVSKI L, FORTUNE JE, FINDLAY JK. Oxytocin and progesterone secretion by bovine granulosa cells of individual preovulatory follicles cultured in serum free medium. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **69**: 17–24.
- [94] STIRLING D, MAGNESS RR, STONE R, WATERMAN MR, SIMPSON ER. Angiotensin II inhibits luteinizing hormone-stimulated cholesterol side chain cleavage expression and stimulates basic fibroblast growth factor expression in bovine luteal cells in primary culture. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5–8.
- [95] STOKLOSOWA S, GREGORASZCZUK E. Do theca interna cells of the porcine ovarian follicle contribute to corpus luteum formation? Tissue culture approach using sorted ovarian cells. *Cell Biol Intern Rep* 1981; **5**: 770.
- [96] SHAHA C, MARGIOVIS A, LIOTTA AS, KRIEGER DT, BARDIN CW. Demonstration of immunoreactive β -endorphin and γ 3-melanocyte-stimulating hormone related peptides in the ovaries of neonatal, cyclic and pregnant mice. *Endocrinology* 1984; **115**: 378–384.
- [97] TAN GJ, TWEEDALE SRL, BIGGS JSG. Oxytocin may play a role in the control of the human corpus luteum. *J Endocrinol* 1982; **95**: 65070.
- [98] TAYLOR MJ, CLARK CL. Detection of relaxin release by porcine luteal cells using a reverse hemolytic plaque assay: effect of prostaglandin E_2 and $F_{2\alpha}$; human chorionic gonadotropin and oxytocin. *Biol Reprod* 1987; **37**: 377–384.
- [99] TAYLOR MJ, CLARK CL. Inhibitory effect of analogues of cyclic nucleotides and cholera toxin on relaxin release from cultured porcine luteal cells. *Biol Reprod* 1988; **38**: 315–323.
- [100] TEKPETEY FR, ARMSTRONG DT. Steroidogenic response of rat and pig luteal cells to estradiol-17 β and catecholestrogens in vitro. *Biol Reprod* 1991; **45**: 498–505.
- [101] TSONIS CG, BAIRD DT, CAMPBELL BK, LEASK T, SCARAMUZZI RJ. The sheep corpus luteum secretes inhibin. *J Endocrinol* 1988; **116**: R3–R5.
- [102] VAN de MEULEON J, ELSAESSER F, OUDENAARDEN CPJ, HELMOND FA. Effect of intra-uterine oestradiol-17 β administration on inter-oestrus interval in the pig. *Anim Reprod Sci* 1991; **24**: 305–313.
- [103] VARGA BE, HORVATH E, ZSOLNAI B.: Effects of oxytocin and vasopressin on the ovarian blood flow, progesterone nad oestradiol-17 β secretion in oestrus rats. *Acta Endocrinol* 1985; **110**: 271–275.
- [104] VERGES B, MAURICE C, CORNET D, SALAT-BAROUX J, ARDAILLOW R.: Arginine vasopressin in human follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; **63**: 928–930.

- [105] WATHES DC. Oxytocin and vasopressin in the gonads. W: Oxford Reviews of Reproduction Biology. Milligan SR. (ed.) Oxford, U.K. Oxford Univ Press 1989; 2: 226–283.
- [106] WILTBANK MC, DISKIN MG, NISWENDER GD. Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum. *J Reprod Fert Suppl.* 1991; 43: 65–75.
- [107] WOODRUFF TK, D'AGASTINO TKJ, SCHWARTZ NB, MAYU KE. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science Wash. DC* 1988; 239: 1296–1299.
- [108] YASUDA K, FUKUOKA M, TAU S, TAKAKURA K, MORI T. Inhibitory effects of interleukin-1 on follicle-stimulating hormone induction of aromatase activity, progesterone secretion and functional luteinizing hormone receptors in cultures of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1990; 43: 905–912.
- [109] ZELINSKI-WOOTEN MB, STOUFFER RL. Intraluteal infusions of prostaglandins of the E, D and A series prevent PGF_{2α}-induced but not spontaneous luteal regression in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 1990; 43: 507–606.

Otrzymano: 10.11. 1993 r.

Przyjęto: 10.04.1994 r.

Adres autorki: 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6.

WSPÓŁDZIAŁANIE MAKROFAGÓW WĄTROBY Z HEPATOCYTAMI I NIEPARENCHYMALNYMI KOMÓRKAMI WĄTROBY

THE INTERACTION OF HEPATIC MACROPHAGES WITH HEPATOCYTES AND NONPARENCHYMAL CELLS

Joanna KOPEĆ-SZŁĘZAK

Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii

Streszczenie. Makrofagi wątroby, czyli komórki Browicza-Kupffera wraz z komórkami gwiaździstymi i komórkami śródbłonna należą do nieparenchymalnych komórek wątroby. Makrofagi te syntetyzują i uwalniają substancje czynne biologicznie, np. eikozanoidy, interleukiny, TNF i TGF i mogą regulować procesy metaboliczne w hepatocytach i innych komórkach nieparenchymalnych. Makrofagi stymulują śródbłonek do wydzielania endoteliny, indukują komórki gwiaździste do transformacji w komórki typu miofibroblastów i tworzą mikrośrodowisko dla różnicowania m.in. komórek Tyd w wątrobie.

Słowa kluczowe: makrofagi wątroby, interakcje, hepatocyty, komórki nieparenchymalne.

Summary. The liver macrophages, called Browicz-Kupffer cells, with the stellate cells and endothelial cells belong to non-parenchymal hepatic cells. The macrophages synthesize and release biologically active products, mainly eicosanoids and peptide mediators (interleukins, TNF, TGF) and regulate metabolic processes in hepatocytes and in other non-parenchymal cells. Macrophages stimulate endothelial cells to secrete endotelin, they induce also transformation of stellate cells to fibroblasts Tyd cells in the liver.

Key words: hepatic macrophages, interaction, hepatocytes, non-parenchymal cells.

