

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 22 NR-3'95
(207–342)

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 (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Maciej KAWALEC (*Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (*Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (*Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (*Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (*Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni

HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROŃHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99,
01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.*

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Postępy w identyfikacji i izolacji krwiotwórczych komórek macierzystych opisano na stronie 209. Zagadnienia te dyskutowano w świetle ich praktycznego wykorzystania w medycynie klinicznej.
- Jedną z cech przestrzennej organizacji komórkowego DNA wynikającą z jego dwuniciowej struktury oraz charakteru przemian, jakim podlega, jest tworzenie form superhelikalnych. Topoizomerazy są enzymami katalizującymi w procesach replikacji, transkrypcji i rekombinacji zmiany struktury przestrzennej superhelikalnych form DNA (patrz str. 235).
- Fizjologiczne znaczenie apoptozy komórek jest jednym z często dyskutowanych problemów. Uważa się, że śmierć komórek w procesie apoptozy jest efektywnym sposobem pozbycia się przez organizm komórek niepotrzebnych na pewnych etapach rozwoju bądź komórek niebezpiecznych dla całości. Opis tych problemów znajdzie Czytelnik na stronie 247 i dalszych.
- Proces poli-ADP-rybozylacji powoduje modyfikację białek jądrowych i DNA, podczas gdy proces mono-ADP-rybozylacji modyfikuje pozajądrowe białka komórki. Więcej informacji na ten temat można znaleźć na stronach 265 do 276.
- Opis technik izolowania woreczków załączkowych i komórek gametofitowych roślin okrytonasiennych znajdzie Czytelnik w artykule na stronie 277.
- Ostatnie lata przyniosły lepsze poznanie pozalizosomowego szlaku degradacji białek zlokalizowanego w cytoplazmie, w proteasomach (patrz strona 295). Proteasomy są organelami występującymi we wszystkich zbadanych do tej pory komórkach eukariotycznych.
- W artykule na stronie 317 omówiono proteoglikany: podstawy ich klasyfikacji, przykłady reprezentatywnych cząsteczek oraz biosyntetyczne podstawy heterogenności łańcuchów glikozaminoglikanowych.

**CHARAKTERYSTYKA, METODY IZOLACJI ORAZ
PRAKTYCZNE WYKORZYSTANIE WCZESNYCH
LUDZKICH KOMÓREK KRWIOTWÓRCZYCH
W MEDYCYNIE KLINICZNEJ –
ASPEKTY TRANSPLANTOLOGICZNE**

**CHARACTERIZATION, ISOLATION AND PRACTICAL ASPECTS
OF UTILIZATION OF HUMAN EARLY HEMOPOIETIC CELLS
IN CLINICAL MEDICINE –
TRANSPLANTOLOGICAL IMPLICATIONS**

Mariusz Z. RATAJCZAK, Wojciech MARLICZ, Janina RATAJCZAK,
Tomasz SKÓRSKI

Zakład Patologii Komórki PAM w Szczecinie
oraz Zakład Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie

Streszczenie: W pracy przedstawiono obecny stan wiedzy dotyczący biologii oraz postępów w identyfikacji i izolacji krwiotwórczych komórek macierzystych. Zagadnienia te dyskutowano w świetle ich praktycznego wykorzystania w medycynie klinicznej, a szczególnie w transplantologii hematologicznej.

Słowa kluczowe: krwiotwórcze komórki macierzyste, krwiotwórcze komórki ukierunkowane, przeszczepy krwiotwórcze, krwiotworzenie.

Summary: The advances in research concerning the biology, identification and isolation of human haemopoietic stem cells are reviewed. All these data are discussed regarding practical application of haemopoietic cells enriched in stem cells in clinical medicine and especially haematological transplantation.

Key words: haemopoietic stem cells, haemopoietic progenitors, haemopoietic transplants, haemopoiesis.

Wykaz skrótów stosowanych w pracy: **bFGF R** (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor Receptor*) – receptor dla zasadowego czynnika wzrostowego fibroblastów; **BFU-E** (ang. *Burst Forming Units of*

Erythrocytes) – wczesna komórka układu czerwonekrwinkowego tworząca *in vitro* 14 dnia hodowli duże kolonie erytroidalne; **CAFC** (ang. *cobblestone area forming cells*) – bardzo wczesna komórka hemopoetyczna tworząca w hodowlach długoterminowych ogniska proliferacji; **CFU-Blast** (ang. *Colony Forming Unit of Blasts*) – bardzo wczesna hemopoetyczna komórka ukierunkowana tworząca kolonie składające się z blastów; **CFU-G** (ang. *Colony Forming Unit of Granulocytes*) – komórka ukierunkowana granulopoezy; **CFU-GM** (ang. *Colony Forming Units of Granulocytes and Macrophages*) – wczesna komórka układu granulocytowo-makrofagowego tworząca *in vitro* 11 dnia hodowli kolonie granulocytowo-makrofagowe; **CFU-Meg** (ang. *Colony Forming Unit of Megakaryocytes*) – komórka progenitorowa układu megakariocytowego; **CFU-Mix** (ang. *Colony Forming Units of Mixed Lineages*) – jedna z wcześniejszych komórek układu krwiotwórczego tworząca 15 dnia hodowli kolonie składające się z krwinek czerwonych, granulocytów, makrofagów i megakariocytów; **CSF-1** (ang. *Colony Stimulating Factor-1*) czynnik wzrostowy układu monocytowo-makrofagowego inaczej M-CSF; **CSF-1R** – receptor dla CSF-1 (makrofagopoetyny), cDNA – DNA komplementarny do mRNA (uzyskuje się go w wyniku przepisania cząsteczek mRNA na komplementarne cząsteczki DNA); **EpO** – erytropoetyna; **FACS** (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorting*) – technika izolacji komórek za pomocą cytofluorometru przepływowego, który może sortować komórki mające odpowiedni antygen; **GATA** – wewnątrzjądrowy czynnik transkrypcyjny; **GAP** – jedno z białek transdukcji sygnału w komórce; **GM-CSF** (ang. *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik wzrostowy stymulujący wzrost kolonii granulocytowo-makrofagowych; **G-CSF** (ang. *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*) – granulocytopoetyna; **IGF-1R** (ang. *Insuline Like Growth Factor-1 Receptor*) – receptor dla IGF-1; **IL-1** – interleukina-1; **IL-3** – interleukina-3; **IL-6** – interleukina-6; **Hpc** – jedna z fosfataz wewnątrzkomórkowych; **KKM** – Krwiotwórcze Komórki Macierzyste – najwcześniejsze komórki hemopoetyczne mające zdolność samoodnawiania; **KKU** – Krwiotwórcze Komórki Ukierunkowane – bardziej dojrzałe od komórek macierzystych; tracą zdolność do samoodnawiania, w hodowlach *in vitro* tworzą klony komórek potomnych; **KL** (ang. *kit ligand*) – ligand receptora c-kit; **c-KIT-R** – receptor c-kit. **LTCIC** (ang. *long term culture initiating cell*) – komórka hemopoetyczna inicjująca tzw. hodowle długoterminowe; **NF-E2** – wewnątrzjądrowy czynnik transkrypcyjny; **PDGF-R** (ang. *Platelet Derived Growth Factor Receptor*) – receptor dla PDGF; **N-ras** – jedno z wewnątrzkomórkowych białek transdukcji sygnału; **RT-PCR** (ang. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) – czuła technika badania ekspresji mRNA w komórce, składa się z dwóch etapów: w pierwszym mRNA, którego ekspresję chcemy ocenić, “przepisywany” jest za pomocą enzymu tzw. odwrotnej transkryptazy na komplementarny odcinek cDNA, w drugim otrzymane cDNA jest amplifikowane za pomocą termocyklicznej reakcji PCR; amplifikowany wiele miliardów razy produkt może zostać uwidoczniiony np. na żelu agarozowym; **STK-1 R** – (ang. *Stem Cell Tyrosine Kinase-1 Receptor*) – nowo opisany receptor o aktywności kinazy tyrozynowej występujący na ludzkich komórkach krwiotwórczych – inna nazwa FLK-2/FLT-3; **STK-1L** – ligand receptora STK-1.

WSTĘP

Puła krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM) występująca w szpiku kostnym zapewnia utrzymanie prawidłowej hemopoezy podczas całego życia osobniczego [37]. Lajtha i McCulloch przed 30 laty zdefiniowali KKM jako komórkę mającą zdolność do samoodnowy oraz różnicowania w kierunku komórek progenitorowych wszystkich linii hemopoetycznych. Definicja ta podkreślająca z jednej strony zdolność do samoodnowy, a z drugiej nieograniczony potencjał do różnicowania obowiązuje do dnia dzisiejszego. Ze względu na fakt, że puła komórek macierzystych musi

zostać zachowana, dzieląca się KKM odtwarza z powrotem conajmniej jedną komórkę macierzystą. Druga z komórek potomnych może się natomiast różnicować w kierunku krwiotwórczej komórki ukierunkowanej (KKU) [1, 3, 30, 64].

Krwiotwórcze komórki ukierunkowane (KKU) stopniowo tracą zdolność do samoodnowy. Nabywają za to możliwość proliferowania i tworzenia klonów komórek potomnych składających się z elementów komórkowych kilku lub jednej linii krwiotwórczej. Ponieważ różnicowanie się KKM w kierunku KKU ma charakter stopniowy, to ze względu na ciągłość tego procesu niezwykle trudne jest oddzielenie KKM od najwcześniejszych KKU.

We wstępie do pracy należy podkreślić, że w chwili obecnej nie potrafimy jeszcze zidentyfikować i wyizolować czystej frakcji ludzkich KKM. Transplantologia hematologiczna nie ma również bezpośredniej metody oznaczania tych komórek w zawiesinie komórkowej uzyskanej z narządów krwiotwórczych [37]. Dowodem czynnościowym istnienia KKM jest występowanie pełnej repopulacji hemopoezy u pacjentów poddanych allogenicznym przeszczepom krwiotwórczym [30, 37]. Stosowane z kolei testy pośrednie polegające na ocenie ich zdolności proliferowania w heterologicznych modelach doświadczalnych u myszy SCID [10] oraz owczych płodach [74] są czasochłonne i na obecnym etapie jeszcze trudno powtarzalne.

Opisano natomiast zarówno wiele testów czynnościowych, jak i markerów komórkowych pozwalających na ocenę oraz izolację ludzkich KKU. Najwcześniejsze KKU można badać w testach proliferacyjnych *in vitro* polegających na ocenie: tzw. komórek inicjujących hodowle długoterminowe szpiku (ang. *long term cultures initiating cells*), komórek tworzących w hodowlach długoterminowych ogniska proliferacji (ang. *cobblestone area forming cells*) oraz za pomocą testu oceniającego wzrost kolonii blastycznych tworzonych przez tzw. CFU-Blast [37]. Bardziej zróżnicowane KKU oceniamy w testach klonogennych polegających na wzroście komórek ukierunkowanych tworzących tzw. klony wieloliniowe (CFU-Mix) bądź jednoliniowe (CFU-G, BFU-E, CFU-Meg) [37, 64].

Z punktu widzenia transplantologii KKM odpowiadają za ostateczną, pełną i długotrwałą rekonstrukcję hematologiczną po zabiegu, KKU natomiast za tzw. wczesną fazę rekonstrukcji biorcy przeszczepu w okresie, zanim KKM nie zaczną jeszcze proliferować. Dążąc więc do zapewnienia ciągłości odnowy hematologicznej po transplantacji – przeszczepiane komórki powinny zawierać wystarczającą liczbę zarówno KKM i KKU [21, 30].

Potrzeba opracowania wydajnej metody izolowania wymaga poznania biologii ludzkich KKM, co poza aspektem czysto poznawczym motywowane jest różnymi wskazaniami klinicznymi. Wynikają one z potrzeb:

➤ transplantologii hematologicznej, dążącej do wykonywania allogenicznych przeszczepień krwiotwórczych frakcją komórek wzbogaconą w KKM,

➤ nowoczesnej onkologii klinicznej polegającej na leczeniu nowotworów wysokimi dawkami radio-chemioterapii i wspomaganiu odnowy hematologicznej przeszczepieniami autologicznymi KKM,

➤ próbami stymulowania proliferacji KKM w różnych stanach cytopenii pochodzenia szpikowego,

➤ próbami izolowania KKM od komórek macierzystych np. przewlekłej białaczki szpikowej,

➤ postęпами terapii genowej, gdzie frakcja KKM jest bezpośrednim celem dokonania korekty materiału genetycznego komórek we wrodzonych chorobach układu krwiotwórczego.

Duży wysiłek wkłada się w poznanie biologii ludzkich KKM. Najważniejsze zagadnienia dotyczą poznania oraz praktycznego wykorzystania:

➤ mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za utrzymanie KKM w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego (G_0),

➤ zidentyfikowania pozytywnych i negatywnych mechanizmów oddziaływania mikrośrodowiska krwiotwórczego na KKM,

➤ białek biorących udział w transdukcji sygnału w KKM,

➤ mechanizmów molekularnych kontrolujących różnicowanie najwcześniejszych komórek krwiotwórczych.

Zadaniem prezentowanej pracy jest przedstawienie współczesnej wiedzy dotyczącej najwcześniejszych komórek hemopoetycznych człowieka w świetle potencjalnych możliwości jej praktycznego wykorzystania w transplantologii hematologicznej.

METODY WZBOGACANIA KOMÓREK HEMOPOETYCZNYCH CZŁOWIEKA W KKM

Na wstępie należy podkreślić, że do tej pory nie opisano w pełni zadowalającej metody ani swoistego markera umożliwiającego izolowanie czystej frakcji ludzkich KKM [37]. Stosowane obecnie techniki pozwalają jedynie na znaczne wzbogacenie zawiesiny komórek szpiku kostnego, krwi obwodowej lub pępowinowej w frakcje KKM [1, 3, 13, 19]. Do najważniejszych metod wzbogacania komórek hemopoetycznych w KKM zaliczamy:

➤ metody immunologiczne oparte na stosowaniu przeciwciał monoklonalnych rozpoznających pewne markery wczesnych komórek hemopoetycznych i następnym izolowaniu ich za pomocą: cytofluorometrii przepływowej, immunoabsorbpcji bądź separacji magnetycznej,

➤ techniki elutriacji izolujące komórki w zależności od ich gęstości i wielkości,

➤ selekcja farmakologiczna eliminująca komórki proliferujące za pomocą cytostatyków – oszczędzająca natomiast komórki znajdujące się w fazie spoczynkowej cyklu komórkowego.

Techniki cytofluorometrii przepływowej pozwalają na izolowanie wczesnych komórek hemopoetycznych wzbogaconych w dużym stopniu w KKM. Metody te służą w chwili obecnej jedynie do izolowania komórek do celów doświadczalnych [1, 18, 19]. Zaawansowane są jednak prace nad rozwojem technik takiej separacji na makroskalę – z myślą o uzyskiwaniu wystarczającej liczby komórek dla potrzeb transplantologii hematologicznej. Techniki cytofluorometrii przepływowej polegają na znakowaniu komórek za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko pewnym powierzchniowym antygenom komórkowym [1, 18, 19, 64]. Przeciwciała te znakowane są fluorochromami. Najbardziej przydatnym antygenem powierzchniowym występującym na najwcześniejszych ludzkich komórkach hemopoetycznych jest glikoproteina CD34. Na komórkach tych występuje również receptor C-KIT. W cytofluorometrii przepływowej wykorzystuje się również pewne barwniki, których gromadzenie odzwierciedla zarówno stan proliferacji komórek, jak i ich aktywność metaboliczną. Fluorochromem służącym do oceny stanu proliferacji komórek jest wiążący się z DNA barwnik Hoechst 33342 (Ho 33342) [37, 64]. Stan metaboliczny komórki można z kolei oceniać za pomocą rhodaminy-123 (Rh 123), która ma zdolność gromadzenia się w energetycznie aktywnych mitochondriach. Zgodnie z obowiązującą definicją KKM nie powinny więc gromadzić barwników swoistych dla komórek proliferujących (Ho33342) oraz aktywnych metabolicznie (Rh 123). Ostatnio pojawiły się doniesienia, że niskie gromadzenie Rh 123 w ludzkich najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych może być również częściowo wynikiem wysokiej aktywności białka – pompy oporności wielolekowej obecnej w tych komórkach, która usuwa wnikaający do cytoplazmy barwnik [64]. Korzystając z postępów cytofluorometrii przepływowej Weissman i wsp. określili fenotyp antygenowy ludzkich KKM jako: $CD34^+$, $Thy-1^{low}$, lin^- [1]. Terstappen [19] z kolei uważa, że ludzkie KKM mają fenotyp: $CD34^+$, $CD38^-$, $CD33^-$, $HLA-DR^-$, lin^- . Ostatni z badaczy sprostował jednak ostatnio swoje wyniki przyznając, iż komórka o podanym przez niego fenotypie jest wprawdzie bardzo wczesną komórką hemopoetyczną, lecz nie ma zdolności różnicowania się w kierunku komórki macierzystej mikrośrodowiska hemopoetycznego [18].

Powszechnie przymuje się, że fenotyp ludzkiej KKM jest zbliżony do wzoru antygenowego: $CD34^+$, $CD38^-$, $CD33^-$, $Thy-1^{low}$, $CD71^-$, $HLA-DR^-$, $CD45RA^{low}$, lin^- , $Rh\ 123^{low}$, $Ho33342^{low}$ [1, 18, 19, 37, 64]. Zastosowanie do izolowania KKM mogą mieć również przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi C-KIT. Z ostatnio opublikowanych badań wynika, że ekspresja tego receptora na powierzchni najwcześniejszych komórek hemopoetycznych jest wysoka [63]. Nie można również wykluczyć, że inne markery umożliwiające wydajniejszą izolację KKM czekają jeszcze na odkrycie.

Na rysunku 1 przedstawiliśmy przykład znakowania za pomocą przeciwciał monoklonalnych skoniugowanych z fluorochromami wczesnych komórek hemopoetycznych człowieka i ich izolowania za pomocą cytofluorometrii przepływowej

(badania własne). Komórki jednojądrowe szpiku kostnego człowieka pozbawione komórek adherentnych i limfocytów T znajdujące się w tzw. regionie zawierającym małe limfocyty (rys. 1A - region R2) znakowano za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko antygenowi CD34 i receptorowi c-kit. Za pomocą FACS izolowano następnie komórki najsilniej wybarwione (rys. 1C - region R1). Czystość wyizolowanej populacji wynosiła 99% (rys. 1D).