WSTĘP

Makrofagi wątroby zostały opisane ponad 100 lat temu przez anatoma Carla von Kupffera oraz przez Tadeusza Browicza* jako komórki wątroby o rozgałęzionym

*M. Hanecki: Tadeusz Browicz. Życie i działalność naukowa. PZWL, Warszawa 1956.

kształcie i własnościach fagocytarnych. W 1952 roku badacz japoński Ito wyróżnił odrębną populację tzw. komórek gwiazdzistych, które nie wykazują zdolności fagocytozy, a ich głównym "zadaniem" jest gromadzenie i uwalnianie witaminy A [27, 36]. Obecnie te dwa rodzaje komórek (tj. makrofagi i komórki gwiazdziste) oraz komórki śródbłonka naczyń i duże limfocyty ziarniste określa się jako nieparenchymalne komórki wątroby, stanowiące obok komórek parenchymalnych stały element strukturalny tego narządu (ang. *nonparenchymal liver cells*, NPLC) [8]. Makrofagi w wątrobie należą do układu fagocytów jednojądrzastych i są przykładem makrofagów osiadłych w narządach, podobnie jak makrofagi pęcherzyków płucnych czy zatok śledziony i węzłów chłonnych.

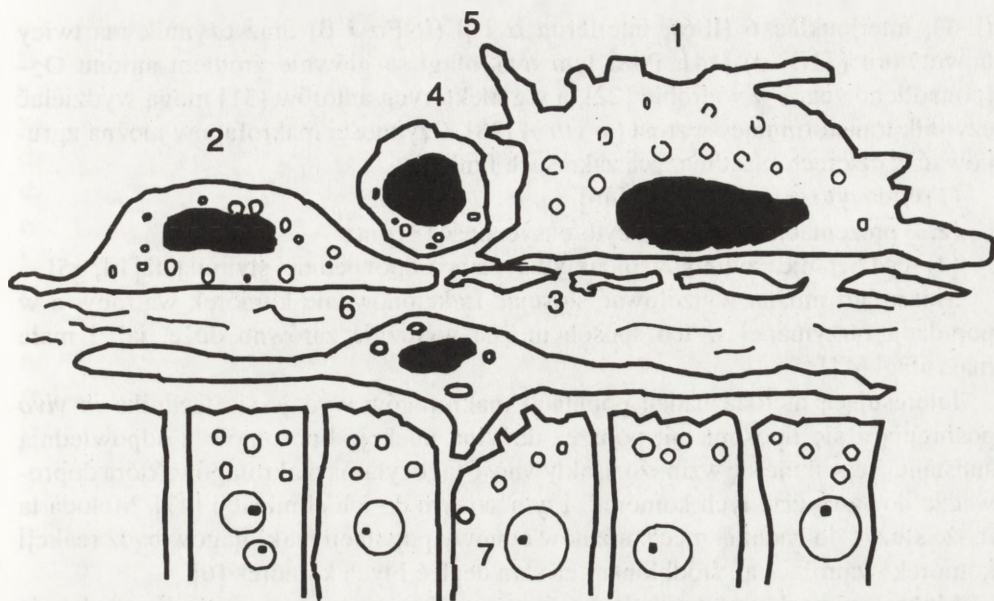
Makrofagi stanowią ponad 50% populacji wszystkich makrofagów osiadłych, a np. makrofagi płucne zaledwie 10%. Makrofagi stanowią jednocześnie 30% nieparenchymalnych komórek wątroby [46].

Dane z piśmiennictwa ostatnich lat wskazują, że makrofagi są wielostronnie badane, choć głównie w aspekcie immunologicznym [6, 42]. Interesujące wydają się również wyniki badań dotyczące roli makrofagów w funkcjonowaniu wątroby. Wiąże się to ze współdziałaniem tych komórek zarówno z pozostałymi rodzajami komórek nieparenchymalnych, jak i z hepatocytami i jest tematem niniejszego artykułu.

KRÓTKA CHARAKTERYSTYKA MAKROFAGÓW

Makrofagi są położone w świetle naczyń zatokowych wątroby i oddzielają je od przestrzeni Disse'a komórki śródbłonka. Natomiast komórki gwiazdziste znajdują się w przestrzeniach Disse'a w bezpośrednim sąsiedztwie hepatocytów, jak jest to pokazane schematycznie na rysunku 1 [35]. Badania ultrastrukturalne wykazały jednakże, że nie ma połączeń międzykomórkowych pomiędzy śródbłonkiem a makrofagami [41]. Makrofagi są najbardziej liczne w strefie okołowrotnej zrazików wątrobowych, mniej liczne w strefie pośredniej i najmniej liczne w centrum zrazika; ich stosunek liczbowy wynosi odpowiednio 4 : 3 : 2 [8]. Makrofagi w strefie okołowrotnej zrazików wątrobowych są większe od komórek występujących w centrum zrazików, wykazują bardzo wysoką aktywność enzymów lizosomalnych. Natomiast subpopulacja tzw. małych makrofagów w strefie centralnej zrazika i w strefie pośredniej charakteryzuje się wyższą aktywnością cytotoksyczną [8]. Przeciętnie lizosomy zajmują ok. 13% całkowitej objętości makrofaga (rys. 2). W mikroskopie świetlnym makrofagi można wyróżnić metodą histochemiczną na obecność peroksydazy, której występowanie w błonie jądrowej i szorstkiej siateczce śródplazmatycznej jest charakterystyczne w wątrobie jedynie dla makrofagów.

Makrofagi są wyposażone w charakterystyczne receptory, m.in. CD4 dla HIV [42], CD16 dla fragmentu Fc immunoglobulin [46].

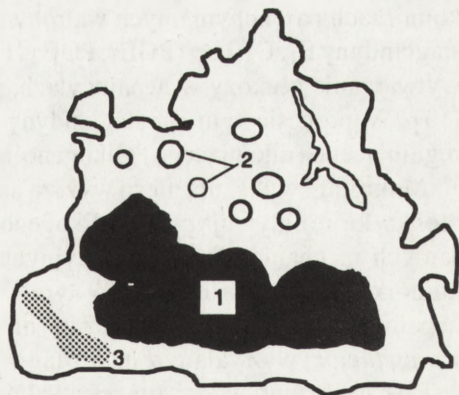


Rys. 1. Rozmieszczenie komórek nieparenchymalnych wątroby: 1 – makrofag, 2 – komórka śródbłonka, 3 – komórka gwiaździsta, 4 – duży limfocyt ziarnisty, 5 – światło naczynia zatokowego, 6 – przestrzeń okołozatokowa (Disse'a), 7 – komórki parenchymalne wątroby (hepatocyty) (schemat wg Ramadoriego [35] nieco zmieniony)

Na powierzchni makrofagów zidentyfikowano również trzy receptory specyficzne dla węglowodanów:

- dla mannozy (występują również na makrofagach płuc, śledziony i szpiku),
- dla galaktozy i dla fukozy [21, 40].

Dwa ostatnie receptory są specyficzne dla makrofagów. Receptor galaktozy może także rozpoznawać cząstki opłaszczone antygenem karcinoembrionalnym (CEA) [25, 41]. Dla receptora rozpoznającego glikoproteiny z terminalną fruktozą nie określono dotąd liganda, choć stwierdzono jego podobieństwo do receptora asialoglikoproteinowego [46]. Makrofagi charakteryzuje wysoka aktywność wydzielnicza obejmująca mediatory lipidowe, takie jak eikosanoidy i czynnik aktywujący płytki (PAF) oraz mediatory peptydowe, czyli molekuly sygnalizacyjne jak interleukina 1



Rys. 2. Schemat makrofaga wątroby wg elektronogramu Jonesa [24]: 1 – jądro, 2 – lizosomy, 3 – mitochondrium

(Il-1), interleukina 6 (Il-6), interferon α i β (INF α i β) oraz czynnik martwicy nowotworu (TNF α) [14]. Poza tym makrofagi są głównie źródłem anionu O₂– (ponadtlenowego) w wątrobie [22], a wg niektórych autorów [31] mogą wydzielać czynnik transformujący wzrost (*in vitro*) [38]. Czynności makrofagów można zgrupować w czterech zasadniczych zakresach funkcji:

(1) endocytoza (fagocytoza) [46],

(2,3) prezentacja antygeny i cytotoksyczność [8] oraz

(4) wydzielanie czynników bioaktywnych po odpowiedniej stymulacji [14, 15].

Makrofagi można wyizolować stosując frakcjonowanie komórek wątroby, a w populacji otrzymanej w ten sposób można wyróżnić zarówno duże, jak i małe makrofagi [44].

Interesującą metodą badań populacji makrofagów wydaje się technika *in vivo* posługująca się liposomami; poprzez dożylną iniekcję liposomów z odpowiednią substancją uzyskuje się wzmożoną aktywność fagocytarną makrofagów, która doprowadza do “zużycia” tych komórek i tym samym do ich eliminacji [47]. Metoda ta może służyć do badania mechanizmów odnowy populacji makrofagów bądź reakcji komórek wątroby (np. śródbłonna) na stan deplecji tych komórek [6].

Makrofagi pochodzą od prekursorów w szpiku i migrują do wątroby w okresie życia płodowego, ale mogą różnicować się również z monocytów napływających do wątroby w stanach patologicznych [34].

MAKROFAGI WĄTROBY A HEPATOCYTY

Jednym z ważniejszych procesów zachodzących w wątrobie jest utrzymanie homeostazy metabolizmu glukozy. Z badań *in vitro* wynika, że proces glikogenolizy w komórkach parenchymalnych wątroby może być regulowany przez makrofagi. Prostaglandyny E₁, E₂ i D₂ (PGE₁, PGE₂ i PGD₂) wydzielane przez te komórki stymulują wytwarzanie glukozy w hepatocytach, przy czym PGD₂ jest najbardziej efektywna [13]. W procesie tym prostaglandyny stymulują aktywność fosforylasy, enzymu regulującego (inicjującego) glikogenolizę.

Makrofagi wykazują nieco wyższą aktywność stymulacyjną aniżeli komórki śródbłonna, które aktywują proces glikogenolizy w hepatocytach wskutek działania takich samych mechanizmów stymulacyjnych. Można zatem powiedzieć, że makrofagi i komórki śródbłonna działają w tym samym kierunku. Efekt glikogenolityczny w hepatocytach stymuluje również czynnik aktywujący płytki PAF (ang. *platelet activating factor*) wyzwalany z makrofagów [14]. Z badań Gandi’ego i wsp. [18] wynika, że PAF może wpływać na proces uwalniania glukozy z hepatocytów nie tylko poprzez aktywację prostaglandyn w makrofagach, ale również bezpośrednio. Oddziaływanie makrofagów na hepatocyty badano w procesach uszkodzenia i regeneracji wątroby.

W pierwszej fazie uszkodzenia niedokrwiennej wątroby (ischemia) stwierdzono m.in. stres oksydacyjny, wynikający ze zwiększonego uwalniania reaktywnego tlenu z makrofagów. Są one głównym źródłem, bowiem hepatocyty i komórki śródbłonna wydzielają niewielkie ilości tlenu [22, 23]. Podczas reperfuzji obserwowane uszkodzenie hepatocytów może być wywołane przez dwojakiego rodzaju mechanizmy działania makrofagów, tj. poprzez wydzielanie proteaz i również przez wydzielanie reaktywnego tlenu. Makrofagi wydzielają nie tylko, choć przede wszystkim, O_2^- , ale i H_2O_2 , który może wytwarzać OH^- w obecności jonów metali o własnościach redukująco-utleniających.

Zredukowanie szkodliwego wpływu makrofagów poprzez hamowanie ich aktywności jest jednak "bronią obosieczną"; stwierdzono bowiem, że blokada tych komórek wywołuje obniżenie ochrony komórek parenchymalnych przed endotoksynami i infekcją bakteryjną [28].