Jak wspomniano, prowadzone są obecnie intensywne prace nad opracowaniem wydajnej metody izolowania na makroskalę najwcześniejszych komórek hemopoetycznych człowieka za pomocą cytofluorometrii przepływowej. W tym celu próbuje się skonstruować nową generację sorterów przepływowych.

W chwili obecnej dla potrzeb transplantologii hematologicznej stosuje się jednak i rozwija inne strategie wzbogacania zawiesiny komórek szpiku kostnego i krwi obwodowej w KKM. Metody te polegają na izolowaniu komórek mających antygen CD34. Jak wspomniano, antygen ten występuje na powierzchni najwcześniejszych komórek hemopoetycznych człowieka [65], a przeszczepy frakcji komórek CD34⁺ umożliwiają pełną i długotrwałą rekonstrukcję hematologiczną biorców poddanych takim zabiegom [65]. W celu izolacji komórki hemopoetyczne znakuje się za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko różnym epitopom antygenu CD34 [8]. Przeciwciała anti-CD34⁺ w zależności od metody mogą być znakowane biotyną lub koniugowane z mikrosferami wykonanymi z materiału będącego "superparamagnetykiem".

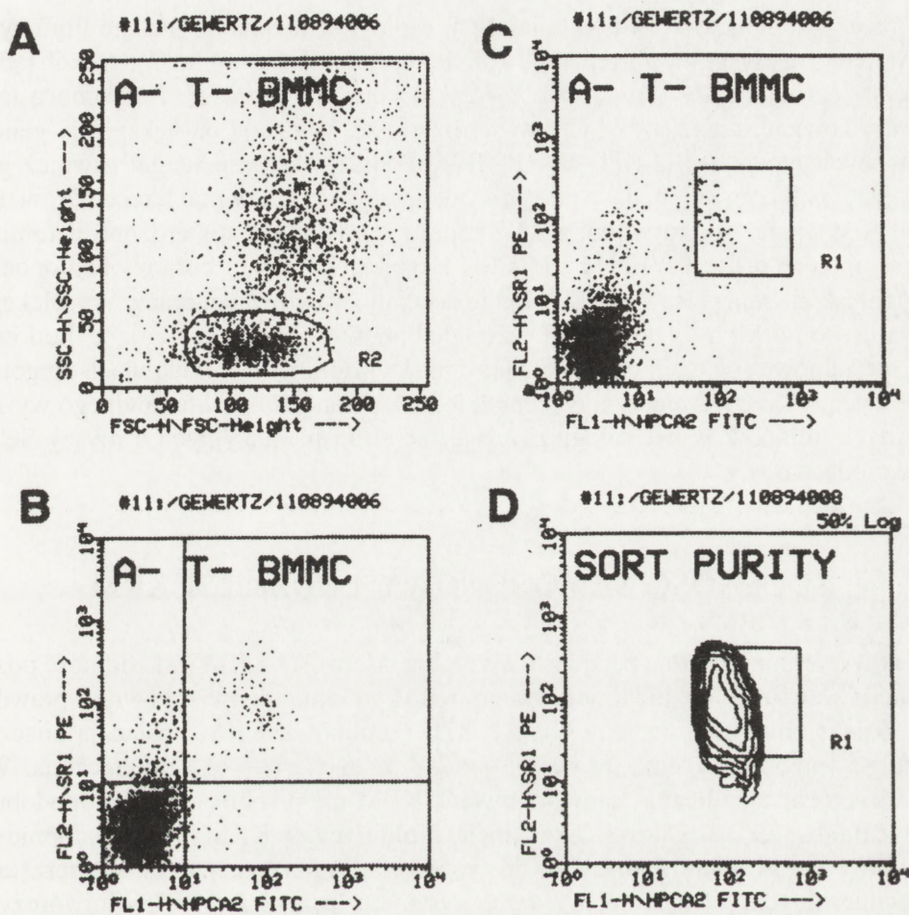
Wykorzystując przeciwciała anti-CD34 można izolować frakcję wzbogaconą w KKM za pomocą:

- kolumn awidynowych zatrzymujących komórki znakowane biotynylowanym przeciwciałem anti-CD34,

- technik absorpcji komórek CD34⁺ do powierzchni naczyń hodowlanych pokrytych przeciwciałem anti-CD34,

- pola magnetycznego umożliwiającego separację komórek opłaszczonych przeciwciałem anti-CD34 skoniugowanym z mikrosferami wykonanymi z "superparamagnetyku". Wydajność stosowanych technik jest zbliżona. Z danych literaturowych wynika, że odzyskiwanie izolowanych komórek CD34⁺ z zawiesiny komórek szpiku wynosi od 40 do 90%. Czystość frakcji izolowanych komórek CD34⁺ mieści się z kolei pomiędzy 50–90% [8, 64, 65].

Inną strategią wzbogacania zawiesiny ludzkich komórek hemopoetycznych w KKM i KKU jest technika elutriacji [64]. Zakładając, że najwcześniejsze komórki hemopoetyczne są wielkością zbliżone do frakcji tzw. małych limfocytów stosując technikę elutriacji można z zawiesiny komórek szpiku kostnego lub krwi obwodowej wyizolować frakcję zawierającą takie komórki. Odsetek KKM i KKU pośród uzyskanej metoda elutriacji frakcji małych limfocytów jest oczywiście ciągle niski. Dlatego wydaje się, że o ile metodą elutriacji znajdzie szersze zastosowanie kliniczne to głównie jako metoda tzw. wstępnej preselekcji komórek dla innych bardziej subtel-



Rys. 1. Cytogram komórek szpiku kostnego barwionych na obecność antygenu CD 34 i receptora C-KIT (badania własne): A – ocena ugięcia światła na brzegach komórki (FSC) oraz rozproszenia na ziarnistościach (SSC) umożliwiła zidentyfikowanie regionu R2 zawierającego tzw. małe komórki limfoidalne, komórki tego regionu poddano następnie ocenie; B – komórki z regionu R2 podwójnie wybarwione na obecność antygenu CD 34 (przeciwciała znakowane fluoresceiną) oraz receptora C-KIT (przeciwciała znakowane fikoerytryną); C – zaznaczony region R1 zawierający najjaśniejsze podwójnie znakowane komórki CD34⁺, C-KIT-R⁺, komórki takie sortowano i analizowano za pomocą techniki RT-PCR

nych metod izolacji, np. za pomocą cytofluorometrii przepływowej. Odmianą strategię doświadczalną izolowania KKM zastosowali z kolei ostatnio Berardi i wsp. [3]. Wychodząc z założenia, że komórki te utrzymywane są w fazie G₀ cyklu komórkowego, do zawiesiny komórek szpiku kostnego dodali 5- fluorouracyl i zastymulowali je za pomocą ligandu receptora c-kit (KL) oraz interleukiny-3 (IL-3). Komórki, które odpowiedziały na stymulację powyższymi cytokinami, zostały zniszczone cytostatykiem. Po tygodniu prowadzonej tak inkubacji okazało się, że tylko jedna komórka na

105 przeżyła selekcję. Komórki te miały morfologię zbliżoną do małego limfocytu. Były małe, miały gęstą chromatynę i delikatną otoczkę cytoplazmy wokół jądra. Wszystkie znajdowały się w fazie G_0 cyklu komórkowego [3]. Za pomocą tzw. zmodyfikowanej reakcji RT-PCR stwierdzono, że wykazują one ekspresję genów kodujących receptory: C-KIT, IL-1R, IL-6R. Silnej ekspresji ulegał również gen kodujący białko gp130, będące podjednostką przewodzącą sygnał z receptorów dla: IL-6, IL-11, LIF i onkostatyny M. W komórkach tych nie stwierdzono natomiast ekspresji receptorów dla: EpO i GM-CSF. Ekspresji innych receptorów hemopoetycznych, jak np. receptora dla STK-1L, nie oceniano w cytowanej pracy. Wyselekcjonowane komórki były znacznie wzbogacone w komórki: inicjujące hodowle długoterminowe (LTCIC) oraz tworzące ogniska proliferacji w hodowlach długoterminowych (CAFC). Autorzy nie oceniali jednak potencjału proliferacyjnego wyizolowanych komórek w heterologicznych testach transplantacyjnych u myszy SCID bądź płodach owcy.

ZDOLNOŚĆ SAMOODNOWY LUDZKICH KKM

Jak wspomniano, jedną z najważniejszych właściwości KKM jest zdolność pozostawania w fazie G_0 cyklu komórkowego. KKM po samoodnowieniu wraca prawdopodobnie z powrotem do fazy G_0 [64, 37]. Pomimo że KKM posiadają znaczną zdolność samoodnawiania, uważa się jednak, że może być ona ograniczona. Wg niektórych badaczy liczba "samoodnowień" KKM nie przekracza prawdopodobnie 50 podziałów [29, 30]. Danych, że potencjał proliferacyjny KKM może się stopniowo wyczerpywać w miarę podziałów, dostarczyły badania wykonane na zwierzętach doświadczalnych. W modelach z wykorzystaniem przeszczepów krwiotwórczych bądź uszkodzeniem układu krwiotwórczego za pomocą powtarzanych cykli chemioterapii wykazano, że KKM mają znaczną, lecz ograniczoną zdolność samoodnawiania [26, 29].

Dowodem, że taka sytuacja może mieć miejsce również u człowieka, są badania, w których oceniano długość telomerów w ludzkich komórkach hemopoetycznych [68]. Telomery są strukturami znajdującymi się na końcu chromosomów. Zbudowane są z długich odcinków powtarzających się sekwencji nukleotydów i rola ich polega na stabilizowaniu struktury chromosomów. Od dawna wiadomo było, że w wielu komórkach somatycznych, np. komórkach nabłonka jelitowego, po każdym z podziałów dochodzi do skrócenia długości telomerów. Obliczono, że każdy podział skraca długość telomeru średnio o 50–100 par zasad. Wysunięto hipotezę, że skrócenie telomerów poniżej pewnej minimalnej, wymaganej długości destabilizuje strukturę chromosomów do tego stopnia, że komórka przestaje się dzielić i rozpoczyna proces starzenia. Oceniając długość telomerów w ludzkich wczesnych komórkach hemopoetycznych mających wzór antygenowy $CD34^+$, $CD38^{low}$, a więc wzbogaconych w

KKM i KKU stwierdzono, że długość ich faktycznie zmniejsza się z wiekiem. Najdłuższe telomery stwierdzono w płodowych komórkach hemopoetycznych uzyskanych z wątroby płodowej lub krwi pępowinowej. Podobnie telomery we wczesnych komórkach hemopoetycznych ludzi młodych okazały się znacznie dłuższe niż u starszych. Zakładając, że proporcjonalne do odbytych podziałów skracanie telomerów ma miejsce również we frakcji KKM – to w celu utrzymania zapotrzebowania na produkcję komórek krwi obwodowej wynoszącą 4×10^{11} komórek dziennie – obliczono, że jedna ludzka KKM dzieli się średnio raz na 3–4 lata [30, 68]. Mechanizm utrzymujący KKM przez tak długi okres w fazie G_0 pozostaje ciągle jeszcze pasjonującą zagadką.

Jak wspomniano, jedna z komórek macierzystych powstała w wyniku podziału “rodzicielskiej” KKM może różnicować się w kierunku KKU. Warto nadmienić, że obowiązujący model tzw. stochastycznego podziału i różnicowania KKM został ostatnio nieco zmodyfikowany przez Ogawę [36]. W modyfikacji tej ograniczono w dużym stopniu pośredni udział wielopotencjalnych KKU. Zgodnie z powyższym KKM różnicuje się wprawdzie nadal przypadkowo, lecz za to bezpośrednio do jedno- lub oligo-liniowej KKU [36].

REGULACJA PROLIFERACJI KKM I KKU NA POZIOMIE SUB-KOMÓRKOWYM

Wiedza dotycząca regulacji proliferacji najwcześniejszych komórek hemopoetycznych na poziomie subkomórkowym stopniowo się zwiększa. Weryfikacja tych danych i uzyskanie dowodów bezpośrednich ciągle są jeszcze utrudnione faktem trudności wyizolowania do badań molekularnych czystej frakcji KKM. Stąd nasza wiedza jest głównie wynikiem badania ustalonych linii komórkowych lub frakcji komórek hemopoetycznych mniej lub bardziej wzbogaconych w KKM.

Identyfikacja genów i ich produktów białkowych biorących udział w regulacji proliferacji i różnicowania najwcześniejszych komórek hemopoetycznych ma nie tylko znaczenie czysto naukowe, lecz posiada przede wszystkim również ważny aspekt praktyczny. Zidentyfikowanie genów pełniących kluczową rolę w proliferacji KKM umożliwi w przyszłości opracowanie nowych strategii terapeutycznych umożliwiających ingerencję w procesy regulujące hemopoezę. Dzięki postępom biotechnologii pojawiają się nowe metody oddziaływania na proliferację komórek. Do najważniejszych należą: rekombinowane czynniki stymulujące i hamujące, muteiny, syntekiny, immunoadhezyny, rekombinowane cząsteczki antagonistów receptorowych, przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko czynnikom wzrostowym i ich receptorom oraz oligomery antysensowe [41, 51, 52].

Spośród różnych strategii identyfikowania i badania genów odpowiedzialnych za proliferację komórek hemopoetycznych do najważniejszych zaliczamy:

➤ identyfikację genów odpowiedzialnych za występujące spontanicznie w przyrodzie mutacje powodujące zaburzenia proliferacji komórek hemopoetycznych,

➤ efekty biologiczne wywołane nadmierną ekspresją genów w modelu myszy transgenicznych,

➤ badania oceniające wpływ delecji funkcji poszczególnych genów w wyniku tzw. homologicznej rekombinacji,

➤ identyfikowanie nowych genów w wyniku konstrukcji tzw. bibliotek subtrakcyjnych uzyskanych z komórek hemopoetycznych w różnych fazach cyklu lub poddanych stymulacji za pomocą np. czynników wzrostowych.

Ważnym problemem badawczym pozostaje nadal dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie KKM w fazie spoczynkowej G_0 cyklu komórkowego. Stan ten może być wynikiem:

➤ braku stymulacji KKM,

➤ obecności aktywnego hamowania KKM,

➤ wypadkową obydwu wymienionych powyżej procesów.

Autorzy uważają, że najbardziej słuszną wydaje się ostatnia z wymienionych możliwości. KKM i KKU odbierają sygnały z mikrośrodowiska. Docierają one poprzez receptory powierzchniowe [34]. Receptory pobudzające proliferację można podzielić na takie, które mają wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej (C-KIT, STK-1R, CSF-1R itd.) [14, 42] oraz takie, które po pobudzeniu ulegają przejściowej interakcji z tzw. cytoplazmatycznymi kinazami tyrozynowymi (EpO R, GM-CSF R, IL-3 R, G-CSF R, IL-6 R itd.) [34]. Do najważniejszych kinaz tyrozynowych cytoplazmatycznych należą kinazy: src, fyn, lyn, yes, tec, abl, Jak i Tyk. Należy podkreślić, że wyizolowano szereg nowych sekwencji cDNA kodujących receptory powierzchniowe mające aktywność kinaz tyrozynowych lub fosfataz. Czekają one na znalezienie swoistych ligandów i zbadanie roli, jaką pełnią w hemopoezie.

Pobudzenie receptorów hemopoetycznych powoduje aktywację swoistych białek biorących udział w transdukcji sygnału z powierzchni błony komórkowej do jądra. Pobudzenie receptorów prowadzi najczęściej do aktywacji szeregu kinaz tyrozynowych, treoninowych i serynowych fosforylujących białka wewnątrzkomórkowe. Pobudzenie niektórych z receptorów powierzchniowych komórki może również wywoływać poprzez aktywację specyficznych fosfataz defosforylację białek [59]. Repertuar drugich przekaźników wykorzystywanych przez poszczególne receptory w transdukcji sygnału często w dużym stopniu się pokrywa [14, 34, 42]. Wiadomo, że na powierzchni najwcześniejszych komórek hemopoetycznych obok ekspresji receptorów dla czynników stymulujących stwierdza się również obecność receptorów hamujących hemopoezę. Należy tu wymienić receptory dla: TNF α i β , IFN α , β , γ czy TGF- β . Ekspresję powyższych receptorów stwierdziliśmy za pomocą techniki RT-PCR w komórkach CD34⁺ szpiku kostnego człowieka. Na komórkach hemopoetycznych stwierdza się również obecność receptorów o tzw. siedmiu domenach przezbłonowych. Przez receptory takie działają chemokiny, np. IL-8 [34].

Ostatnio zidentyfikowano wiele genów odpowiedzialnych za “aktywne” utrzymanie komórek eukariotycznych w fazie spoczynkowej G_0 [53]. Do najważniejszych z nich należą: p53, Rb, p16, p21 oraz p27. Zgromadzono już sporo danych dotyczących molekularnych podstaw tej inhibicji. Jak wiadomo, aktywacja cyklu komórkowego w najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych jest kontrolowana przez pojawiające się cyklicznie białka, zwane cyklinami. Każda faza cyklu komórkowego jest kontrolowana przez inny zestaw cyklin i aktywujących je kinaz. Zgodnie z powyższym białko p53 aktywuje np. ekspresję innego białka inhibitorowego p21, które jest inhibitorem tzw. kinazy zależnej od cyklin, aktywującej cyklinę D. Cyklina D jest odpowiedzialna za wkroczenie komórki w fazę G_1 cyklu komórkowego. Białko p16 hamuje z kolei aktywność innej z kinaz zależnych od cyklin, co pociąga za sobą upośledzenie fosforylacji białka Rb. Brak fosforylacji białka Rb powoduje, że pozostaje ono w kompleksie inaktywującym czynnik transkrypcyjny E2F [23]. Białko E2F jest z kolei niezbędne do aktywacji ekspresji genu c-myc. Uważa się, że TGF- β – autokrotny inhibitor proliferacji KKM – oddziałuje hamująco na proliferację komórek hemopoetycznych poprzez aktywowanie w komórkach hemopoetycznych ekspresji białek p21 i p16 [40, 75].

W proliferacji komórek hemopoetycznych i w regulowaniu przejścia fazy G_1/S ważną rolę odgrywa białko c-myb i c-myc. Białko c-myb reguluje ponadto ekspresję zarówno antygeny CD34, jak i receptora C-KIT we wczesnych komórkach hemopoetycznych [27, 47]. Białko c-myb jest również niezbędne do aktywacji polimerazy α – enzymu odpowiedzialnego za replikację DNA podczas podziałów komórkowych. Aktywuje poza tym ekspresję genu cdc-2 – jednej z kinaz zależnej od cyklin – która kontroluje fazę G_2/M cyklu komórkowego [15].