Makrofagi, w świetle badań z ostatnich lat, uczestniczą w regeneracji wątroby "współdziałając" z hepatocytami w przeciwieństwie do panującego do niedawna poglądu, że te dwa rodzaje komórek są niezależne od siebie [11].

Z badań Gossa i wsp. [19] wynika, że wytwarzane przez makrofagi $IL-6$ i PGE_2 w ostrej fazie odpowiedzi na uszkodzenie wpływają na hepatocyty i ich proliferację. W procesie regeneracji stwierdzono podwyższony poziom zarówno $IL-6$, jak i PGE_2 , natomiast poziom wydzielania $TNF\alpha$ był obniżony [12]. Proces wydzielania tych substancji przez makrofagi podlega jednak dwojakiej regulacji. $IL-6$ jest wydzielana tylko przez krótki okres indukcji proliferacji hepatocytów; przedłużenie stanu "niekontrolowanego" rozrostu mogłoby prowadzić do przedłużenia ostrej fazy i dlatego hamowanie wydzielania $IL-6$ przez PGE_2 z makrofagów (autoregulacja) może być procesem korzystnym. Jednocześnie jednak wiadomo, że PGE_2 pochodząca z makrofagów może także stymulować syntezę DNA i proliferację w hepatocytach. Natomiast hamowanie syntezy DNA w hepatocytach jest przypisywane działaniu $IL-1$ (interleukiny 1) wydzielanej z makrofagów [26, 48]. Dane te wskazują na niewątpliwy udział makrofagów w procesach regeneracji wątroby, choć jeszcze niecałkowicie wyjaśniony.

W ostatnich latach obserwowano również reakcję makrofagów w wątrobie po transplantacji. Z prac japońskich badaczy wynika, że zastosowanie inhibitorów proteaz i zablokowanie kanałów wapniowych makrofagów zwiększa szanse przyjęcia się i przeżycia przeszczepu po transplantacji wątroby [47]. Kanały wapniowe makrofagów są zależne od potencjału błony (tzw. *L-type voltage dependent*) i można uzyskać ich zablokowanie stosując nifedipinę [20].

Oddzielne zagadnienie stanowi aktywność makrofagów wobec komórek nowotworowych wątroby. W badaniach *in vitro* izolowanych makrofagów stwierdzono ich cytotoksyczną aktywność wobec komórek neoplastycznych pochodzących z przerzutów wątrobowych [46]. Makrofagi izolowane z wątroby z przerzutami są cytotoksyczne także w stosunku do komórek rakowych jelita grubego [39]. Badania japońskie

na komórkach hepatoma szczura wykazały, że aktywność "antytrakowa" makrofagów jest głównym elementem obrony wątroby przed rozrostem nowotworowym. W procesie tym stwierdzono wydzielanie O_2^- , proteazy i $TNF-\alpha$ z makrofagów. Prawdopodobnie w aktywności cytotoksycznej makrofagów uczestniczy interleukina 2, a ekspresja receptora dla Il-2, czyli Il-2R, jest ważna w uaktywnieniu tych komórek. Ponadto także ekspresja antygeny asialo-GM1 na powierzchni makrofagów ma znaczenie w przyleganiu tych komórek do komórek nowotworowych w procesie cytotoxyczości, a zastosowanie leku przeciwnowotworowego mitomycyny wywołuje zwiększenie ekspresji tego antygeny [2]. Mitomycyna i adriamycyna zwiększają wydzielanie O_2^- przez makrofagi *in vitro*, a dodanie tych komórek do hodowli hepatoma zawierającej mitomycynę i adriamycynę hamuje proliferację komórek nowotworowych. Autorzy tych badań wnioskuje o synergicznym działaniu przeciwnowotworowym makrofagów i leków cytostatycznych.

MAKROFAGI WĄTROBY A KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA

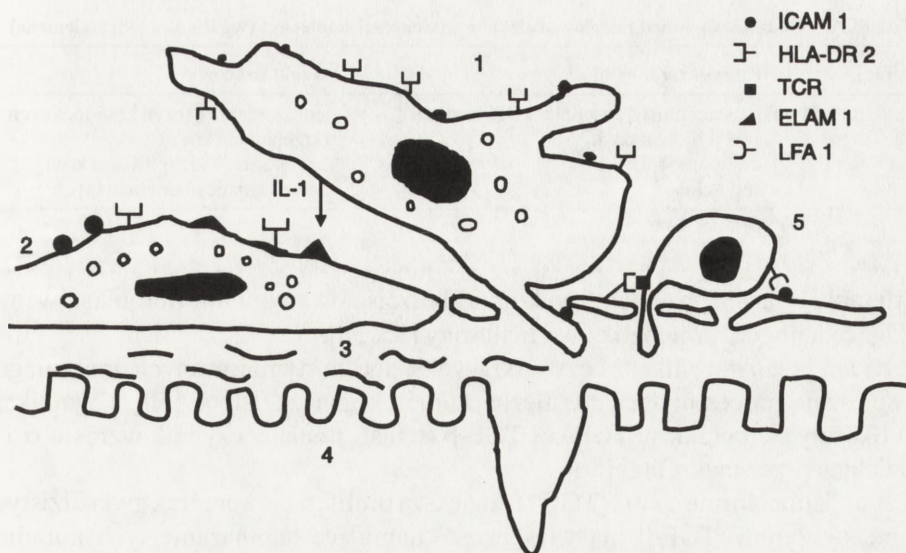
Wpływ makrofagów na komórki śródbłonka wiąże się głównie z procesem sekrecji aktywnych substancji w różnych stanach patofizjologicznych. Podczas reperfuzji aktywuje się system oksydazy ksantynowej w makrofagach i uwalniania reaktywnego tlenu, który może powodować destrukcję komórek sódربولka [37].

Całość komórek śródbłonka jest z kolei konieczna do ochrony hepatocytów; uszkodzenie śródbłonka powoduje niezdolność do przeżycia komórek parenchymalnych wątroby [10].

$TNF-\alpha$ wydzielany przez makrofagi może zwiększyć ekspresję molekuł adhezyjnych (*intercellular adhesion molecule*) ICAM-1 na komórkach śródbłonka. Makrofagi wydzielają cytokinę $TNF-\alpha$ i interleukinę 1, które zmieniają funkcję komórek śródbłonka w różny sposób.

Komórki śródbłonka wydzielają Il-1, TNF i Il-6, kiedy są pod działaniem Il-1 lub $TNF-\alpha$. Wskutek ekspresji II klasy antygenów antygeny adhezyjne i cytokiny komórek śródbłonka wyzwalają miejscową odpowiedź immunologiczną. ICAM-1 śródbłonka wiąże limfocyty poprzez integrynę LFA_1 (*lymphocyte function-associated antigen*), następstwem czego jest ich wędrówka poza naczynia zatokowe [38] (rys. 3). Cytokiny wydzielane przez makrofagi mogą oddziaływać na aktywność komórek śródbłonka związaną z przepływem krwi i jej krzepiwością.

Interleukina 1 wydzielana przez aktywne makrofagi *in vitro* może stymulować syntezę i sekrecję substancji rozszerzających naczynia krwionośne m.in. prostacykliny ze śródbłonka. Jednocześnie stwierdzono, że $TGF-\beta$, którego źródłem mogą być makrofagi *in vitro*, indukuje uwalnianie z komórek śródbłonka endoteliny, silnego czynnika wywołującego skurcz wrotnych naczyń krwionośnych [38].



Rys. 3. Interakcje makrofagów ze śródbłonkiem z udziałem molekuł adhezyjnych; pobudzony makrofag poprzez wydzielane cytokiny aktywuje komórkę śródbłonka do ekspresji ELAM-1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule* – cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonka): 1 – makrofag, 2 – komórka śródbłonka, 3 – przestrzeń okołotokowa, 4 – hepatocyt, 5 – limfocyt (schemat wg Riedera [38], uproszczony)

Jak wiadomo, komórki śródbłonka uczestniczą w mechanizmie hemostazy wytwarzając substancje antykoagulacyjne i prokoagulacyjne. Z badań *in vitro* wynika, że IL-1 pochodząca z makrofagów stymuluje uwalnianie czynnika VIII i czynnika von Willebranda z komórek śródbłonka, co daje efekt prokoagulacyjny.

Trombomodulina, wydzielana ze śródbłonka ma działanie antykoagulacyjne. Natomiast hamowanie jej aktywności przez TNF- α uwalniany z makrofagów wywołuje zmianę właściwości antykoagulacyjnych śródbłonka na prokoagulacyjne [38] (tab. 1). Na podstawie pracy Bouwensa i wsp. [8] można powiedzieć, że niektóre czynności makrofagów i śródbłonka są wspólne: np. endocytoza i wydzielanie bioaktywnych lipidów i cytokin. Jednakże nie zawsze uwarunkowania i charakter aktywności tych dwu rodzajów komórek jest identyczny (tab. 2). Z najnowszych badań wynika, że komórki śródbłonka mogą “zastępować” makrofagi w procesach wiązania agregatów immunoglobulin A i G w sytuacjach wyraźnego niedoboru lub braku makrofagów. Komórki śródbłonka są zdolne do degradacji kompleksów immunologicznych podobnie jak makrofagi, co potwierdziły m.in. badania ultrastruktury [6].

MAKROFAGI WĄTROBY A KOMÓRKI GWIAZDZISTE

Oddziaływanie makrofagów na komórki gwiaździste zachodzi głównie przez wydzielane cytokiny. Procesy w komórkach gwiaździstych podlegające regulacji to

TABELA 1. Oddziaływanie makrofagów na niektóre właściwości śródbłonka (wg Riedera [38] zmieniona)

Makrofagi	Komórki śródbłonka	Efekt końcowy
Interleukina 1 (Il-1)	prostacyklina ↑, czynnik VIII i czynnik ↑ von Willebranda ↑	rozszerzenie naczyń krwionośnych, krzepnięcie krwi
TNF-α	trombomodulina ↓	zwiększenie krzepliwości krwi
TGF-β	endotelina ↑	skurcze naczyń krwionośnych

prolifercja i transformacja w tzw. komórki przejściowe typu miofibroblastów, syntetyzujące kalogen, proteoglikany i hialurony [35, 36].

Z badań *in vitro* wynika, że czynniki wydzielane ze stymulowanych makrofagów przyspieszają proces podwajania liczby komórek gwiazdzistych [50]. Czynnikiemami tymi okazały się cytokiny: TGF-α i TGF-β (transformujący czynnik wzrostu α i β) wydzielane przez makrofagi [30].

Czynnik transformujący α (TGF-α) zwiększa proliferację komórek gwiazdzistych, natomiast czynnik TGF-β ma właściwości hamujące namnażanie tych komórek. Koordynacja procesu proliferacji komórek gwiazdzistych zależy zatem od równowagi ilościowej dwu transformujących czynników wzrostu TGF-α i TGF-β. Stymulacja syntezy proteoglikanów (a zwłaszcza zawierających siarczan chondroityny) w komórkach gwiazdzistych wątroby może być zależna od czynnika transformującego wzrost pochodzącego z makrofagów. Zwiększenie syntezy proteoglikanów w komórkach gwiazdzistych pod wpływem TGF-β *in vitro* jest bardzo wyraźne i zależy od koncentracji TGF-β [30]. Bachem i wsp. [4] określili w badaniach *in vitro* poziom wydzielanych czynników wzrostu przez makrofagi: TGF-α i TGF-β i stwierdzili, że połączona aktywność obu tych czynników daje efekt fibrogenyzy w wątrobie.