Poznając rolę genów odpowiedzialnych za prawidłową proliferację ludzkich komórek hemopoetycznych istotnych informacji dostarczają badania identyfikujące uwarunkowane genetycznie mutacje – szczególnie te, które powodują zaburzenia w układzie krwiotwórczym. Podobnie ważnych informacji dostarcza analiza zaburzeń ekspresji genów wywołanych u zwierząt doświadczalnych za pomocą tzw. homologicznej rekombinacji lub strategii oligomerów antysensowych. Najważniejsze z nich przedstawiono w Tabeli 1.

Powoli zaczynamy poznawać mechanizmy molekularne warunkujące różnicowanie ludzkich wczesnych komórek hemopoetycznych w kierunku poszczególnych linii krwiotwórczych. Według Voso i wsp. duża rola przypada tutaj tzw. czynnikom transkrypcyjnym, czyli białkom regulującym na poziomie DNA ekspresję innych – liniowo specyficznych genów [70]. W tym ujęciu odpowiednie czynniki wzrostowe działające na najwcześniejsze komórki hemopoetyczne regulują zmiany w ekspresji genów pełniących rolę wewnątrzjądrowych czynników regulujących transkrypcję innych genów.

Zgodnie z powyższym uważa się, że indukcja genów kodujących czynniki transkrypcyjne GATA-1 i SCL warunkuje różnicowanie KKU w kierunku erytropoetycz-

TABELA 1. Ważniejsze przykłady defektów hemopoetycznych będących wynikiem wrodzonych lub indukowanych mutacji genetycznych – dotyczące zaburzeń funkcjonowania KKM i KKU [23, 46, 59, 60, 61]

Mutacje wrodzone	Mutacje indukowane
C-KIT R, KL, Hcpc, EpOR, NF-E2	c-myb, Rb, vav, src, GATA, STK-1R, N-ras, GAP, tal-1/SCL

nym i megakariocytowym [70]. Czynniki transkrypcyjny z rodziny c-ets zwany PU.1 jest z kolei ważnym elementem indukującym różnicowanie w kierunku mielo-monocytoidalnym. Wykazano, że podczas indukowanego za pomocą GM-CSF różnicowania komórek CD34⁺ ekspresja GATA-1 i PU.1 jest odwrotnie regulowana. Okazało się, że wysoka ekspresja PU.1 przy zmniejszeniu ekspresji GATA-1 jest niezbędna do zapewnienia wzrostu kolonii tworzonych przez GM-CFU. Podobnie nadmierna ekspresja PU.1 w erytroblastach blokuje różnicowanie w kierunku erytroidalnym, a nadmierna ekspresja GATA-1 w liniach mieloidalnych blokuje różnicowanie w kierunku mielo-monocytowym. Dokładne zgłębienie mechanizmów regulujących namnażanie najwcześniejszych komórek hemopoetycznych wymaga wiele pracy i ciągle jeszcze kryje dużo zagadek.

ZEWNAŁTRZKOMÓRKOWA REGULACJA PROLIFERACJI – KKM I ICH MIKROŚRODOWISKO

Powstawanie i różnicowanie się komórek hemopoetycznych często przyrównywane jest do dojrzewania owoców winogron w kiściach krzaku winorośli. Komórki te – podobnie jak trzymane przez pędy na krzaku owoce – utrzymywane są przez molekuly adhezyjne w mikrośrodku szpiku kostnego [24, 55]. Z chwilą, gdy komórki dojrzewają, uwalniają się i opuszczają szpik kostny wypłukiwane przez przepływającą krew. Wiemy, że z prądem krwi opuszcza szpik również pewna pula KKU. Liczba KKM przedostająca się ze szpiku do strumienia krwi jest z kolei w warunkach prawidłowych niezwykle niska.

Podczas ontogenezy obecność pierwszych KKM można zidentyfikować w wysepkach krwiotwórczych pęcherzyka żółtkowego [64]. Następnie w drugim miesiącu ciąży głównym narządem hemopoetycznym staje się wątroba płodowa. Począwszy od trzeciego trymestru ciąży KKM przemieszczają się z prądem krwi z wątroby do kości. Rozpoczyna się hemopoza szpikowa. Wynika z tego, że przynajmniej w tym okresie podczas przemieszczania KKM z wątroby do szpiku krew obwodowa jest bogatym źródłem najwcześniejszych komórek hemopoetycznych [22].

W ostatnim trymestrze ciąży, jak i podczas całego życia osobniczego KKM i KKU znajdują się w niszach hemopoetycznych w mikrośrodku szpiku kostnego. Mi-

krośrodowisko to składa się z elementów komórkowych, jak i pozakomórkowych. Elementy komórkowe to komórki fibroblastoidalne, makrofagi, śródbłonek naczyń, osteocyty beleczek kostnych oraz komórki tłuszczowe. Pomiedzy komórkami występuje substancja międzykomórkowa wypełniona różnymi glikoproteinami. Glikoproteiny te mają epitopy dla niektórych molekuł adhezyjnych występujących na powierzchni najwcześniejszych komórek hemopoetycznych oraz mają zdolność wiązania i "zagęszczania" w postaci gradientu cząsteczek niektórych czynników wzrostowych. Do ważniejszych glikoprotein należy fibronektyna.

W procesach adhezji KKM i KKU do elementów podścieliska istotną rolę odgrywają: molekuły adhezyjne z grupy intergryn, receptory dla niektórych czynników wzrostowych oraz cząsteczki pewnych antygenów. Opisano, że integryny VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) oraz VLA-5 ($\alpha 5\beta 1$) odpowiadają za adhezję najwcześniejszych komórek hemopoetycznych do cząsteczek fibronektyny oraz molekuł obecnych na komórkach śródbłonna naczyniowego [24, 38]. Ważną rolę w procesach adhezji odgrywają receptory C-KIT i STK-1R wiążące ligandy występujące m.in. na powierzchni błony komórkowej komórek stromalnych. Zgromadzono również dane, że sam antygen CD34 odgrywa istotną rolę w procesach adhezji komórek hemopoetycznych do sjalogligoprotein podścieliska [2]. Interakcja komórek hemopoetycznych poprzez molekuły adhezyjne z elementami podścieliska, jak się obecnie przypuszcza indukuje w KKM i KKU aktywność [55]:

➤ kinaz tyrozynowych zależnych od ognisk adhezji (ang. *focal adhesion protein-tyrosine kinases*, tzw. FAK) oraz

➤ kinazy C.

Sygnaly indukowane interakcją molekuł adhezyjnych z podścieliskiem prowadzące do aktywacji kinazy C oraz kinaz FAK mają hamować proces apoptozy w KKM i KKU [55]. KKM i KKU znajdujące się w mikrośrodowisku krwiotwórczym znajdują się pod wpływem czynników oddziałujących zarówno dodatnio, jak i ujemnie na ich proliferację i różnicowanie. Udział czynników wywierających wpływ ujemny był często do tej pory niedoceniany [28].

Do tej pory nie poznaliśmy jeszcze wszystkich czynników regulujących wczesne etapy hemopoezy. Produkowane są one lokalnie przez komórki podścieliska lub w odległych narządach (nerki, wątroba) i z prądem krwi docierają do szpiku. Do najważniejszych należą: KL, STK-1L, IL-1, IL-3 oraz IL-6. Z badań Berardi i wsp., jak i obserwacji własnych (rys. 2) wynika, że ekspresja tych receptorów jest wykrywalna faktycznie za pomocą techniki RT-PCR w najwcześniejszych ludzkich komórkach hemopoetycznych [3].

Szczególną uwagę warto poświęcić czynnikom hemopoetycznym działającym poprzez receptory obdarzone wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej. Do grupy tej należą: KL, STK-1L, IGF-I, insulina, bFGF oraz CSF-1 [16, 25, 42, 45, 47].

KL jest z jednym z najważniejszych, poznanych do tej pory czynników hemopoetycznych regulujących proliferację KKM i KKU [42, 27]. Jak wspomniano, uważa



Rys. 2. Analiza za pomocą techniki RT-PCR ekspresji wybranych receptorów mających wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej w ludzkich komórkach $CD34^+ C-KIT-R^+$ – sortowanych za pomocą cytofluorometru przepływowego z regionu R1 (rys. 1) (badania własne); pozycja 1 – mRNA uzyskane z komórek $CD34^+ C-KIT-R^+$, pozycja 2 – kontrola pozytywna reakcji RT-PCR, pozycja 3 – kontrola negatywna reakcji RT-PCR, ϕ – marker DNA; produkty reakcji RT-PCR po przeniesieniu z żelu agarozowego na membranę nylonową hybrydowały ze swoistymi sondami

się, że występuje on na powierzchni najwcześniejszych ludzkich KKM. U myszy wrodzone mutacje receptora (locus *w*), jak i jego ligandu (locus *sl*) powodują zaburzenia w proliferacji najwcześniejszych komórek hemopoetycznych manifestujące się fenotypowo anemią makrocytową, basofilopenią oraz niedoborem eozynofilów. Z badań własnych wynika również, że zaburzenie ekspresji receptora STK-1 w ludzkich komórkach $CD34^+$ prowadzi do upośledzenia proliferacji komórek inicjujących hodowle długoterminowe szpiku kostnego [42, 62].

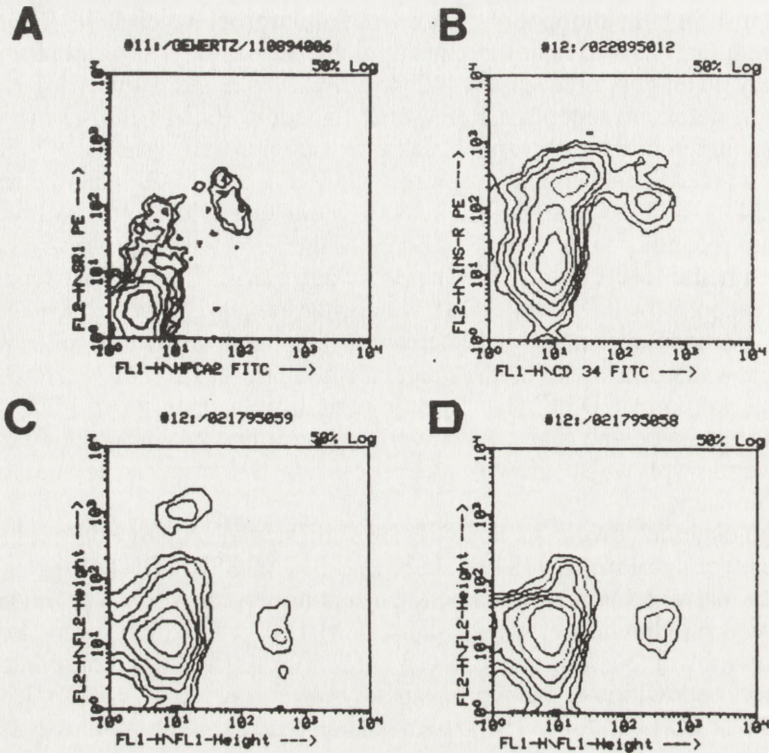
Udział insuliny, insulinopodobnych czynników wzrostowych (IGF-I, IGF-II) oraz bFGF w regulacji najwcześniejszych etapów hemopoetyzy był wg autorów prezentowanej pracy do tej pory przeceniany [42, 45]. Myszy z indukowanym doświadczalnie wrodzonym defektem receptora IGF-I oraz ligandów IGF-I i IGF-II nie wykazują bowiem zaburzeń hemopoetycznych. Jak przedstawiono na rysunkach 2 i 3, z badań własnych wynika, że ekspresja receptorów dla IGF-I oraz bFGF na ludzkich komórkach CD34⁺ c-KIT-R⁺ jest bardzo niska – poniżej czułości stosowanych metod detekcji lub receptory te nie ulegają w ogóle ekspresji w najwcześniejszych ludzkich komórkach hemopoetycznych. Biorąc pod uwagę pierwszą z możliwości zaburzono ekspresję receptorów IGF-I oraz bFGF w najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych za pomocą oligomerów antysensowych. Okazało się, że oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA receptorów dla IGF-I i bFGF nie wpływały na proliferację komórek CD34⁺. Ostatnio udowodniliśmy jednak, że insulina, IGF-I oraz IGF-II odgrywają pewną rolę w końcowym dojrzewaniu krwinek układu czerwono-krwinkowego, wpływając głównie na proces ich dojrzewania czynnościowego i hemoglobinizację.

W ciągu ostatnich dwóch lat pojawiły się doniesienia, że geny kodujące niektóre z tzw. wczesnych cytokin (IL-1, STK-1L, KL, IL-3, GM-CSF, TGF-β) ulegają ekspresji w ludzkich najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych. Za pomocą techniki RT-PCR wykryto bowiem ekspresję: IL-3 i GM-CSF w ludzkich komórkach CD34⁺ krwi pępowinowej [57], ekspresję IL-1β [71] i TGF-β [6, 75] w komórkach CD34⁺ CD38⁻ krwi pępowinowej i szpiku kostnego oraz ekspresję KL i STK-1L w komórkach CD34⁺, c-KIT-R⁺, STK-1R⁺ szpiku kostnego uzyskanych od dorosłych dawców [43, 44]. Przemawiałoby to za możliwością istnienia w najwcześniejszych komórkach hemopoetycznych autokrynych pętli o charakterze stymulującym (IL-1, KL, STK-1L, IL-3, GM-CSF) bądź hamującym (TGF-β) pewne etapy proliferacji i różnicowania [6, 43, 44, 57, 71, 75]. Zaburzenie ekspresji KL w komórkach CD34⁺ szpiku kostnego za pomocą oligomerów antysensowych prowadziło do zmniejszenia ich przeżywalności w warunkach tzw. hodowli bezsurowiczych [43, 44]. Udział tzw. hemopoetycznych oligopeptydów (tetra i pentamerów) w regulacji ludzkiej hemopoetyzy wymaga dalszych badań [28]. Wyjaśnienia wymagają szczególnie podstawy molekularne ich interakcji z KKM i KKU.

ŹRÓDŁA KOMÓREK HEMOPOETYCZNYCH DO PRZESZCZEPIEŃ

Przeszczepiana zawiesina komórek hemopoetycznych powinna zawierać taką liczbę KKM i KKU, która zapewni pełną rekonstrukcję hematologiczną biorcy [21, 30]. Jak wspomniano, odnowę hematologiczną po przeszczepieniu możemy podzielić na dwie fazy:

- fazę wczesną – będącą wyrazem proliferacji zawartych w przeszczepie mono- i wielopotencjalnych KKU,
- fazę późną – za której ustanowienie odpowiedzialne są przeszczepiane KKM.



Rys. 3. Podwójne barwienie ludzkich komórek jednojądrowych szpiku kostnego na obecność antygeny CD34 (FL-1) oraz obecność receptorów o wewnętrznej aktywności kinazy tyrozynowej (FL-2): A – przeciwciała: anti-CD34-fluoresceina, anti-C-KIT-R fikoerytryna, B – przeciwciała: anti-CD34-fluoresceina, anti-receptor insuliny-fikoerytryna, C – przeciwciała: anti-CD34-fluoresceina, anti-bFGF-R fikoerytryna, D – przeciwciała: anti-CD34-fluoresceina, anti-IGF-I-R fikoerytryna; jak przedstawiono na rysunku na komórkach mających antygen CD34 nie stwierdzono obecności receptorów dla bFGF oraz IGF-1

Faza wczesna odpowiedzialna jest za złagodzenie objawów klinicznych cytopenii występującej w pierwszym okresie po zabiegu. Faza późna jest z kolei wyrazem pełnej i długotrwałej rekonstrukcji pacjenta po wykonanej transplantacji. Przeszczep powinien zawierać więc wystarczającą liczbę zarówno KKU, jak i KKM. Dowodem powodzenia zabiegu obok uzyskania pełnej rekonstrukcji hematologicznej przez biorcę jest udowodnienie, że dojrzałe elementy morfotyczne krwi występujące w szpiku kostnym i krwi obwodowej powstały rzeczywiście z przeszczepionych KKM. Dowód taki trudny jest do przedstawienia w przypadku przeszczepień autologicznych.

W chwili obecnej źródłami komórek hemopoetycznych do przeszczepień są: szpik kostny, krew obwodowa oraz krew pępowinowa [21, 20, 35]. Przeszczepy komórek

krwiotwórczych wątroby płodowej jak do tej pory nie znalazły natomiast szerszego zastosowania.

Najszerzej wykorzystywane w transplantologii hematologicznej są oczywiście komórki szpiku kostnego. Szpik kostny pobiera się od dawcy drogą wielokrotnych aspiracji jam szpikowych. Pobranie komórek szpiku wiąże się więc z reguły z koniecznością ich pobrania w warunkach stresu operacyjnego. Dlatego od pewnego czasu próbuje się wykorzystać do przeszczepień komórki uzyskane z krwi obwodowej [4, 12, 20, 22, 54, 66]. Pobiera się je drogą kilkakrotnie powtarzanych leukofrez – czyli separacji komórek jednojądrowych ze strumienia krwi za pomocą specjalnego urządzenia. Komórki krwi obwodowej wykorzystywane są coraz częściej w przeszczepieniach autologicznych. Uważa się, że po dopracowaniu technik mobilizacji KKM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej, jak i ich ekspansji *ex vivo* krew obwodowa może stać się konkurencyjnym wobec szpiku kostnego źródłem komórek do przeszczepień.

Coraz poważniejszą rolę jako źródło komórek do przeszczepów u dzieci odgrywa krew pępowinowa [35]. Zawiera ona sporo KKM i KKU. Należy pamiętać, że poród jest jednym z największych stresów, jakiemu poddawany jest podczas życia organizm żywy. Występujące w krwi pępowinowej wczesne komórki hemopoetyczne są prawdopodobnie następstwem stresu porodowego – powodującego mobilizację wczesnych komórek hemopoetycznych ze szpiku do krwi.

Z chwilą opracowania optymalnych protokołów ekspansji krew pępowinowa będzie mogła znaleźć zastosowanie jako źródło komórek do przeszczepów również u dorosłych. Nad zagadnieniem tym pracujemy obecnie.