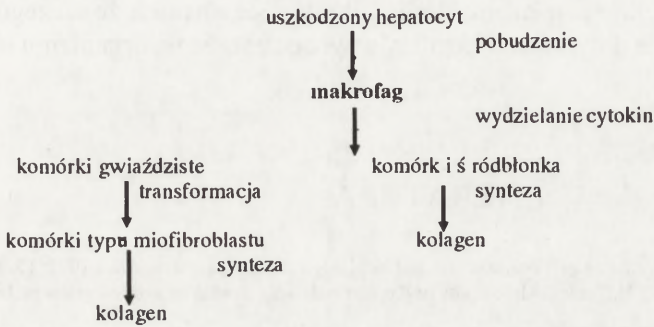
Z badań Matsuoka i wsp. [29] wynika, że TGF-β pobudza komórki gwiazdziste do syntezy kolagenu; jednakże oddziaływanie makrofagów poprzez wpływ TGF-β na proces fibrogenyzy nie może być jedynym czynnikiem decydującym o przebiegu zwłóknienia w wątrobie [35].

TABELA 2. Przykłady czynności wspólnych dla makrofagów i komórek śródbłonka (na podstawie Bouwensa [8])

Rodzaj funkcji	Uwagi
1. Endocytoza	
• endocytoza makromolekuł	• w komórkach śródbłonka dotyczy cząsteczek nie większych niż 0,33 μm (w normie) i do 1 μm w warunkach znacznego niedoboru makrofagów
• wiązanie kompleksów immunologicznych	• komórki śródbłonka wiążą wolniej niż makrofagi
• wiązanie glikoprotein z terminalną mannozą	• komórki śródbłonka bardziej aktywne niż makrofagi
2. Synteza i sekrecja prostaglandyn (PGE ₂ , PGD ₂) i cytokin (Il-1, Il-6)	• poziom syntezy różny w zależności od rodzaju czynnika
3. Wydzielanie czynnika wzrostu hepatocytów	• różnic nie stwierdzono [31]

Na podstawie piśmiennictwa można też powiedzieć, że makrofagi i komórki gwiaździste wykazują dwie główne "wspólne" cechy czynnościowe: wydzielanie cytokiny TGF i enzymu gelatynazy, który ma zdolność lizy substancji macierzystej w przestrzeniach Disse'a zrazików wątrobowych [8]. W procesie fibrogenyzy wczesnym i ważnym elementem jest zastąpienie normalnej substancji macierzystej, podobnej do błon podstawowych w przestrzeniach Disse'a, przez kolagen typu I i III. Synteza tego kolagenu następuje w komórkach gwiaździstych pod wpływem degradacji normalnej substancji macierzystej (w tym kolagenu typu IV) w przestrzeniach Disse'a [17]. Enzym kolagenaza IV/gelatynaza jest wydzielany przez aktywowane (np. endotoksyną) makrofagi [49] i komórki gwiaździste [3].

Na podstawie danych zawartych w pracach Ramadoriego i Windwoda [35, 49] oddziaływanie hepatocytów i komórek nieparenchymalnych w procesie włóknienia wątroby można przedstawić w formie schematu:



Ponadto komórki gwiaździste wydzielają czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), który może indukować proliferację i różnicowanie makrofagów w wątrobie [8] i możliwy jest przez to ich wpływ na makrofagi wątroby.

MAKROFAGI WĄTROBY A LIMFOCYTY

W wątrobie czwarty rodzaj komórek nieparenchymalnych stanowi populacja "dużych limfocytów ziarnistych" (LGL), a ich aktywność odpowiada czynnościom naturalnych komórek zabijających (NK). W piśmiennictwie anglojęzycznym są określane jako *pit cells* [8, 9]. W porównaniu do komórek NK krwi charakteryzuje je szczególnie wysoka aktywność cytotoksyczna [8].

O interakcjach pomiędzy makrofagami a komórkami LGL w wątrobie wiadomo, że u szczurów po zastosowaniu interleukiny 2 wzrasta liczba obu rodzajów komórek

i można spotkać w świetle naczyń zatokowych makrofagi i komórki LGL wzajemnie przylegające do siebie [9].

Specyficzną rolę pełnią natomiast makrofagi w procesie pozagracicznego różnicowania komórek T w wątrobie. Proces ten zachodzi w naczyniach zatokowych wątroby. Badacze japońscy wykazali, że makrofagi tworzą mikrośrodowisko dla pozagracicznego różnicowania komórek T w naczyniach zatokowych wątroby. W ten sposób makrofagi przyjmują funkcję odpowiadającą roli komórek zrębowych w szpiku kostnym bądź dendrytycznych w grasicy [1].

Stwierdzono ponadto, że w przypadku zakażenia *Listeria monocytogenes*, która przede wszystkim wnika do makrofagów i w nich się rozwija, limfocyty pochodzenia pozagracicznego w wątrobie atakują zainfekowane makrofagi. Infekcje bakteryjne mogą jednocześnie stymulować proces pozagracicznego różnicowania komórek T w wątrobie [1].

Reasumując należy powiedzieć, że doniesienia z ostatnich lat wskazują na dużą różnorodność funkcji, jakie spełniają makrofagi. Wydaje się również, że szczególnie ważne mogą być badania dotyczące makrofagów wobec zakażenia organizmu wirusem HIV.

LITERATURA

- [1] ABO T. Extrathymic differentiation of T lymphocytes and its biological function. *Biomed Res* 1992; **13**: 1–39.
- [2] ADACHI I, ARII S, FUNAKI N. Tumoricidal activity of Kupffer cells augmented by anticancer drugs. *Life Sci* 1992; **52**: 177–183.
- [3] ARTHUR MJP, FRIEDMAN SL, ROLL FJ, BLESEEL DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1076–1085.
- [4] BACHEM MG, RIESS U, MELCHIOR R, SELL KM, GRESSNAR AM. Transforming growth factors stimulate chondroitin sulfate and hyaluronate synthesis in cultured rat liver fat storing cells. *FEBS Lett* 1989; **275**: 134–137.
- [5] BISSEL DM, FRIEDMAN SL, MAKER JJ, ROLL FJ. Connective tissue biology and hepatic fibrosis. *Hepatology* 1990; **11**: 488–498.
- [6] BOGERS WM, STAD RK, van ES LA, DAHA MR. Both Kupffer cells and liver endothelial cells play an important role in the clearance of IgA and IgG immune complexes. 41st Forum Immunology 1993; 219–224.
- [7] BOUWENS L, BEAKELAND M, WISSE E. Cytokinetic analysis of the expanding Kupffer cell population in rat liver. *Cell Tissue Kinet* 1986; **19**: 217–226.
- [8] BOUWENS L, de BLESER D, VENDERKERKEN K, GEERTS B, WISSE E. Liver cell heterogeneity functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; **46**: 155–168.
- [9] BOUWENS L, MARINELLI A, KUPPEN PJ, EGGERMONT A, van de VALDE, WISSE E. Electron Microscopic Observations on the accumulation of Large Granular Lymphocytes (pit cells) and Kupffer cells in the liver of rats treated with continuous infusion of interleukin 2. *Hepatology* 1990; **12**: 1365–1370.
- [10] CALDWELL-KENKEL JC, CURRIN RT, TANAKA Y, THURMANN RG, LEMASTERS JJ. Kupffer Cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 1991; **13**: 83–95.
- [11] CALLERY MP, KAMEIT, FLYEMW. Kupffer cell TNF- α production is suppressed during liver regeneration. *J Surg Res* 1991; **50**: 515–519.
- [12] CALLERY MP, KAMEI T, MAGINO MJ, FLYE MW. Kupffer cell prostaglandine E₂ production is amplified during hepatic regeneration. *Hepatology* 1991; **14**: 368–373.
- [13] CASTELEIJN E, KUIPER J, NAN ROZ H. Hormonal control of glycogenolysis in parenchymal liver cells by Kupffer and endothelial liver cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2699–2703.

- [14] DECKER K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; **192**: 245–261.
- [15] DECKER K, PETERS T, KARCK U. Interdependence of tumor necrosis factor, prostaglandin E₂ and protein synthesis in lipopolysaccharide-exposed rat Kupffer cells. *Eur J Biochem* 1990; **191**: 583–589.
- [16] FAUSTO N. Hepatic Regeneration. (w) *Hepatology* Vol 1, Zakim D., Boyer T.D. (red.) Philadelphia: Saunders Company, 1990: 49–64.
- [17] FRIEDMAN SL, ARTHUR MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1780–1785.
- [18] GANDHI CR, DE BUYSERE HS, OLSON MS. Platelet-activating factor mediator synthesis of prostaglandins in rat Kupffer cells. *Bioch Bioph Acta* 1992; **1136**: 68–74.
- [19] GOSS JA, MANGINO MJ, WAYNE KF, FLYE MW. Prostaglandin E₂ production during hepatic regeneration downregulate Kupffer-cell IL-6 production. *Ann Surg* 1992; **215**: 553–560.
- [20] HIJOKA T, ROSENBERG RL, LEMASTERS J, THURMAN RG. Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels. *Mol Pharmacol* 1992; **41**: 435–440.
- [21] HOYLE GW, HILL RI. Molecular cloning and sequence of DNA for a carbohydrate binding receptor unique to rat Kupffer cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7487–7492.
- [22] JAESCHKE H. Reactive oxygen and ischemia reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991; **79**: 115–136.
- [23] JAESCHKE H, FARHOOD A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991; **260**: G355–G362.
- [24] JONES AL. Anatomy of normal liver (w) *Hepatology* vol 1 Zakim D., Boyer T.D. Philadelphia: Saunders Company 1990; 3–29.
- [25] KLEMPKA C, ROSS P, KOLB-BACHOFEN V. A membrane associated form of C-reactive protein is the galactose specific particle receptor on rat liver macrophages. *J Immunol* 1990; **144**: 1004–1009.
- [26] KOCH KS, LU XP, BRENNER DA. Mitogenes and hepatocyte growth control *in vivo* and *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; **26**: 1011–1023.
- [27] KOPEĆ-SZŁĘŻAK J. Rola komórek gwiaździstych w metabolizmie witaminy A. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 77–86.
- [28] MANTHEY C, KOSSMANN T, ALLAN JB, CORCORAN ML, BRANELES ML, WAHLMS. Role of Kupffer cells in developing Streptococcal cell wall granulomas. *Am J Pathol* 1992; **140**: 1205–1214.
- [29] MATSUOKA M, ZHANG MY, TSUKAMOTO H. Sensitization of hepatic lipocytes by high-fat diet to stimulatory effects of Kupffer cell-derived factors. *Hepatology* 1990; **11**: 175–182.
- [30] MAYER DH, BACHEM MG, GRESSNER AM. Kupffer cells fat storing cells proliferation and proteoglycan synthesis via transforming growth factors (TGF α , TGF β). (w) *Wisse E., Knook D.L., McCuskey R.S.* (red.) *Cell of Hepatic Sinusoid, Leiden; Kupfer cell Fundation* 1991; 19–22.
- [31] NOJIS, TAOHIRO K, KOYAMA E et al. Expression of hepatocyte growth factor gene in endothelial and Kupffer cells of damaged rat liver as revealed by *in situ* hybridisation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **173**: 42–47.
- [32] OHTEKI T, ABO T, SEKI S, KOBATA T. i wsp.: Predominant appearance of T lymphocytes in the liver mice after birth. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1733–1740.
- [33] PAULSSON M. Basement membrane proteins structure, assembly and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; **27**: 93–127.
- [34] PTASZNIKA, RATAJCZAK MZ. Hematologia układu fagocytów jednojądrzastych. (w) *Ultrastruktura i funkcja komórki, t.4, Kawiak J., Osuchowska Z., Przełęcka A.* (red.) PWN, Warszawa 1989; 56–70.
- [35] RAMADORI G. The stellate cell (Ito-cell, fat storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991; **61**: 147–158.
- [36] RAMADORI G. Kupffer cells and fibrogenesis. *Cell Mol Asp Cirrh* 1992; **216**: 169–176.
- [37] RAO N, WALSH TR, MAKOWSKA L. et al. Purine nucleoside phosphorylase: A new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology* 1990; **11**: 193–198.
- [38] RIEDER W, MEYER KH, RAMADORI G. Function spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. *J Hepatol* 1992; **15**: 237–250.
- [39] ROH M, WANG L, OYEDEJI C, LE ROUX M, CURLEY S, POLLOCK R, KLOSTERGAARD J. Human Kupffer cells are cytotoxic against human colon adenocarcinoma. *Surgery* 1990; **108**: 200–405.
- [40] SANO A, TAYLOR M, LEANING M, SUMMERFIELD J. Uptake and processing of glycoproteins by isolated rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *J Hepatol* 1990; **10**: 211–216.
- [41] SCOAZEC JY, FELDMAN G. Proteins d'adhésion et foie. *Gastroenterol Clin Biol* 1992; **16**: 264–277.
- [42] SCOAZEC JY, FELDMAN G. Both macrophages and endothelial cells the human hepatic sinusoid express the CD₄ molecule, a receptor for the human immunodeficiency virus. *Hepatology* 1990; **12**: 505–510.