Ogólnie ujmując w transplantologii hematologicznej niezależnie od źródła pochodzenia komórek hemopoetycznych (szpik, krew) wykorzystuje się coraz szerzej do przeszczepień frakcję komórek mających antygen CD34 [65]. Selekcja tych komórek:

➤ umożliwi wykonanie zabiegu mniejszą objętością przeszczepianej zawiesiny (mniejsze obciążenie pacjenta używanym do krioprezervacji dwumetylosulfotlenkiem),

➤ prowadzi do usunięcia limfocytów T z przeszczepu i tym samym jest sposobem profilaktyki choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi w zabiegach allogenicznych (wpływ usunięcia limfocytów T na efektywność przyjęcia przeszczepu oraz reakcję przeszczep przeciwko nowotworowi wymaga dalszych badań),

➤ umożliwi oddzielenie komórek nowotworowych tych guzów, które nie mają antygeny CD34 na powierzchni od przeszczepianych komórek hemopoetycznych,

➤ umożliwi poddanie ekspansji komórek CD34 oraz wykorzystanie ich w zabiegach terapii genowej.

KREW OBWODOWA JAKO ŹRÓDŁO KKM DO PRZESZCZEPIEŃ

Porównując model hemopoezy do dojrzewania winogron na krzaku wspomnieliśmy, że dojrzałe komórki wypłukiwane są do krwi obwodowej przez przepływający przez jamy szpikowe strumień krwi. Wraz z komórkami dojrzałymi do krwi obwodowej wnika również pewna liczba KKU.

Jak wspomniano, odsetek KKM przedostający się do krwi obwodowej jest w warunkach prawidłowych bardzo niski. Jak wspomniano, trudno jest ocenić liczbę KKM występujących w krwi obwodowej [20, 22]. Dowodem czynnościowym, że występują tam rzeczywiście, są wyniki pomyślnych allotransplantacji u zwierząt doświadczalnych. W przypadku człowieka krew obwodowa stosowana była głównie w przeszczepieniach autologicznych. Pojawiają się jednak już pierwsze wyniki zabiegów w układzie allogenicznym. Dane dotyczące występowania chimeryzmu hematologicznego u biorców allogenicznych komórek krwi obwodowej są jednak jak do tej pory jeszcze zbyt skąpe.

Znacznie łatwiej można natomiast ocenić w krwi obwodowej przedział KKU. Oceniając ich zawartość stwierdzono, że komórki jednojądrowe krwi obwodowej zawierają od 1/10 do 1/100 CFU-GM i BFU-E obecnych pośród komórek jednojądrowych szpiku kostnego. Z drugiej strony antygen CD34 będący markerem wczesnych komórek hemopoetycznych, występujący na powierzchni 1–4% komórek jednojądrowych szpiku kostnego jest obecny jedynie na 0,01–0,4% komórek jednojądrowych krwi obwodowej [20, 22].

Jak wynika z przytoczonych danych, stężenie najwcześniejszych komórek hemopoetycznych pośród komórek krwi obwodowej jest niskie. Z tego względu stosuje się dwie strategie pozwalające na zwiększenie liczby wczesnych komórek hemopoetycznych w krwi obwodowej. Są to:

- techniki polegające na mobilizacji KKM i KKU ze szpiku kostnego do krwi,
- metody ekspansji *ex vivo* pobranych z krwi komórek CD34⁺.

Za pomocą technik mobilizacji można zwiększyć liczbę KKM i KKU w krwi obwodowej 100–500-krotnie. Przed 20 laty Chervenick stwierdził, że liczba komórek progenitorowych we krwi zwiększa się w okresie wystąpienia odnowy hematologicznej po podaniu cyklofosfamidu [7]. Cyklofosfamid jest obecnie najczęściej stosowanym cytostatykiem służącym do mobilizacji KKM i KKU. Pacjent otrzymuje powyższy lek i w okresie odnowy hematologicznej wykonuje się w odstępach czasowych kilkakrotnie zabiegi leukoferezy krwi obwodowej.

Drugim ze sposobów mobilizacji – szczególnie wtedy, gdy myśli się o pobraniu komórek od zdrowego dawcy do przeszczepień allogenicznych, są cytokiny. W 1988 r. Sociński stwierdził, że liczba KKU zwiększa się we krwi obwodowej u pacjentów po podaniu GM-CSF [63]. Obecnie udoskonala się protokoły mobilizacji. Stosowane są również różne kombinacje cytostatyków i cytokin [39]. Cytokiny próbuje się stosować sekwencyjnie: najpierw wczesne (KL lub GM-CSF), a następnie

tzew. późne (G-CSF). Udowodniono, że KL mobilizuje wczesne komórki hemopoetyczne zmniejszając prawdopodobnie na ich powierzchni ekspresję molekuł adhezyjnych z grupy integryn. Na uwagę zasługują również próby mobilizacji wczesnych komórek szpiku u małp wykonane przez Papayannopoulou & Nakamoto. Badacze ci mobilizowali z dobrym skutkiem KKM i KKU szpiku do krwi obwodowej za pomocą przeciwciał mnoklonalnych skierowanych przeciwko integrynie VLA4 [38]. W zmniejszeniu ekspresji integryn na powierzchni wczesnych komórek hemopoetycznych mogą znaleźć zastosowanie również oligomery antysensowe skierowane przeciwko mRNA kodującemu odpowiednie białka molekuł adhezyjnych. Ostatnio pojawiły się jednak dane, że wczesne komórki hemopoetyczne mobilizowane za pomocą zablokowania czynności integryn mogą posiadać utrudnione możliwości wszczepienia, co powoduje, że krążą one "bezdomy" we krwi [73].

W tabeli 2 podsumowano najważniejsze sposoby mobilizacji wczesnych komórek hemopoetycznych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej.

Z opublikowanych ostatnio danych wynika, że mobilizowane komórki $CD34^+$ krwi obwodowej różnią się od komórek $CD34^+$, które występują we krwi w warunkach prawidłowych tym, że mają mniejszą ekspresję receptora c-kit, antygeny CD71 (receptor transferynowy) oraz gromadzą mniej rodaminy 123. Mniejsza ekspresja dwóch ostatnich może świadczyć o znacznym odsetku komórek bardzo wczesnych [67]. Z drugiej strony Murray i wsp. donieśli, że komórki $CD34^+$ $Thy-1^+$ lin^- krwi obwodowej mobilizowane ze szpiku kostnego za pomocą GM-CSF i G-CSF zawierają komórki mogące ustanowić długotrwałą hemopoezę i limfopoezę po przeszczepieniu myszom SCID [32].

Inna strategia pozwalająca na zwiększenie liczby wczesnych komórek hemopoetycznych w uzyskanej zawieszynie komórek krwi obwodowej jest ich ekspansja *ex vivo* w warunkach hodowli.

TABELA 2. Różne metody mobilizacji wczesnych komórek hemopoetycznych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej

1. Cytostatyki	cyklofosfamid etopozyd cisplatyna kombinacje cytostatyków
2. Cytokiny	G-CSF, GM-CSF, IL-3, KL IL-11?, IL-8? kombinacje cytokin: G-CSF ⁺ KL
3. Kombinacja cytostatyku + cytokina	
4. Oddziaływanie na molekuły adhezyjne	przeciwciała monoklonalne oligomery antysensowe?

METODY EKSPANSJI KKM

Technika ekspansji polega na próbie namnożenia poza organizmem w warunkach hodowli *in vitro* frakcji najwcześniejszych komórek hemopoetycznych. Opracowano różne modyfikację tej techniki [5, 6, 17, 56, 58, 69]. Najczęściej poddawane są ekspansji wyizolowane komórki mające antygen CD34. Niektórzy badacze uważają, że dodatek komórek terminalnie zróżnicowanych może niekorzystnie wpływać na namnażanie komórek CD34⁺. Pożywka hodowlana zmieniana jest okresowo lub w sposób ciągły za pomocą specjalnych biogeneratorów. W niektórych modelach dno naczyń hodowlanych pokryte jest napromienionymi ludzkimi lub heterologicznymi komórkami pochodzącymi z różnych linii stromalnych podścieliska szpiku kostnego. Do pożywki dodawane są odpowiednie kombinacje czynników wzrostowych mających za zadanie stymulować proliferację. Zadaniem ekspansji jest namnożenie jak największej liczby wczesnych komórek hemopoetycznych przy założeniu, że postępując w ten sposób nie zwiększamy puli komórek dojrzałych oraz KKM kosztem wyczerpania potencjału proliferacyjnego KKM i zmniejszenia ich liczby.

Dlatego tak ważne znaczenie ma odpowiedni dobór czynników wzrostowych. Czynniki te powinny zachować zdolność do samoodnawiania KKM oraz nie prowadzić do terminalnego różnicowania KKM [72]. Kombinacja czynników wzrostowych nie powinna również powodować różnicowania KKM w kierunku jednej z linii hemopoetycznych kosztem innych [9]. Ze względu na powyższe na szczególną uwagę zasługują badania Muench i wsp., którzy udowodnili w modelu mysim, że dodanie do komórek szpiku poddawanych ekspansji mieszaniny: KL + IL-1 β + IL-3 zwiększało liczbę KKM nie prowadząc jednocześnie do upośledzenia potencjału proliferacyjnego KKM [31].

Jak wspomniano, różne grupy autorów stosują jednak różne kombinacje czynników wzrostowych. Brugger i wsp. zalecają np. mieszaninę: KL + IL-1 β + IL-3 + EpO + IFN- γ [5]. Wydaje się jednak, że wprowadzenie EpO może powodować różnicowanie KKM w kierunku erytropoetycznym [9]. Z drugiej strony IFN- γ z kolei jest inhibitorem wzrostu klonalnego *in vitro* KKM. Dlatego też Henschler i wsp. stosują podobny zestaw czynników wzrostowych, lecz pozbawiony IFN- γ [17]. Sato i wsp. zalecają z kolei do ekspansji mieszaninę: KL + GM-CSF + IL-6 + G-CSF [56]. Wprowadzenie G-CSF może jednak powodować wybiórcze różnicowanie KKM w kierunku granulopoezy [9].

Udoskonalając techniki ekspansji musimy pamiętać o tym, że niezwykle trudno jest odtworzyć warunki mikrośrodowiska krwiotwórczego, jakie panują w żywym organizmie *in vivo*. Nie ulega jednak wątpliwości, że protokoły ekspansji będą ulegały optymalizacji. Praktyczne zastosowanie znajduje powoli sklonowany niedawno wczesny hemopoetyczny czynnik wzrostowy, jakim jest STK-1L [11].

Oryginalną strategię zwiększenia ekspansji ludzkich komórek CD34⁺ CD38⁻ zaproponował ostatnio Hatzfeld i wsp. [6]. Badacze ci w warunkach eksperymental-

nych zablokowali wewnętrzną, autokrynną pętlę hamującą proliferację – jaką jest os TGF- β - TGF- β receptor – za pomocą swoistych oligomerów antysensowych skierowanych przeciwko mRNA TGF- β . Równie efektywne okazały się przeciwciała monoklonalne wiążące wydzielany do medium hodowlanego TGF- β . Strategia ta będąca przykładem odblokowywania mechanizmów hamujących proliferację może obok prób stymulacji znaleźć praktyczne zastosowanie w próbach ekspansji *ex vivo* ludzkich KKM.

Na uwagę zasługują również próby krótkotrwałej stymulacji przeszczepianych KKM i KKU w okresie poprzedzającym zabieg. Stwierdzono bowiem, że trzydniowa stymulacja komórek szpiku *in vitro* za pomocą IL-3 i GM-CSF przyspieszała rekonstytucję hematologiczną po zabiegu [33]. Podobnie kilkudziesięciogodzinna stymulacja komórek CD34⁺ przed zamrożeniem za pomocą mieszaniny: KL + IL-1 β + IL-3 zwiększała potencjał proliferacyjny komórek po rozmrożeniu [49, 50].

Podsumowując, stymulacja komórek szpiku *in vitro* przed przeszczepieniem jest znacznie tańsza i bezpieczniejsza niż ogólnoustrojowe podawanie cytokin po zabiegu. Strategia taka mogłaby umożliwić zredukowanie dawek cytokin podawanych pacjentom po przeszczepieniu w celu uzyskania przyspieszenia odnowy hematologicznej. Zespół nasz pracuje obecnie nad opracowaniem optymalnych protokołów takiego postępowania.

PODSUMOWANIE

Celem pracy było przybliżenie czytelnikowi postępów dotyczących biologii najwcześniejszych komórek hemopoetycznych, metod ich izolacji, jak i praktycznego wykorzystania w medycynie klinicznej. Wiele wskazuje na to, że przeszczepy uzyskanych ze szpiku, krwi obwodowej lub krwi pępowinowej KKM w połączeniu z ekspansją *in vitro* staną się rutynowym postępowaniem w transplantologii hematologicznej XXI wieku.

Zanim to nastąpi, należy dopracować optymalne techniki identyfikowania i izolacji ludzkich KKM. Poznanie mechanizmów regulujących ich samoodnawianie i różnicowanie pozwoli z kolei na optymalizację protokołów ekspansji KKM w warunkach hodowli *in vitro*. Dalszych badań wymaga indukowanie w przeszczepianych komórkach efektu: przeszczep przeciwko nowotworowi. W tym kontekście na szczególną uwagę zasługują próby ekspansji w komórkach CD34⁺ krwi obwodowej prezentujących antygen komórek dendrytycznych [13]. Komórki takie po uczuleniu “*in vitro*” antygenami nowotworowymi i podaniu z powrotem pacjentowi mogłyby skuteczniej indukować antynowotworową odpowiedź immunologiczną. Jak widać na podanym przykładzie, frakcja KKM będzie coraz częściej poddawana różnym procedurom terapii genowej. Przed hematologią eksperymentalną, biologią molekularną, immu-

nologią oraz transplantologią kliniczną stanęło wiele pasjonujących do rozwiązania zagadnień.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAUM CM, WEISSMAN IL, TSUKAMOTO AS. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**, 2804–2808.
- [2] BAUMHUETER S, SINGER MS, HENZEL W, HEMMEREICH S, RENZ M, ROSEN SD, LASKY LA. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science* 1993, **262**, 436–438.
- [3] BERARDI AC, WANG A, LEVINE JD, LOPEZ P, SCADDEN DT: Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995, **267**, 104–108.
- [4] BRUGGER W, HENSCHLER R, HEIMFELD S, BERENSON RJ, MERTELSMANN R, KANZ L. Positively selected autologous blood CD34⁺ cells mediate identical hematopoietic engraftment after high-dose VP16, ifosfamide, carboplatin, and epirubicin. *Blood* 1994, **84**, 1421–1426.
- [5] BRUGGER W, MOCKLIN W, HEIMFELD S, BERENSON RJ, MERTELSMANN R, KANZ L. *Ex vivo* expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cell by stem cell factor, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, interferon- γ , and erythropoietin. *Blood* 1993, **81**, 2579–2584.
- [6] CARDOSO AA, LI MA, BATARD P, HATZFELD A, BROWN EL, LEVESQUE JP, SOOKEDO H, PANTERNE B, SANSILVESTRI P, 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.
- [7] CHERVENICK PA. Interrelationship of colony-stimulation and colony forming cells in blood and marrow regeneration. *J Clin Invest* **52**: 18a, 1973 (abstr).
- [8] COLLINS RH. CD34⁺ selected cells in clinical transplantation. *Stem Cells* 1993, **12**, 577–585.
- [9] DEHANN G, ENGEL C, DONTJEB, NIJHOF W, LOEFFLER M. Mutual inhibition of murine erythropoiesis and granulopoiesis during combined erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, and stem cell factor administration: *in vivo* interactions and dose-response surfaces. *Blood* 1994, **84**, 4157–4163.
- [10] DICK JE. Immune-deficient mice as model of normal and leukemic human hematopoiesis. *Cancer Cells* 1991, **3**, 39–48.
- [11] DOOLEY DC, HEINRICH M, PLUNKETT JM, OPPENLANDER BK, PEETOOM F. FLT3 ligand (FLT3L) and stem cell factor (SCF) support the *ex vivo* expansion of primitive human hematopoietic cells: response of long-term culture initiating cells (LTCIC) and CD34⁺ CD38⁻ cells. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 368a.
- [12] EAVES CJ. Peripheral blood stem cells reach new heights. *Blood* 1993, **82**, 1957–1959.
- [13] FISH P, GARBE A, KOHLER G, SCHAEFER HE, WIDER D, BRUGGER W, KANZ L. *Ex vivo* generation of functionally active antigen presenting cells from peripheral blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1994, **84** (suppl 1), 228a.
- [14] GEER P, HUNTER T, LINDBERG RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994, **10**, 251–337.
- [15] GONDA TJ. Targets for trans-activatin by myb. *Cancer Cells* 1991, **3**, 22–23.
- [16] HANNUM C, CULPEPPER D, CAMPBELL D, McCLANAHAN T, ZURAWSKI S, BAZAN JF, KASTELEIN R, HUDAK S, WAGNER J, MATTSON J, LUH J, DUDA G, MARTINA N, PETERSON D, MENON S, SHANAFELT A, MUENCH M, KELNER G, NAMIKAWA R, RENNICK D, RONCAROLO M, ZLOTNIK A, ROSNET O, DUBREULL

- P, BIRNBAUM D, LEE F. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994, **368**, 643–648.
- [17] HENSCHLER R, BRUGGER W, LUFT T, FREY T, MERTELSMANN R, KANZ L. Maintenance of transplantation potential in *ex vivo* expanded CD34⁺ selected human peripheral blood progenitor cells. *Blood* 1994, **84**, 2898–2903.
- [18] HUANG S, TERSTAPPEN LWMM. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells (correction). *Nature* 1994, **368**, 664.
- [19] HUANG SH, TERSTAPPEN LWMM. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature* 1992, **360**, 745–749.
- [20] JANSSEN WE. Peripheral blood and bone marrow hematopoietic stem cells: are they the same. *Seminars in Oncology* 1993, **20**, 19–27.
- [21] JĘDRZEJCZAK WW, SZCZYLIK C, RATAJCZAK MZ, POJDA Z. Przeszczepianie szpiku jako metoda lecznicza. w: Ultrastruktura funkcjonalna komórki, tom V, Kawiak J, Osuchowska Z, Jakobisiak M (red.). PWN, Warszawa 1991, 204–239.
- [22] KESSINGER A. Is blood or bone marrow better? *Stem Cells* 1993, **11**, 290–295.
- [23] LEE EYHP, CHANG CY, HUN N, WANG YCJW, LAICC, HERRUP K, LEE WH, BRADLEY A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 1992, **359**, 288–294.
- [24] LONG MW, BRIDDELL R, WALTER AW, BRUNO E, HOFFMAN R. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. *J Clin Invest* 1992, **90**, 251–255.
- [25] LYMAN SD, JAMES L, BOS TV, deVRIES P, BRASEL K, GLINIAK B, HOLLINGSWORTH LT, PICHA KS, McKENNA HJ, SPLETT RR, FLETCHER FA, MARASKOVSKY E, FARRAH T, FOXWORTH D, WILLIAMS DE, BECKMANN MP. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 1993, **75**, 1157–1167.
- [26] MAUCH P, HELLMAN S. Loss of hematopoietic stem cell self-renewal after bone marrow transplantation. *Blood* 1989, **74**, 872–875.
- [27] MELOTTI P, CALABRETTA B. Ets-2 and c-Myb act independently in regulating expression of the hematopoietic stem cell antigen CD34⁺. *J Biol Chem* 1994, **269**, 25303–25309.
- [28] MOORE MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991, **78**, 1–19.
- [29] MOORE MAS. Does stem cell exhaustion result from combining hematopoietic growth factors with chemotherapy? If so, how do we prevent it? *Blood* 1992, **80**, 3–7.
- [30] MOORE MAS. Hematopoietic reconstitution: new approaches. *Clin Cancer Res* 1995, **1**, 3–9.
- [31] MUENCH M, FIRPO MT, MOORE MAS. Bone marrow transplantation with interleukin-1 plus κ it-ligand *ex vivo* expanded bone marrow accelerates hematopoietic reconstitution in mice without the loss of stem cell lineage and proliferative potential. *Blood* 1993, **81**, 3463–3473.
- [32] MURRAY L., CHEN B., GALY A., CHEN S., TUSHINSKI R., UCHIDA N., NEGRIN R., TRICOT G., JAGANNATH S., VESOLE D., BARLOGIE B., HOFFMANN R., TSUKAMOTO A. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34⁺ Thy-1⁺ Lin-subpopulation from mobilized peripheral blood. *Blood* 1995, **85**, 368–378. Hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991, **78**, 1–19.
- [33] NAPARSTEK E, HARDAN Y, BEN-SHAHAR M, NAGLER A, OR R, MUMCUOGLU M, WEISS L, SAMUEL S, SLAVIN S. Enhanced marrow recovery by short preincubation of marrow allografts with human recombinant interleukin-3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1992, **80**, 1673–1678.
- [34] NICOLA N.A. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem* 1989, **58**, 45–77.

- [35] NICOLA J, HOWS JM, BRADLEY BA. Cord blood transplantation: a practical option? *Brit J Haematol* 1994, **87**, 1–5.
- [36] OGAWA M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993, **81**, 2844–2853.
- [37] ORLIC D, BODINE DM: What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up! *Blood* 1994, **84**, 3991–3994.
- [38] PAPAYANOUPOLOU T, NAKAMAOTO B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**, 9374–9378.
- [39] PETTENGELL R, TESTA NG, SWINDELL R, CROWTHER D, DEXTER TM. Transplantation potential of hematopoietic cells released into the circulation during routine chemotherapy for Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993, **82**, 2239–2248.
- [40] PINES J. Arresting developments in cell-cycle control. *TIBS* 1994, **19**, 143–145.
- [41] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Oligonucleotide-based therapeutics of human malignancies. w: *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Eckstein F., Lilley DMJ (red.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 1994, 298–326.
- [42] RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM. Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1993, **20**, 279–295
- [43] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, MOORE J, GEWIRTZ AM. FACS sorted human CD34⁺ bone marrow cells coexpress C-KIT ligand (KL) and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand (STK-1L). *Blood* 1994, **84** suppl 1, 370a.
- [44] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, MOORE JS, PLETCHER CH, GEWIRTZ AM. Expression, and physiologic significance, of kit ligand and stem cell tyrosine kinase-1 receptor ligand in normal human CD34⁺, c-KIT R⁺ marrow cells. *Blood* 1995 (w druku).
- [45] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, ONODERA K, MOORE J, RATAJCZAK J, KREGENOW DA, DeRIEL K, GEWIRTZ AM. A reappraisal of the role of insulin-like growth factor I in regulation of human hematopoiesis. *J Clin Invest* 1994, **94**, 320–327.
- [46] RATAJCZAK MZ, LUGER S, GEWIRTZ AM. Rola receptora C-KIT i jego ligandu w regulacji procesów krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1992, **19**, 187–204.
- [47] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DERIEL K, ABRAHAM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the KIT protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89**, 7350–7354.
- [48] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, GEWIRTZ AM. The c-kit protooncogene in normal and malignant hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1992, **10**, 205–214.
- [49] RATAJCZAK MZ, RATAJCZAK J, KREGENOW DA, KUCZYŃSKI WI, SKÓRSKI T, GEWIRTZ AM. Cytokine stimulation of CD34⁺ bone marrow cells prior to cryopreservation enhances their post-thawing proliferative potential. *Folia Histochem Cytobiol* 1994, **32**, 149–153.
- [50] RATAJCZAK MZ, RATAJCZAK J, KREGENOW DA, GEWIRTZ AM. Growth factor stimulation of cryopreserved CD34⁺ bone marrow cells intended for transplant: an *in vivo* study to determine optimal timing of exposure to early acting cytokines. *Stem Cells* 1994, **12**, 599–603.
- [51] RATAJCZAK MZ, SKORSKI T. Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej. *Post Biol Kom* 1994, **21**, 177–196.
- [52] RATAJCZAK MZ. Perspektywy wykorzystania osiągnięć biotechnologii, biologii molekularnej oraz inżynierii komórkowej we współczesnej hematologii (artykuł redakcyjny). *Pol Arch Med Wewn* 1994, **92**, 373–379.
- [53] RON D. Inducible growth arrest: new mechanistic insights. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**, 1985–1986.
- [54] ROSENFELD CS, GREMBA C, SHADDUCK RH, ZEIGLER ZR, NEUMANAITIS M. Engraftment with peripheral blood stem cells using noncontrolled-rate cryopreservation: comparison with autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 1994, **22**, 290–294.

- [55] RUOSIATHI E, REED J. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994, **77**, 477–478.
- [56] SATO N, SAWADA K, KOIZUMI K, TARUMI T, IEKO M, YASUKOUCHI T, YAMAGUCHI M, TAKAHASHI TA, SEKIGUCHI S, KOIKE T: *In vitro* expansion of human peripheral blood CD34⁺ cells. *Blood* 1993, **82**, 3600–3609.
- [57] SCIBLER KR, LI Y, OHLS RK, NYE NC, DURHAM MC, WHITE W, LIECHTY KW, LE T, CHRISTENSEN RD. Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood. *Blood* 1994, **84**, 3679–3684.
- [58] SHAPIRO F, TZY-JYUN Y, RAPTIS G, REICH L, NORTON L, MOORE MAS: Optimization of conditions for *ex vivo* expansion of CD34⁺ cells from patients with stage IV breast cancer. *Blood* 1994, **84**, 3567–3574.
- [59] SHULTZ LD, SCHWEITZER PA, RAJAN TV, YI T, IHLE JN, MATTHEWS J, THOMAS ML, BEIER DR. Mutations at the murine motheaten locus are within hematopoietic cell protein - tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 1993, **73**, 1445–1454.
- [60] SKÓRSKI T, KANAKARAJ P, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, RATAJCZAK MZ, SZCZYLIK C, ARLINGHAUS RB, GEWIRTZ AM, PERUSSIA B & CALABRETTA B. p210 GAP requirement in normal and malignant human hematopoiesis. *J Exp Med* 1993; **178**, 1923–1933.
- [61] SKÓRSKI T, KANAKARAJ P, KU DH, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, CANAANI E, PERUSSIA B, CALABRETTA B. Negative regulation of p210 GAP GTPase promoting activity by p210 bcr-abl: implication for RAS dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 1994 (w druku).
- [62] SMALL D, LEVENSTEIN M, KIM E, CAROW C, SHAHINA A, ROCKWELL P, WITTE L, BURROW C, RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM, CININ 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.
- [63] SOCIŃSKI MA, CANNISTRA SA, ELIAS A. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1988, **1**, 1194–1196.
- [64] SPANGRUDE GJ: Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Med* 1994, **45**, 93–104.
- [65] SUTHERLAND DR, STEWART AK, KEATING A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells* 1993, **11** (suppl 3), 50–57.
- [66] TAKAUE Y, ABE T, KAWANO Y, SUZUE T, SAITO S, HIRAO A, SATO J, MAKIMOTO A, KAWAHITO M, WATANABE T, SHIMOKAWA T, KURODA Y. Comparative analysis of engraftment after cryopreservation of peripheral blood stem cell autografts by controlled- versus uncontrolled-rate methods. *Bone Marrow Transplant* 1994, **13**, 801–804.
- [67] TO LB, HAYLOCK DN, DOWSE T, SIMMONS PJ, TRIMBOLI S, ASHMAN LK, JUTNER CA. A comparative study of the phenotype and proliferative capacity of peripheral blood (PB) CD34⁺ cells mobilized by four different protocols and those of steady-phase PB and bone marrow CD34⁺ cells. *Blood* 1994, **84**, 2930–2939.
- [68] VAZIRI H, DRAGOWSKA W, ALLSOPP RC, THOMAS TE, HARLEY CB, LANSDORP PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**, 9857–9860.
- [69] VERFAILLE CM. Can human hematopoietic stem cells be cultured *ex vivo*? *Stem Cells* 1994, **12**, 466–476.
- [70] VOSO MT, BURN TC, WULFG, LIMB, LEONE G, TENEN DG. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of transcription factor PU.1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**, 7932–7936.

- [71] WATARI K, LANSDORP PM, DRAGOWSKA W, MAYANI H, SCHRADER JW. Expression of interleukin-1 β gene in candidate human hematopoietic stem cells. *Blood* 1994, **84**, 36–40.
- [72] WILLIAMS DA. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem and progenitor cells -robbing Peter to pay Paul? *Blood* 1993, **81**, 3169–3172.
- [73] ZANJANI E, PAPAYANNOPOULOU T. Human CD34⁺ cells transplanted in utero in sheep fetuses treated with anti-human VLA4 remain “homeless” and persist in circulation. *Blood* 1994, **84** (suppl 1), 494a.
- [74] ZANJANI ED, FLAKE AW, RICE H, HEDRICK M, TAVASSOLI M. Long-term repopulating ability of xenogeneic transplanted human fetal liver stem cells in sheep. *J Clin Invest* 1994, **93**, 1051–1055.
- [75] ZHU XL, NOVAK FP, HEINRICH M, OPPENLANDER BK, DOOLEY DC. Autocrine inhibition by TGF- β 1 supresses FLT3 ligand (FLT3L) and stem cell factor (SCF) stimulated growth: evidence for TGF- β 1 gene expression in hematopoietic cells. *Blood* 1994, **84** suppl 1, 221a.

Otrzymano: 09.02.1995 r.

Przyjęto: 04.04.1995 r.

*Adres autora: Zakład Patologii Komórki PAM
Szczecin, ul. Powstańców Wielkopolskich 72*

TOPOIZOMERAZY DNA – ROLA BIOLOGICZNA I MOŻLIWOŚĆ WYKORZYSTANIA W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

DNA TOPOISOMERASES – ITS BIOLOGICAL ROLE
AND POTENTIAL USE IN ANTITUMOR THERAPY

Jolanta FERTAŁA

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Thomas Jefferson University,
Philadelphia, USA

Streszczenie: Topoizomerazy DNA są enzymami katalizującymi zmiany w strukturze przestrzennej DNA poprzez powstawanie pęknięcia, a następnie odtworzenie wiązania dwuustrowego w łańcuchu DNA. Enzymy te występują powszechnie i odgrywają ważną rolę w procesach replikacji, transkrypcji i rekombinacji DNA. We wszystkich reakcjach katalizowanych przez topoizomerazy DNA pęknięcie łańcucha DNA wiąże się z powstaniem przejściowego kompleksu enzym-DNA, w którym oba komponenty połączone są kowalencyjnie. W oparciu o liczbę przecinanych łańcuchów DNA wyróżnia się dwie grupy topoizomeraz: topoizomerazy typu I przecinające jeden łańcuch i topoizomerazy typu II przecinające dwa łańcuchy DNA. Przez wiele lat topoizomerazy DNA były przedmiotem badań biologów molekularnych. Od czasu, kiedy stwierdzono udział tych enzymów w mechanizmie działania niektórych leków przeciwnowotworowych, stały się one również obiektem zainteresowań farmakologów i klinicyстів. Poniższa praca omawia wyniki dotychczasowych badań nad topoizomerazami DNA i możliwościami ich wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej.

Summary: DNA topoisomerases are enzymes which alter the topology of the DNA through a mechanism involving the transient breakage and rejoining of a phosphodiester bond in the DNA backbone. These enzymes are ubiquitous, having been found in all organisms examined to date, and are important in cellular processes, including replication, transcription and recombination. In all DNA topoisomerases reactions, cleavage of the DNA is accompanied by the formation of a covalent enzyme-DNA intermediate. A DNA strand or duplex is then passed through the break, followed by the reformation of the original phosphodiester bond. Two classes of DNA topoisomerases are distinguished on the basis of how many DNA strands they transiently cleave; type I enzymes break one strand of a DNA duplex while type II enzymes cleave both DNA strands. For many years DNA topoisomerases attracted the attention of biochemists and molecular biologists due to the important roles they play in cellular processes

involving DNA. Since they were recognized as a cellular targets for anticancer drugs they are now viewed with increasing interest by pharmacologists and clinicians as well. This review focuses on the exciting studies of the DNA topoisomerases and the mechanism of antitumor-drug-induced cytotoxicity.

Badania nad topoiizomerazami zostały zainspirowane stwierdzeniem konieczności zmiany struktury przestrzennej DNA podczas replikacji. W 1969 r. wykazano, że ekstrakty komórkowe z *Escherichia coli* dodane do superhelikalnego DNA powodowały jego relaksację. Początkowo przypuszczano, że enzymami odpowiedzialnymi za relaksację superhelikalnego DNA są endonukleazy i ligazy DNA. Jednakże po izolacji i oczyszczeniu białka stwierdzono, że pojedynczy enzym jest w stanie przeprowadzić całą reakcję.

Początkowo enzym ten nazwano białkiem ω , a następnie bakteryjną topoiizomerazą DNA.

SUPERHELIKALNE DNA

Jedną z cech przestrzennej organizacji komórkowego DNA wynikającą z jego dwuniciowej struktury oraz charakteru przemian, jakim podlega, jest tworzenie form superhelikalnych. Występowanie tych struktur jest typowe dla stosunkowo niewielkich kolistych cząsteczek DNA wirusowego, bakteryjnego, mitochondrialnego oraz DNA występującego w chloroplastach. DNA zawarte w jądrach komórek eukariotycznych również zawiera odcinki o strukturze superhelikalnej.

Pojmowanie przestrzennej organizacji superheliksu DNA często jest intuicyjne, toteż wprowadzenie podstawowych pojęć opisujących jego strukturę ułatwi poznanie przemian, jakim podlega.

Na podstawie badań fizyko-chemicznych oraz przy udziale mikroskopii elektro-nowej stwierdzono występowanie form superhelikalnych o różnej geometrii [1, 40]. W celu scharakteryzowania parametrów określających organizację superheliksu, to jest stopnia oraz kierunku skrócenia, wprowadzono pojęcie liczby opleceń (ang. *linking number*) Lk_0 . Wielkość ta spełnia równanie: $Lk_0 = N/10,5$, gdzie N jest długością łańcucha DNA wyrażoną liczbą nukleotydów, podzieloną przez ilość nukleotydów przypadających na jeden skrót łańcucha DNA w warunkach standardowych.

W celu lepszego zrozumienia omawianych zależności należy prześledzić poniższy przykład. Jeżeli odcinek liniowego DNA zostanie połączony w zamknięty obwód, to liczba opleceń obu łańcuchów DNA względem siebie będzie odpowiadać liczbie opleceń obu łańcuchów w wyjściowej, liniowej formie. Jeżeli natomiast przed połączeniem końców liniowe DNA ulegnie skróceniu o dowolną liczbę pełnych obrotów, to liczba opleceń obu łańcuchów w powstałym superheliksie ulegnie zwiększeniu lub zmniejszeniu w zależności od tego, w którą stronę heliks DNA uległ skróceniu. Zmniejszoną liczbę opleceń nazywamy Lk . Jeżeli $\Delta Lk = Lk - Lk_0$ jest dodatnia,

superheliks jest prawoskrętny, jeżeli jest ujemna – lewoskrętny. Gdy $\Delta Lk = Lk_0$, DNA znajduje się w formie zrelaksowanej (ang. *relaxed DNA*).

TOPOIZOMERAZY DNA

Występowanie superhelikalnego DNA stwarza konieczność zmiany jego struktury w procesach replikacji, transkrypcji oraz rekombinacji. Enzymami katalizującymi zmiany struktury przestrzennej superhelikalnych form DNA są topoiizomerazy. Mechanizm działania tych enzymów polega na przecięciu jednego lub dwóch łańcuchów heliksu, przemieszczeniu przeciętych łańcuchów, a następnie odtworzeniu wiązań fosfodwuestrowych. Efektem działania topoiizomeraz jest powstawanie topoiizomerów DNA różniących się liczbą opleceń. W zależności od liczby przecinanych łańcuchów DNA wyróżniono dwie grupy topoiizomeraz: topoiizomerazy typu I przecinające jeden łańcuch DNA i topoiizomerazy typu II, przecinające dwa łańcuchy DNA [1, 20, 41].

Pierwszy enzym należący do grupy topoiizomeraz został odkryty w komórkach *Escherichia coli* przez J. Wanga w 1971 r. [44]. Od tego czasu scharakteryzowano wiele topoiizomeraz zarówno w organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Topoiizomerazy różnią się między sobą zarówno pod względem fizycznym (wielkość, ilość podjednostek), jak i biochemicznym (wymagana obecność ATP lub jonów dwudodatnich). Charakterystykę prokariotycznych i eukariotycznych topoiizomeraz przedstawiono w tabeli I.

Topoiizomeraza I występuje w komórkach proliferujących i znajdujących się w fazie stacjonarnej, jej zawartość jest jednakowa we wszystkich fazach cyklu komórkowego [14, 19]. Topoiizomerazy typu I w organizmach eukariotycznych są monomerami o masie molekularnej około 100 kD: ludzka – 100 kD, drożdżowa 90 kD, *Drosophila melanogaster* – 135 kD [41].