- [43] SCHLEPPER-SCHAFFER J, RAFFELSIEFER A, KOLB-BACHOFEN V. Endocytosis of carcinoembryonic antigen by rat liver macrophages is mediated by the galactose particle receptor. *Cells Hepatic Sinusoid* 1989; **2**: 115-119.
- [44] SPOLARICS Z, OTTLAKAN A, LANG CH, SPITZER JJ. Kupffer cells play a major role in insulin mediated hepatic glucose uptake *in vivo*. *Bioch Bioph Res Comm* 1992; **186**: 455-460.
- [45] TAKEI Y, MARZI I, KAUFFMAN FC, CURRING RT, LEMASTERS JJ, THURMAN RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990; **50**: 14-20.
- [46] TOTH CA, THOMAS P. Liver endocytosis and Kupffer cells. *Hepatology* 1992; **16**: 255-266.
- [47] van ROOIJEN N, KORS N, van den ENDE M, DIJKSTRA CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylome diphosphate. *Cell Tissue Res* 1990; **260**: 215-222.
- [48] WEST AM, BILLER RT, CURAN RD. Evidence that rat Kupffer cells stimulate and inhibit hepatocyte protein synthesis *in vitro* by different mechanisms. *Gastroenterology* 1989; **96**: 1572-1577.
- [49] WINDWOOD PJ, KOWALSKI-SAUNDERS P, GREEN I. Kupffer cells release a 95 kD gelatinase. *Cell Mol Asp Cirrh* 1992; **216**: 307-310.
- [50] ZERBE O, GRESSNER AM. Proliferation of fat storing cells is stimulated by secretion of Kupffer cells from normal and injured liver. *Exp Mol Pathol* 1988; **49**: 87-101.

Otrzymano: 05.01. 1994 r.

Przyjęto: 20.05.1994 r.

Autor adres: Zakład Fizjopatologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii,
00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5

Z KRONIKI

Konferencja naukowa pt.

POSTĘPY W BADANIACH NAD MECHANIZMAMI NOWOTWORZENIA U LUDZI

odbędzie się w dniach 24 i 25 listopada 1994 r. w Centrum Onkologii w Warszawie staraniem: Komisji Biologii Nowotworów PAN, Zarządu Głównego oraz Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Onkologicznego, jak też Centrum Onkologii Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Celem tej konferencji jest dokonanie przeglądu stanu i perspektyw rozwoju, a także dorobku zespołów krajowych, wybranych kierunków badań z zakresu etiopatogenezy nowotworów złośliwych, które mogą w bliskiej przyszłości znaleźć zastosowanie w praktyce walki z rakiem – zwłaszcza w zakresie zapobiegania, wcześniejszego wykrywania i diagnostyki, monitorowania leczenia i prognozowania chorób nowotworowych u ludzi.

Przedmiotem czterech sesji naukowych będą:

1 – *postępy w rozpoznaniu dziedzicznych predyspozycji do rozwoju nowotworów złośliwych,*

2 – *zastosowanie metod analizy molekularnej w rozpoznawaniu, diagnostyce zaawansowania, monitorowaniu i prognozowaniu przebiegu nowotworów złośliwych,*

3 – *postępy w badaniach nad uwarunkowaniami rozwoju przerzutów nowotworowych,*

4 – *zastosowanie metod cytogenetycznych i molekularnych w rozpoznawaniu środowiskowych (egzogennych) przyczyn rozwoju nowotworów.*

W ramach każdej z wymienionych sesji przewidujemy:

– wykład wprowadzający (30 min),

– cztery do pięciu referatów przedstawiających dorobek polskich zespołów (po 15 min),

– prezentacje plakatowe.

Informacje: Komitet Organizacyjny Konferencji (ptof. P. Janik i dr hab. J. Siedlecki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wawelska 15, 00-973 Warszawa, tel. 22-48-31 w. 176 lub 23-25-49.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy 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 pożądane 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 nadbitek, 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 zapożyczony 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	97
Od Redakcji	98
LEGOCKI A. B.: Nowe zdobycze genetyki i biologii molekularnej podstawą rozwoju biotechnologii roślin	99
STEC W. J.: Dlaczego należy promować nowoczesne biotechnologie ?	105
WITT M., JARUZELSKA J.: Molekularne metody diagnostyki płci i ich zastosowanie w medycynie i diagnostyce	121
SZYMCZYK P., KILIAŃSKA Z.: Matriks jądrowa. II. Skład białkowy – Specyficzność białek matriks jądrowej	133
NIEMIERKO A.: Oocyt i przedimplantacyjny zarodek ludzki	165
RATAJCZAK M. Z., SKÓRSKI T.: Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej	177
FILIPECKI M. K., MALEPSZY S.: Regulatory transkrypcji u roślin wyższych	197
GREGORASZCZUK E.: Aktualne poglądy na regulację hormonalną ciała żółtego	209
KOPEĆ-SZŁĘZAK J.: Współdziałanie makrofagów wątroby z hepatocytami i nieparenchymalnymi komórkami wątroby	227
Z Kroniki	239

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.

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 dolars USA.

Indeks 369705