Ciąg reakcji katalizowanych przez topoiizomerazę I rozpoczyna przecięcie jednego łańcucha DNA. Przecięcie DNA katalizowane przez topoiizomerazę I jest wynikiem odwracalnej reakcji transestryfikacji, w której kowalencyjne wiązanie dwuestrowe w DNA jest przeniesione na tyrozynę (tzw. aktywna tyrozyna) [4, 24, 33], w wyniku czego powstaje tzw. kompleks przecinalny DNA-enzym (ang. *cleavable complex*) [23, 26, 36]. Przez miejsce przecięcia przechodzi komplementarna nić DNA, po czym dzięki wykorzystaniu energii wiązania dwuestrowego tyrozyny następuje połączenie końców przeciętego łańcucha DNA. W wyniku tego procesu powstaje nowa forma topologiczna superhelikalnego fragmentu DNA różniąca się liczbą opleceń o jeden w porównaniu z formą wyjściową. Mechanizm działania topoiizomerazy I przedstawiono na rysunku 1.

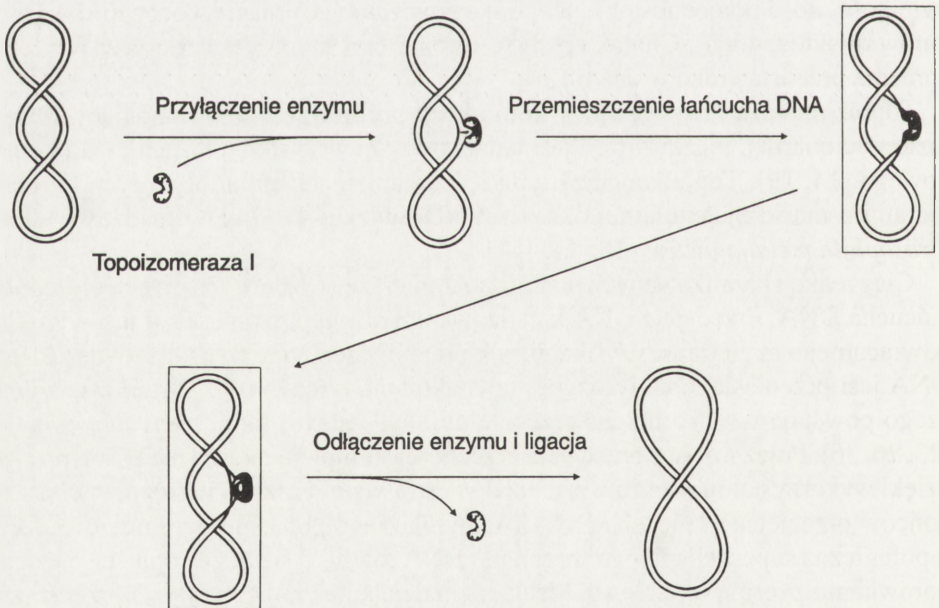
Eukariotyczna topoiizomeraza II składa się z dwóch jednakowych podjednostek, których masa molekularna w zależności od organizmu wynosi od 166 kD do 175 kD

TABELA I. Charakterystyka prokariotycznych i eukariotycznych topoiizomeraz DNA

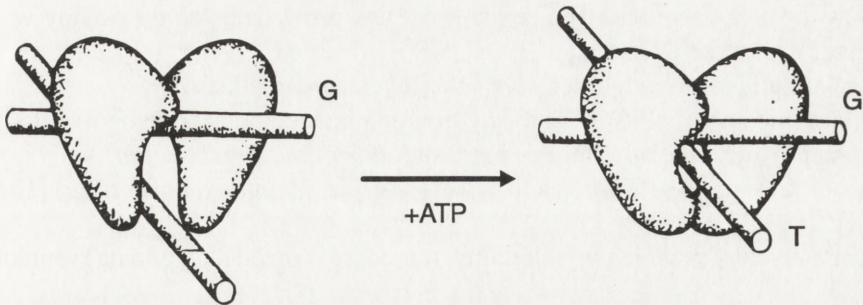
	Topoiizomeraza			
	Bakteryjna		Eukariotyczna	
	Typ I	Typ II	Typ I	Typ II
Relaksowanie superheliksów prawoskrętnych	- ^a	+	+	+
Relaksowanie superheliksów lewoskrętnych	+	- ^b	+	+
Tworzenie superheliksów negatywnych	-	+	-	-
Wymaganie ATP	-	+ ^c	-	+
Wymaganie jonów dwudodatnich (np. Mg)	+	+	- ^d	+
Koniec DNA łączący się z aktywną tyrozyną	5'-P	5'-P	3'-P	5'-P
Podjednostki ^e	M	A ₂ B ₂	M	D

^aBakteryjna topoiizomeraza I relaksuje pozytywnie skręcone DNA tylko w rejonach niesparowanych (np. w miejscu występowania heterodupleksów DNA); ^b- bakteryjna topoiizomeraza II (gyraza) relaksuje negatywnie skręcone DNA tylko w nieobecności ATP, ^c- negatywnie skręcone DNA może być relaksowane przy braku ATP, jednak proces przebiega znacznie wolniej; ^d- jony Mg²⁺ stymulują działanie eukariotycznej topoiizomerazy I; ^e- M- monomer; A, B - różne podjednostki, D - homodimer

[40]. W przeciwieństwie do topoiizomerazy I ilość topoiizomerazy II zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego i jest jej najwięcej w fazie S. Występuje w



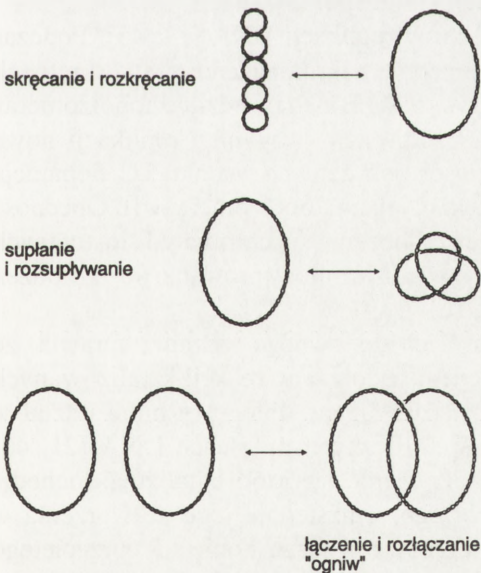
Rys. 1. Mechanizm działania topoiizomerazy I (wg Batesa i Maxwella [1])



Rys. 2. Mechanizm działania topoisomerazy II, model "klamry" zaproponowany przez Rocę i Wanga [35]

dużych ilościach w komórkach proliferujących, natomiast w komórkach stacjonarnych jest prawie niewykrywalna [13, 14, 19]. Topoisomeraza II katalizuje przecięcie obu nici DNA i łączy się kowalencyjnie z końcami 5' komplementarnych nici tworząc przejściowy kompleks przecinalny. Przy udziale ATP przez powstałe przecięcie DNA przemieszcza się drugi dwuniciowy łańcuch DNA, po czym następuje odtworzenie wiązań fosfodwuestrowych, co jak w przypadku topoisomerazy I zachodzi kosztem wiązań DNA-enzym. W wyniku tego procesu powstaje topoisomer DNA o zmienionej o 2 liczbie opleceń. Działanie topoisomerazy II starają się wyjaśnić Roca i Wang

[34, 35] wnioskując na podstawie danych z mikroskopu elektronowego, że dwie podjednostki enzymu tworzą strukturę podobną do klamry (ang. *protein clamp*). Model ten (rys. 2) zakłada, że dwie podjednostki enzymu przyłączają się do dwuniciowego heliksu G i przecinają go. Cały kompleks przecinalny DNA-enzym tworzy rodzaj otwartej klamry, do której dostaje się drugi dwuniciowy heliks T. Przyłączenie się ATP do enzymu powoduje, że klamra zamyka się i w jej wnętrzu następuje przemieszczenie heliksu T przez miejsce pęknięcia w heliksie G. Model ten w dużym stopniu wyjaśnia mechanizm działania topoisomerazy II, jednak nie wiadomo, w jaki sposób enzym wykorzystuje ATP do transportu jednego łańcucha DNA przez pęknięcie drugiego [35]. Topoisomeraza II poprzez swój mechanizm przecinania obu nici DNA



Rys. 3. Zmiany w strukturze przestrzennej DNA katalizowane przez topoisomerazę II (wg Maxwella i Gellerta [28])

umożliwia zachodzenie następujących procesów prowadzących do zmiany w przestrzennej strukturze DNA:

- relaksację prawoskrętnych i lewoskrętnych superheliksów,
- łączenie superheliksów w formy przypominające połączone ogniwa łańcucha oraz przeprowadzanie odwrotnego procesu (*catenation, decatenation*),
- powstawanie węzłów oraz ich “rozsupływanie” (*knotting, unknotting*) [1, 20, 28, 40, 41].

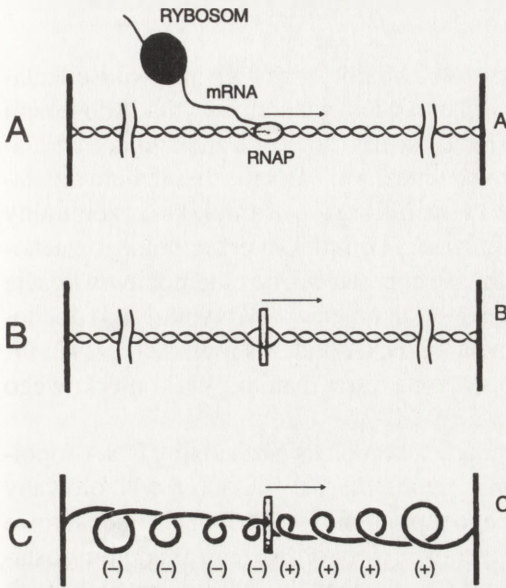
Schematyczny przebieg wymienionych procesów przedstawiono na rysunku 3.

UDZIAŁ TOPOIZOMERAZ W PROCESACH TRANSKRYPCJI, REPLIKACJI I REKOMBINACJI

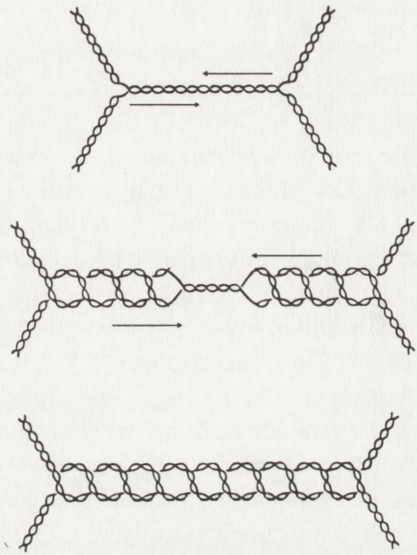
Wang uważa, że topoizomerazy są jedynymi czynnikami mającymi zdolność relaksowania superhelikalnego DNA w komórkach podczas procesów transkrypcji, replikacji i rekombinacji [42]. Podczas transkrypcji, w czasie przesuwania się kompleksu transkrypcyjnego wzdłuż heliksu DNA powstają dwie superhelikalne domeny: prawoskrętna przed i lewoskrętna za przesuwającą się polimerazą RNA (rys. 4). Uważa się, że topoizomeraza I powoduje usuwanie powstających w tym procesie skrótów DNA [42]. Zaobserwowano wzmożone przyłączanie się tego enzymu do DNA w obrębie genów podczas ich transkrypcji. Ostatnie doniesienia [29] wskazują również na rolę topoizomerazy I w aktywacji i represji transkrypcji.

Topoizomerazy I i II biorą również udział w replikacji DNA [11, 45]. Podczas przesuwania się widełek replikacyjnych następuje nagromadzenie prawoskrętnych opleceń łańcuchów matrycowego DNA (rys. 5 A, B). Przy udziale topoizomeraz nagromadzone skróty DNA są relaksowane. Powstałe w wyniku replikacji nowe heliksy DNA skrócone są wokół siebie w sposób pokazany na rysunku 5 C. Separacja powstałych heliksów DNA odbywa się dzięki działaniu topoizomerazy II. Obecność tego enzymu jest także niezbędna podczas rozchodzenia się chromatyd siostrzanych w mitozie. Brak aktywności topoizomerazy II w czasie mitozy prowadzi do uszkodzeń chromosomów i śmierci komórki [5, 6, 15, 16].

Przecinanie łańcuchów DNA i zdolność ich ponownego łączenia sprawia, że działanie topoizomeraz jest pod tym względem podobne do reakcji katalizowanych przez integrazy – enzymy charakterystyczne dla faga λ . Integrazy biorą udział w procesach rekombinacji zachodzących w specyficznych miejscach DNA [21, 43] Sposób działania topoizomeraz różni się tym, że w procesie, który katalizują, dochodzi do rozszczepienia wiązania fosfodwuestrowego, a następnie jego odtworzenia w obrębie tego samego łańcucha DNA. Integrazy zaś łączą koniec 3' przeciętego łańcucha z końcem 5' innego przeciętego łańcucha DNA. W związku z tym rekombinazy te zostały zaklasyfikowane do grupy transferaz łańcuchów DNA. W pewnych warunkach transferazy te mogą działać podobnie do topoizomeraz i *vice versa* [43].



Rys. 4. Powstawanie dwóch domen superhelikalnych podczas transkrypcji odcinka DNA "zakotwiczonego" w dwóch miejscach w jądrowym matrix (wg Wanga [42]): (A) przesuwająca się wzdłuż DNA polimeraza RNA (RNAP) nie może obracać się wokół osi heliksu, ponieważ tworzy zbyt duży kompleks z mRNA; podczas transkrypcji heliks DNA obraca się wokół własnej osi (B), w wyniku czego dochodzi do powstania prawoskrętnego superheliksu przed i lewoskrętnego superheliksu za przesuwającą się RNAP (C), powstające podczas tego procesu naprężenia DNA usuwane są w wyniku działania topoiizomerazy I



Rys. 5. Schemat powstawania struktur superhelikalnych podczas replikacji DNA (wg Wanga [42]), podczas replikacji powstają prawoskrętne superheliksy w macierzystym łańcuchu DNA (A), podczas gdy nowo powstałe heliksy formują lewoskrętne formy superhelikalne oplatające się wokół siebie (B), w końcowym etapie replikacji powstaje kompleks złożony z dwóch oplecionych wokół siebie heliksów (C), topoiizomerazy I i II uczestniczą w usuwaniu naprężeń powstających w łańcuchu macierzystym, topoiizomeraza II bierze udział w rozplątaniu nowo powstałych heliksów DNA

Panuje pogląd, że udział topoiizomeraz w procesach rekombinacji polega głównie na działaniu ich jako transferaz łańcuchów DNA. Wykazano również udział eukariotycznej topoiizomerazy II oraz bakteryjnych topoiizomeraz (gyraz) w procesach rekombinacji, zachodzących pomiędzy niehomologicznymi i niespecyficznymi odcinkami DNA. Zaobserwowano, że współdziałanie topoiizomerazy I i II wpływa hamująco na procesy rekombinacji w komórkach drożdży. Powyższe obserwacje skłaniają do wniosku, że topoiizomerazy uczestniczą w zachodzeniu rekombinacji, z drugiej jednak strony mogą hamować ten proces, przyczyniają się do stabilizacji genomu [8, 43].

TOPOIZOMERAZY JAKO CELE DZIAŁANIA LEKÓW

Zakres badań nad topoiomerazami, początkowo dotyczący ich aktywności katalitycznej, od kilku lat skupia się na wykorzystaniu wiedzy o tych enzymach do terapii antynowotworowej. Poznane do tej pory środki farmakologiczne zaburzające działanie topoiomeraz różnią się pod względem chemicznym, jak i mechanizmem działania. Do pierwszej grupy należą związki stabilizujące kompleks przecinalny DNA-topoiomeraza. Stwierdzono, że stabilizacja kompleksu przecinalnego zachodzi poprzez przyłączanie leku do DNA w miejscu przecięcia, co uniemożliwia ligację łańcucha DNA w końcowym etapie działania topoiomerazy. W wyniku tego dochodzi do zahamowania syntezy RNA i fragmentacji DNA podczas replikacji [7, 12, 17, 18, 22, 47]. Uszkodzenie DNA może być przyczyną zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G 2 lub być sygnałem do apoptozy [7, 9, 10].

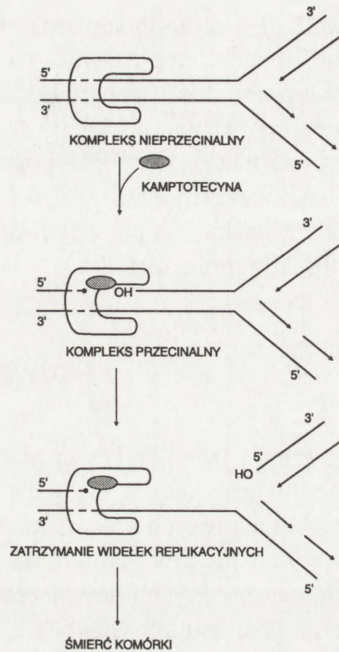
Pierwszym poznany związek blokujący kompleks przecinalny DNA-topoiomeraza I (rys. 6) była kamptotecyna (ang. *camptothecin*) – alkaloid wyizolowany z *Camptotheca accuminata*, drzewa rosnącego w południowych Chinach. Początkowe próby kliniczne wykazały silne działanie przeciwnowotworowe tego alkaloidu, zostały jednak zaniechane po stwierdzeniu skutków ubocznych. Obecnie w badaniach klinicznych znajdują się pochodne kamptotecyny o zmniejszonym działaniu ubocznym np. topotekan (10-hydroksy-9-dimetyloaminometylo-kamptotecyna), 9-amino-kamptotecyna oraz CPT-11 (7-etylo-10-(4-[1-piperidyno]-1-piperidyno) karbonyloksy-kamptotecyna) [7, 23, 31, 37, 46]. Podobny do działania kamptotecyny mechanizm, wykazują leki stabilizujące kompleks przecinalny DNA-topoiomeraza II. Należą do nich szeroko stosowane w terapii przeciwnowotworowej epipodofylotoksyny: VP-16 (etylideno- β -D-glukopiranozylo-4'-demetyloepipodofylotoksyna) i VM-26 (tienylideno- β -D-glukopiranozylo-4'-demetyloepipodofylotoksyna) [3, 26, 32, 38].

Drugą grupę czynników przeciwnowotworowych mogących wpływać na działanie topoiomeraz tworzą interkalatory DNA [2, 7, 25, 27]. Należą do nich między innymi anilinoakrydyny oraz antracykliny. Związki te specyficznie wbudowują się pomiędzy łańcuchy heliksu DNA. Nie stwierdzono jednoznacznie zależności pomiędzy siłą wiązania z DNA czy inhibicją jego syntezy a cytotoksycznością lub działaniem przeciwnowotworowym interkalatorów. Nie wszystkie interkalatory wykazują działanie przeciwnowotworowe. Izomery pochodnych akrydyny: *o*-AMSA (4'-(9-akrydynyloamino)metanosulfono-*o*-anizydyd) i *m*-AMSA jednakowo wbudowują się pomiędzy łańcuchy DNA, jednak tylko *m*-AMSA wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Na tej podstawie zakłada się istnienie mediatora w oddziaływaniu interkalatorów z DNA, którym może być receptor jądrowy [26]. Łączenie się interkalatorów z chromosomalnym DNA często prowadzi do jego fragmentacji. Pęknięcia DNA powstałe pod wpływem interkalatorów mogą być miejscem wiązania białek.

Podobieństwo pomiędzy fragmentacją DNA w obecności *m*-AMSA a pęknięciami powstałymi przy udziale topoiizomerazy II zwróciło uwagę na możliwość oddziaływania interkalatorów na ten enzym [26]. Wykazano, że *m*-AMSA aktywuje przecinanie DNA przy udziale topoiizomerazy II. Aktywacji topoiizomerazy II nie stwierdzono stosując *o*-AMSA. Jednym z proponowanych mechanizmów antynowotworowego działania interkalatorów jest uniemożliwianie procesu ligacji przeciętych przez topoiizomerazę łańcuchów DNA, prawdopodobnie poprzez stabilizację kompleksu przecinalnego. Wysokie stężenia interkalatorów hamują proces przecinania DNA przy udziale topoiizomerazy II [26]. Hamowanie to jest prawdopodobnie wynikiem blokowania DNA przez te związki. Blokowanie DNA wpływa również hamująco na aktywność topoiizomerazy związanej z przemieszczaniem przeciętego w procesie relaksacji łańcucha DNA [26].

Trzecią grupą leków wpływających na działanie topoiizomeraz są związki przyłączające się do bruzdy mniejszej DNA (ang. *minor-groove binding agents* – MGBA). Pierwsze badania nad wpływem MGBA na aktywność topoiizomeraz przeprowadzono przy użyciu distamycyny. Przy niskich stężeniach tego związku (< 5,0 μM) obserwowano wzrost aktywności topoiizomeraz. Powyżej 10 μM aktywność obu enzymów była zredukowana o 90% [2]. Analogiczną zależność wykazano stosując Hoechst 33258 (barwnik *bis*-benzimidowy) i DAPI (4, 6-diamidyno-2-fenylendioindol). Prawdopodobnie aktywacja topoiizomeraz przy niskich stężeniach MGBA jest wynikiem zmian w strukturze DNA, powodujących odstawianie miejsc przyłączenia enzymu. Wyższe stężenia MGBA powodują blokowanie rejonów przyłączenia topoiizomeraz, co prowadzi do hamowania aktywności tych enzymów [2, 30].

MGBA wpływają także na działanie związków powodujących stabilizację kompleksu przecinalnego DNA-topoiizomeraza. W badaniach z zastosowaniem VM-26, *m*-AMSA-działających poprzez topoiizomerazę II oraz kamptotecyny, której działanie



Rys. 6. Mechanizm uszkodzenia DNA przy udziale kamptotecyny w procesie replikacji (wg Liu [25]); kamptotecyna łączy się z łańcuchem DNA przeciętym przez topoiizomerazę I uniemożliwiając jego ligację, przesuwające się widelki replikacyjne dochodzą do miejsca przecięcia matrycowego łańcucha i replikacja zostaje przerwana, powstający nowy heliks ulega oderwaniu

skierowane jest na topoizomerazę I, stwierdzono, że MGBA ograniczają zdolność działania wymienionych związków jako stabilizatorów kompleksu przecinalnego oraz zmniejszają ilość pęknięć DNA [2]. Zmniejszanie stabilizacji kompleksu przecinalnego jest zależne od wielkości fragmentu DNA, z którym łączą się MGBA. Distamycyna łącząca się z DNA poprzez 5 par zasad wykazuje większy efekt działania w porównaniu z Hoechst 33258 (4 pary zasad) czy DAPI (3 pary zasad) [39]. Zależność ta wskazuje na specyficzne oddziaływania wymienionych związków w obrębie bruzdy mniejszej.

UWAGI KOŃCOWE

Przez szereg lat organizacja oraz przemiany struktury przestrzennej DNA były przedmiotem fascynacji wielu badaczy. Od czasu odkrycia topoizomeraz – enzymów biorących udział w tych przemianach, rośnie zainteresowanie wykorzystaniem ich w oddziaływaniu na procesy replikacji, transkrypcji i rekombinacji zachodzące w komórkach normalnych i nowotworowych. Do tej pory wyizolowano wiele topoizomeraz oraz poznano ich sekwencje. Jednakże mechanizm ich działania oraz sposób oddziaływania z lekami przeciwnowotworowymi nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Obecne badania nad topoizomerazami skupiają się na próbach krystalizacji i analizie mutantów w celu zdefiniowania domen tych enzymów bezpośrednio biorących udział w katalizowanych przemianach.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BATES AD, MAXWELL A. DNA topology. IRL Press at Oxford Press, 1993.
- [2] BEERMAN TA, WOYNAROWSKI JM, McHUGH MM. Modulation of topoisomerase-targeted drugs by DNA minor-groove binding agents. (w) DNA topoisomerase in cancer, Oxford University Press, 1991; 172–181.
- [3] BJORNSTI MA. DNA topoisomerases. *Current Opinion in Structural Biology* 1991; **1**: 99–103.
- [4] CHAMPOUX JJ. Mechanistic aspects of type-I topoisomerases. (w) DNA topology and its biological effects, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 217–242.
- [5] CHARRON M, HANCOCK R. Chromosome recombination and defective genome segregation induced in Chinese hamster cells by the topoisomerase II inhibitor VM-26. *Chromosoma* 1991; **100**: 97–102.
- [6] CHARRON M, HANCOCK R. DNA topoisomerase II is required for formation of mitotic chromosomes in Chinese hamster ovary cells: studies using the inhibitor 4'-demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-o-thenylidene-*b*-D-glucopyranoside). *Biochemistry* 1990; **29**: 9531–9537.
- [7] CHEN AY, LIU LF. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1994; **34**: 191–218.

- [8] CHRISTMAN MF, DIETRICH FS, FINK GR. Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerases I and II. *Cell* 1988; **5**: 413–425.
- [9] CUMMINGS J, SMYTH JF. DNA topoisomerase I and II as targets for rational design of new anticancer drugs. *Ann Oncol* 1993; **4**: 533–543.
- [10] DEL BINO G, SKIERSKI JS, DARZYNKIEWICZ Z. Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-14) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Res* 1990; **50**: 5746–5750.
- [11] DiNARDO sk, VOELKEL K, STERNGLANZ R. DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 2616–2620.
- [12] DRLICA K, FRANCO RJ. Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry* 1988; **27**: 225–2259.
- [13] HECK MM, EARNSHAW WC. Topoisomerase II: a specific marker for cell proliferation. *J Cell Biol* 1987; **103**: 2569–2581.
- [14] HECK MM, HITTELMAN WN, ERNSHAW WC. Differential expression of DNA topoisomerase I and II during the eukariotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1086–1090.
- [15] HOLM C, GOTO T, WANG JC, BOTSTEIN D. DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* 1985; **41**: 553–563.
- [16] HOLM C, STEARNS T, BOTSTEIN D. DNA topoisomerase II must act at mitosis to prevent nondisjunction and chromosome breakage. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 159–168.
- [17] HSIANG YH, HERTZBERG R, HECHT S, LIU LF. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 1985; **260**: 14873–14878.
- [18] HSIANG YH, LIHOU MG, LIU LF. Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 1989; **49**: 5077–5082.
- [19] HSIANG YH, WU HY, LIU LF. Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Res* 1988; **48**: 3230–3235.
- [20] HSIEH T. Mechanistic aspects of type-II DNA topoisomerases. (w) DNA topology and its biological effects, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 243–260.
- [21] IKEDA H. DNA topoisomerase-mediated illegitimate recombination. (w) DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 341–359.
- [22] JAXEL C, CAPRANICO G, KERRIGAN D, KOHN KW, POMMIER Y. Effect of local DNA sequence on topoisomerase I cleavage in the presence or absence of camptothecin. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20418–20423.
- [23] KANZAWA F, SUGIMOTO Y, MINATO K, KASAHARA K, BUNGO M, NAKAGAWA K, FUJIWARA Y, LIU LF, SAIO N. Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: characterization and mechanism of resistance. *Cancer Res* 1990; **50**: 5919–5924.
- [24] KNABB AM, FERTALA J, BJORNSTI MA. Mechanism of camptothecin resistance in yeast DNA topoisomerase I mutants. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22322–22330.
- [25] LIU LF. Anticancer drugs that convert DNA topoisomerases into DNA damaging agents. (w) DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 371–389.
- [26] LIU LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann Rev Biochem* 1989; **38**: 351–375.
- [27] MACDONALD TL, LEHNERT EK, LOPER JT, CHOW KC, ROSS WE. On the mechanism of interaction of DNA topoisomerase II with chemotherapeutic agents. (w) DNA topoisomerase in cancer. Oxford University Press, 1991; 199–214.
- [28] MAXWELL A, GELLERT M. Mechanistic aspects of DNA topoisomerases. *Adv Prot Chem* 1986; **38**: 69–107.
- [29] MERINO A, MADDEN KR, LANE WS, CHAMPOUX JJ, REINBERG D. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* 1993; **365**: 227–232.

- [30] MORTENSEN UH, STEVNSNER T, KROGH S, OLESEN K, WESTERGAARD O, BON-
VEN BJ. Distamycin inhibition of topoisomerase I-DNA interaction: a mechanistic analysis.
Nucl Acids Res 1990; **18**: 1983–1989.
- [31] POMMIER Y. DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspectives.
Cancer Chemother Pharmacol 1993; **32**: 103–108.
- [32] POTMESIL M, SILBER R. DNA topoisomerases in clinical oncology. (w) DNA topology
and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; 391–407.
- [33] RICHARD M, BJORNSTIMA, CARON PR, WANG JC. Peptide sequencing and site-directed
mutagenesis identify tyrosine-727 as the active site tyrosine of *Saccharomyces cerevisiae* DNA
topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3559–3563.
- [34] ROCA J, WANG JC. DNA transport by a type II DNA topoisomerase: evidence in favour of
a two-gate mechanism. *Cell* 1994; **77**: 609–616.
- [35] ROCA J, WANG JC. The capture of DNA double helix by an ATP dependent protein clamp:
a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* 1992; **71**: 833–840.
- [36] SCHUMAN S. Site-specific DNA cleavage by *Vaccinia* virus DNA topoisomerase I. *J Biol
Chem* 1991; **266**: 1796–1803.
- [37] SUPKO JG, MALSPEIS L. Pharmacokinetics of the 9-amino and 10, 11- methylenodioksy
derivatives of camptothecin in mice. *Cancer Res* 1993; **53**: 3062–3069.
- [38] SZMIGIERO L. Topoizomeraza II jako komórkowy receptor niektórych leków przeciwno-
wotworowych. *Post Biochem* 1988; **34**: 147–152.
- [39] TENG MK, USMAN N, FREDERICK OA, WANG AHJ. The molecular structure of the
complexes of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGGAATTCGCG). *Nucleic Acids
Res* 1988; **16**: 2671–2690.
- [40] VOSBERG HP. DNA topoisomerases: Enzymes that control DNA conformation. *Current
Topics in Microbiology and Immunology* 1985; **114**: 19–100.
- [41] WANG JC. DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem* 1985; **54**: 667–697.
- [42] WANG JC. DNA topoisomerases: why so many? *J Biol Chem* 1991; **266**: 6659–6662.
- [43] WANG JC, CARON PR, KIM RA. The role of DNA topoisomerases in recombination and
genome stability: a double edged sword? *Cell* 1990; **62**: 403–406.
- [44] WANG JC. Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein ω . *J Mol Biol* 1971; **55**:
523–533.
- [45] WANG JC, LIU LF. DNA replication: topological aspects and the roles of DNA topoisome-
rases. (w) DNA topology and its biological effects. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990;
321–340.
- [46] WANI MC, NICHOLAS AW, WALL ME. Plant antitumor agents. 23. Synthesis and
antileukemic activity of camptothecin analogues. *J Med Chem* 1986; **29**: 2358–2363.
- [47] ZHANG H, DARPA P, LIU LF. A model for tumor cell killing by topoisomerase poison.
Cancer Cells 1990; **2**: 23–27.

Otrzymano: 25.01.1995 r.

Przyjęto: 04.05. 1995 r.

Adres autorki: Thomas Jefferson University, BLSB room 231, 233 South 10TH Street,
Philadelphia, PA 19107 USA

FIZJOLOGICZNA ROLA APOPTOZY

APOPTOSIS AND ITS PHYSIOLOGICAL ROLE

Ewa RADZISZEWSKA

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
w Warszawie

Streszczenie: Apoptoza jest procesem genetycznie kontrolowanym, charakteryzującym się szeregiem biochemicznych i morfologicznych zmian. W pracy w szczególności skupiono się na fizjologicznej roli apoptozy. Apoptozę obserwuje się w organizmie na wielu etapach jego rozwoju – delecja klonalna tymocytów w grasicy, śmierć neuronów w trakcie rozwoju mózgu, atrofia etc. Uważa się, że śmierć komórek przez apoptozę jest powszechnym, prostym i efektywnym sposobem pozbycia się przez organizm komórek, które na pewnych etapach rozwoju stały się niepotrzebne bądź też są wręcz niebezpieczne.

Słowa kluczowe: apoptoza, programowana śmierć komórki, *bcl-2*, *p53*, endonukleazy.

Summary: Apoptosis is genetically controlled process, with characteristic biochemical and morphological changes. In this review we focused on physiological aspect of apoptosis. This phenomenon is observed on the different stages of development such as clonal deletion of thymocytes, neuron death during brain development, atrophy etc. It is believed that cell death is common, simply and effective way to remove unnecessary and dangerous cells.

Key words: apoptosis, programmed cell death, *bcl-2*, *p53*, endonucleases.

I. WPROWADZENIE

Śmierć komórek jest naturalnym procesem fizjologicznym, podobnie jak proliferacja czy różnicowanie, zachodzącym w każdym żywym organizmie. Jednakże jeszcze do niedawna śmierci komórek badacze poświęcali znacznie mniej uwagi niż innym zjawiskom fizjologicznym [44]. Na początku lat dziewięćdziesiątych okazało

się, że śmierć komórki jest procesem daleko bardziej skomplikowanym niż można było oczekiwać. Zaczęto wyróżniać śmierć komórki (nekroza, programowana śmierć komórki, apoptoza) w zależności od morfologicznych i biochemicznych zjawisk jej towarzyszących [38, 44, 50].

II. NEKROZA

Nekroza (łac. martwica) przez długi czas uważana była za jedyny sposób umierania komórek. Śmierć przez nekrozę następuje prawdopodobnie z powodu utraty równowagi osmotycznej komórki [71]. Komórka nekrotyczna zwiększa swoją objętość na skutek biernego transportu jonów (przede wszystkim wapnia) do jej wnętrza, co pociąga za sobą zwiększony napływ wody. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia wpływa hamująco na syntezę ATP i zwiększa aktywność enzymów proteolitycznych. Chromatyna tworzy agregaty rozproszone na terenie całego jądra, które podobnie jak organella komórkowe ulegają zniszczeniu po rozerwaniu błony jądrowej i komórkowej. Zawartość komórki wypływa na zewnątrz wywołując reakcję zapalną. W trakcie procesu nekrozy nie zaobserwowano syntezy *de novo* mRNA i białek.

III. PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKI I APOPTOZA

Termin apoptoza pochodzi z języka greckiego i oznacza opadanie płatków z kwiatów lub liści z drzew. Do współczesnej biologii termin ten wprowadził Kerr na początku lat siedemdziesiątych, w celu scharakteryzowania pewnych zjawisk morfologicznych i biochemicznych, towarzyszących procesowi znanej wcześniej programowanej śmierci komórki (PCD)[26, 71, 96]. Użycie tych dwóch terminów: PCD i apoptozy jako synonimów było dość niefortunne i wywołało dużo zamieszania wśród badaczy. Wielu z nich zaczęło używać tych terminów zamiennie.

Pierwotnie, termin: programowana śmierć komórki stosowano przy opisywaniu śmierci komórek zachodzącej w trakcie procesów rozwojowych (embriogeneza, morfogeneza) i wywołanej przez bodźce fizjologiczne będące częścią normalnego rozwoju [13, 71]. Wtórnie zaś wielu badaczy, zwłaszcza immunologów, zaczęło używać terminu PCD do opisu śmierci komórkowej, w której trakcie dochodziło do uruchomienia programu genetycznego, czyli ekspresji pewnych genów, niezależnie od natury bodźca wywołującego śmierć [71].

Ostatnio większość badaczy zaczęła stosować termin: apoptoza wyłącznie w celu opisania szeregu zmian morfologicznych i biochemicznych zachodzących w umierającej komórce. Często zjawisko apoptozy obserwujemy w trakcie programowanej

śmierci komórek występującej podczas rozwoju organizmu. Nie można jednak powiedzieć, że w przypadku każdej PCD mamy do czynienia z apoptozą. Na przykład, utratę mięśni między segmentami podczas metamorfozy owada *Manduca sexta* można opisać jako programowaną śmierć komórki, zachodzącą bez zauważalnych zmian charakteryzujących apoptozę [71]. Śmierć komórki wywołana przez wiele leków cytotoksycznych charakteryzuje się zmianami właściwymi dla apoptozy, ale jest oczywiste, że nie jest to śmierć programowana [39, 77]. Z tych właśnie powodów nie należałoby tych terminów traktować jako synonimów. Sądzi się, że najwłaściwsze jest używanie terminu PCD do opisu zjawiska śmierci komórek zachodzącej wyłącznie w czasie procesów rozwojowych. Natomiast termin apoptoza należałoby zarezerwować do opisu zmian morfologicznych i biochemicznych, a także genetycznych, zachodzących w umierającej komórce pod wpływem bardzo różnorodnych czynników endo- i egzogennych.

IV. APOPTOZA

Apoptozie towarzyszą takie zmiany, jak: obkurczenie komórki na skutek utraty wody oraz kondensacja chromatyny z jednoczesnym jej przemieszczeniem pod błonę jądrową. Pory jądrowe widoczne są w miejscach, w których nadal istnieje euchromatyna [91, 95]. W komórce apoptotycznej DNA jest cięte przez endonukleazy na fragmenty o wielkości ok. 200 par zasad. Występuje także reorganizacja cytoszkieletu oraz utrata struktur mikrotubularnych [19, 52]. Należy jednak podkreślić, że samo zniszczenie sieci mikrotubularnej prawdopodobnie nie jest konieczne do rozpoczęcia apoptozy. Komórki, którym podano cytochalazynę B hamującą polimeryzację aktyny, nie tworzyły ciałek apoptotycznych (patrz poniżej), ale proces apoptozy nie był w nich zahamowany [66].

Wraz ze zmianami cytoszkieletu, obserwuje się zmiany w cytoplazmie; następuje jej kondensacja, a błona komórkowa tworzy uwypuklenia, w których zamykane są nienaruszone organella komórkowe, powstają tzw. ciała apoptotyczne. Ciała te odłączają się od komórki, a następnie są fagocytowane przez otaczające komórki [70, 95].

Zmiany, jakie zachodzą w błonach komórkowych w trakcie apoptozy, są bardzo istotne, ponieważ pozwalają komórkom fagocytującym na natychmiastowe rozpoznanie komórki umierającej bądź ciałek apoptotycznych. Zapobiega to powstaniu reakcji zapalnej [70].

a. MECHANIZMY USUWANIA KOMÓREK APOPTOTYCZNYCH

Z nielicznych prac dotyczących mechanizmów usuwania komórek apoptotycznych wiadomo, że zmiany w błonie komórkowej komórek apoptotycznych mogą dotyczyć:

1) utraty terminalnych kwasów sialowych z glikoprotein umieszczonych na powierzchni błony

W tym przypadku zostają odsłonięte np. łańcuchy N-acetyloglukozoaminy czy też N-acetylogalaktozoaminy i galaktozy, które mogą reagować z receptorem lektynowym znajdującym się na powierzchni makrofagów usuwających komórki apoptotyczne [70].

2) tworzenia się tzw. mostów molekularnych pomiędzy komórką apoptotyczną a fagocyтуjącą

Mosty te powstają na skutek wiązania receptora trombospondynowego znajdującego się na powierzchni komórki apoptotycznej a trombospondyną związaną z receptorem vitronektynowym $\alpha 3 \beta 1$ (białko z rodziny integryn), połączonym z cząsteczką CD36 i znajdującą się na komórce fagocyтуjącej. Trombospondyna jest trimerem zawierającym specyficzną sekwencję odpowiadającą za adhezję komórek (Arg-Gly-Asp) i wydzielana jest przez wiele typów komórek [70].

3) utraty asymetrii fosfolipidowej, w wyniku której następuje ekspozycja fosfatydyloseryny na powierzchni komórki apoptotycznej

Z fosfatydyloseryną wyeksponowaną na powierzchni komórki apoptotycznej łączy się receptor makrofagów, dając sygnał do fagocytozy [70].

Ten ostatni sposób sygnalizacji przez komórkę podatności na fagocytozę wydaje się (moim zdaniem) najbardziej przekonujący, ze względu na swoją uniwersalność. Wykazano to w doświadczeniu, w którym dodanie liposomów z fosfatydyloseryną do pożywki, w której hodowano komórki stymulowane do apoptozy, zapobiegało fagocytozie tych komórek [70]. Jednakże ostateczny wybór jednego z tych mechanizmów usuwania komórek apoptotycznych może zależeć od rodzaju komórki fagocyтуjącej, makrofag czy też komórka sąsiadująca z komórką apoptotyczną [70].

b. SYNTEZA BIAŁEK I RNA

Ponieważ apoptoza jest procesem aktywnym, wymagającym realizacji pewnego programu genetycznego, nie dziwi fakt, że w trakcie apoptozy dochodzi do syntezy RNA i białek *de novo* [52, 53]. Nie można jednak ignorować szeregu doniesień, w których wykazano, że synteza białek i RNA nie zachodziła podczas apoptozy. Wydaje się, że zależy to przede wszystkim od typu komórki oraz bodźca wywołującego apoptozę. Na przykład, w tymocytach traktowanych deksametazonem (syntetyczny glukokortykoid) występuje synteza białek *de novo* [51], natomiast nie zachodzi w splenocytach poddanych szokowi termicznemu (4°C) [51].

c. TRANSGLUTAMINAZY

Enzymami, których wzmożoną aktywność obserwuje się w procesie apoptozy, są transglutaminazy komórkowe. Enzymy te odpowiedzialne są za syntezę sieci białkowej, która może służyć do ograniczania "wyciekania" macierzy komórkowej podczas

późniejszych etapów apoptozy i mieć udział w procesie tworzenia się ciałek apoptotycznych [49, 67]. Chociaż aktywacji transglutaminaz nie obserwuje się we wszystkich komórkach indukowanych do apoptozy, to jednak proces ten jest na tyle częsty, że można traktować go jako jedną z cech charakterystycznych apoptozy.

d. ENDONUKLEAZY

Podczas apoptozy występuje fragmentacja DNA na nukleosomy (180–200 par zasad), co można uwidocznić w żelu agarozowym w postaci “drabinki”, tworzącej się z migrujących w polu elektrycznym fragmentów DNA. Jest to jedna z powszechniej stosowanych metod do wykrywania apoptozy. Jednakże fragmentacja DNA występuje nie we wszystkich komórkach umierających apoptotycznie. Przebieg fragmentacji DNA można podzielić na dwa etapy. Początkowo DNA cięte jest na fragmenty o długości 300–50 tysięcy par zasad, które można wykryć tylko przy zastosowaniu elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym. Ta degradacja jest już wystarczająca do zniszczenia struktury jądra i śmierci komórki. Prawdopodobnie za proces ten odpowiedzialna jest też topoizomeraza II. Dopiero w drugim etapie DNA zostaje pocięte na nukleosomy [25, 42, 65, 66].

Fragmentację DNA katalizują endonukleazy, enzymy prowadzące do rozerwania wiązań między nukleosomami. Do tej pory nikomu nie udało się oczyścić i wyizolować specyficznych endonukleaz odpowiedzialnych za fragmentację DNA zachodzącą podczas apoptozy, a być może byłby to punkt zwrotny w badaniach dotyczących tego procesu. Aktywacja endonukleaz wymaga obecności jonów Ca i Mg, natomiast jony Zn silnie hamują ten proces [6, 15, 85]. Sikorska i współpracownicy [86, 87, 88] wykazali, że w przypadku pierwszego etapu fragmentacji DNA do aktywacji endonukleazy wystarcza obecność jonów Mg i enzym ten nie jest hamowany przez jony Zn. Z tymocytów traktowanych deksametazonem wyizolowano białko NUC-18 przejawiające aktywność DNazy. Białko to jest syntetyzowane *de novo* w czasie apoptozy, ale do jego aktywacji prawdopodobnie potrzebne są jeszcze inne białka regulatorowe, które mogą być indukowane przez deksametazon. Sekwencja aminokwasowa NUC-18 jest wysoce homologiczna z białkiem wewnątrzkomórkowym z rodziny cyklofilin, wiążącym lek immunosupresyjny – cyklosporynę [66].

Jako potencjalne endonukleazy odpowiedzialne za fragmentację DNA w apoptozie badano również DNazę I i II. Chociaż obydwa typy DNaz są w stanie w pewnych warunkach pociąć DNA na nukleosomy, to tylko DNaza I potrzebuje do swej aktywacji dwuwartościowych kationów, Ca i Mg. Wiadomo również, że DNazy tną DNA raczej w regionach pomiędzy oktamerami niż w miejscach restrykcyjnych, na co wskazuje wzór fragmentacji na odcinki o długości 180–200 par zasad. Interesujące jest umiejscowienie DNaz na terenie komórki. DNaza I ulokowana jest w przestrzeni wewnętrznej siateczki endoplazmatycznej, natomiast DNaza II występuje przede wszystkim w lizosomach, choć również odnaleziono ją w samym jądrze [66]. Znanych jest kilka hipotez opisujących sposób uwalniania się DNazy I z siateczki endopla-

zmatycznej, tak aby mogła ona przemieścić się na teren jądra i tam pociąć DNA na fragmenty [66].

Jedną z nich zakłada "rozpuszczenie" błon siateczki endoplazmatycznej, pod wpływem wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca występującego w trakcie apoptozy, a tym samym zniszczenie otoczki jądrowej. Uwolnienie enzymu może nastąpić również na skutek rozpuszczenia lamin jądrowych pod wpływem Ca [23, 58, 66]. Inna hipoteza zakłada, że w komórce występuje kompleks DNaza/aktyna. Taki kompleks wyizolowano np. z komórek L1210. Ponieważ proces wiązania enzymu przez aktynę wymaga energii pochodzącej z ATP, zmniejszenie się puli ATP w komórce w trakcie apoptozy, mogłoby powodować odłączenie DNazy od aktyny i w konsekwencji degradację DNA [66].

Fragmentacja DNA jest pierwszym nieodwracalnym etapem śmierci komórek [65, 66]. Uwolnienie dużej ilości DNA z umierającej komórki może być potencjalnie bardzo niebezpieczne. Po pierwsze, w obrębie uwolnionego DNA z komórki, może znajdować się fragment wirusowego DNA mogącego transfekować inne komórki i prowadzić do transformacji nowotworowej [66, 67]. Po drugie, uwolnione fragmenty chromatyny mogą powodować reakcje autoimmunologiczne [67].

e. MECHANIZMY APOPTOZY

Zarówno apoptoza, jak i nekroza mogą być wywołane przez bardzo wiele różnorodnych czynników, często tych samych. O tym czy komórka ulegnie natychmiastowej destrukcji na drodze nekrozy, czy też uruchomi program apoptozy, zadecydować może czas ekspozycji na dany czynnik, jego dawka, a także rodzaj komórki [19, 71].

Programowana śmierć komórki występuje w wielu tkankach zwierzęcych na różnych poziomach ich rozwoju, zarówno w embriogenezie, jak i w okresie pourodzeniowym np. w metamorfozie, synaptogenezie, w trakcie delecji klonalnej tymocytów [29]. Chociaż molekularny mechanizm tego zjawiska nie jest znany, można scharakteryzować go morfologicznie jako apoptozę. Bardzo często proces śmierci komórki przez apoptozę określa się mianem samobójstwa. Uważa się, że samobójstwo jest skutecznym mechanizmem usuwania z ustroju niepotrzebnych komórek. Komórki te mogą być niepotrzebne z wielu różnych powodów:

1) spełniły już swoją funkcję na pewnym etapie rozwoju np. ogon u kijanki nie jest potrzebny zabie [82, 84],

2) niektóre komórki potrzebne są tylko jednej płci, a drugiej zbędne jak np. przewody Mülera u ssaków zostają zachowane tylko u samic [82],

3) w trakcie formowania się różnych części ciała, np. w rozwoju palców kończyn, umierają komórki mezenchymy znajdujące się pomiędzy palcami [71],

4) w ten sposób likwidowane mogą być komórki, które zostały zmutowane bądź uszkodzone zarówno przez czynniki zewnętrzne, jak i wewnętrzne np. przypadkowe uszkodzenia komórek w trakcie likwidowania stanu zapalnego. Komórki takie mogą

być potencjalnie niebezpieczne, gdyż na skutek uszkodzeń mogą ulec transformacji nowotworowej [9].

Sygnaly do rozpoczęcia kaskady zdarzeń, które w rezultacie doprowadzą do śmierci komórki, mogą być bardzo różne. Co ciekawe, często są one takie same jak te, które prowadzą do proliferacji. Sygnalami tymi mogą być takie substancje, jak hormony lub czynniki wzrostowe, których brak powoduje śmierć zależnych od nich komórek czy też całych narządów [53, 76]. Hipoteza zakładająca, że komórki wymagają sygnału od innych komórek, który zapobiegnie włączeniu się programu śmierci, nie jest nowa [20]. Jaka może być zaleta posiadania przez komórki mechanizmu zapobiegania ich śmierci przez wysyłanie specyficznych sygnałów od innych komórek? Jedną z nich może być fakt, że w prosty sposób eliminowane są komórki o nieprawidłowej lokalizacji, ponieważ nie docierają do nich właściwe sygnały umożliwiające im przeżycie np. brak białek kodowanych przez gen *Sl* uniemożliwia przeżycie komórek rozrodczych [78, 81]. Taka zależność między komórkami może też być użyteczna w przypadku regulacji liczby komórek. Tkanka, czy też narząd, składają się z określonej liczby komórek i dlatego musi być zachowana równowaga pomiędzy liczbą komórek umierających a proliferujących. Łatwo sobie wyobrazić, do czego mógłby doprowadzić niekontrolowany wzrost czy też nadmiar komórek umierających.

Obecnie znanych jest wiele czynników indukujących śmierć komórki. Niektóre z nich to: azydek sodu, UV, H_2O_2 , jonofory, substancje niszczące strukturę mikrotubul, inhibitory syntezy białek, kolchicina, szok cieplny itp. [82]. W zależności od zastosowanej dawki wiele z tych czynników może spowodować albo apoptozę, albo nekrozę. Wysokie, tzw. нефизјологічне stężenia wielu związków, są prosto bardzo toksyczne i substancje te zabijają komórkę natychmiast poprzez nekrozę. Mechanizm działania czynników wywołujących apoptozę został szeroko opisany w artykule Sikory [77]. Utrata delikatnej równowagi pomiędzy liczbą komórek proliferujących i umierających może stać się bardzo niebezpieczna dla całego organizmu (hiperplazja, nowotwory), toteż podlega bardzo ścisłej regulacji genetycznej. Dotychczas zidentyfikowano wiele genów, które uczestniczą w procesie apoptozy, i co więcej mają również znaczenie w proliferacji. Niewątpliwie przemawia to za ścisłym związkiem obydwu tych procesów. Należą do nich geny kodujące między innymi:

- TRPM-2 (*testosterone repressed prostatic message-2*),
- transglutaminazy tkankowe,
- polimeraza (poliADP-rybozy),
- hsp 27 (*heat shock protein*),
- transferaza glutationu,
- katepsyna D,
- aktywator plazminogenu [56, 73, 77, 90].

U nicienia *Cenorabditis elegans* zidentyfikowano szereg genów, które ulegają ekspresji w trakcie morfogenezy w komórkach umierających: *ced-3*, *ced-4*. Natomiast

ced-9 jest genem, którego ekspresję obserwujemy w komórkach, które przeżywają [79].

Do genów, których ekspresję obserwuje się zarówno w proliferacji, jak i apoptozie, należą również protoonkogeny *c-fos*, *c-jun* i *c-myc* [38, 57, 62, 63]. Produktami tych genów są czynniki transkrypcyjne, które mogą wpływać na indukcję innych genów związanych ze śmiercią komórki. Na przykład ekspresja *TRPM-2* w prostaty po kastracji pozostaje pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego AP-1, który jest dimerem złożonym z białek kodowanych przez protoonkogeny *c-fos* i *c-jun* [21]. Protoonkogenem, którego ekspresja powoduje przeżywanie komórek *in vitro*, nawet po usunięciu czynników wzrostowych, jest protoonkogen *bcl-2* wykazujący homologię funkcjonalną z genem *ced-9* [37, 40]. Proporcja produktu białkowego genu *bcl-2* do innego białka – Bax, decyduje o śmierci bądź życiu komórki [60, 97]. Inną, niedawno opisaną parą genów działających antagonistycznie, podobnie jak *Bcl-2/Bax*, jest *ICE/crm A* [8, 97].

P53 jest genem supresorowym nowotworów [16, 28, 61, 87]. Jego działanie szczególnie dobrze można zaobserwować w przypadku pojawienia się uszkodzeń DNA. Ekspresja tego genu powoduje zatrzymanie podziałów komórkowych aż do momentu naprawy uszkodzeń. Jeżeli jednak uszkodzenia DNA są zbyt rozległe, produkt tego genu indukuje śmierć komórki. Rola *p53* w apoptozie jest jednakże bardziej złożona i nie można powiedzieć, że do jego ekspresji dochodzi w każdej komórce apoptycznej.

Niektóre cytokiny, np. IL-1 (interleukina 1) i TNF-A (*tumor necrosis factor*) hamują apoptozę i są w stanie zapobiec PCD w monocytach podobnie jak GM-CSF (*granulomacrophage-colonystimulating factor*) [51]. Spontaniczna apoptoza neutrofilów i eozynofilów *in vitro* może być również modulowana przez mediatory zapalenia, tzn. IL-6, IL-3. Z tego powodu wiele cząsteczek, które nazywa się czynnikami wzrostowymi, można też nazwać czynnikami zapobiegającymi śmierci [20, 33].

Genetyczną regulację apoptozy szerzej omówiono w artykułach przeglądowych Sikory [76, 77] i Rożynkowej [69].

V. ROLA APOPTOZY W FIZJOLOGII I PATOLOGII ORGANIZMU

1. SELEKCJA TYMOCYTÓW W GRASICY

Grasica jest narządem układu immunologicznego, w którym następuje proces dojrzewania i różnicowania limfocytów T. Prekursory limfocytów T, po opuszczeniu szpiku przedostają się do krwi, która transportuje je do grasicy. Dojrzewanie limfocytów, które gdy rezydują w grasicy, nazywane są tymocytami, zachodzi pod wpływem wielu czynników, zarówno takich jak hormony, interleukiny, jak i bezpośredniego kontaktu tymocytów z komórkami nabłonka grasicy. Komórki nabłonkowe grasicy mają na swojej powierzchni antygeny MHC (*major histocompa-*

tibility complex) klasy I i II, stanowiące wzorzec dla tymocytów, na którym mogą “nauczyć się” rozpoznawać antygeny własnego organizmu [44, 74, 75]. Dojrzewanie tymocytów w grasicy jest procesem dwuetapowym i polega na tzw. selekcji pozytywnej i negatywnej. Selekcji podlegają tylko te tymocyty, które mają na swej powierzchni receptor TCR (*T-cell receptor*). TCR jest receptorem, dzięki któremu komórka może rozpoznać obcy antygen związany z cząsteczką MHC (tzw. rozpoznanie asocjatywne). Selekcja pozytywna jest procesem eliminującym tymocyty, których TCR nie wykazuje powinowactwa do cząsteczki MHC, a więc nie jest w stanie rozpoznać obcych antygenów [18, 64, 80]. Selekcja pozytywna pozwala na przeżycie wszystkich tymocytów, które zdolne są do rozpoznania obcego antygeny. Wśród tych tymocytów znajdują się też takie, które mają bardzo wysokie powinowactwo do cząsteczki MHC i mogą potencjalnie wywołać reakcje autoagresji. Te właśnie tymocyty są eliminowane w procesie selekcji negatywnej poprzez delecję klonalną bądź klonalną anergię (unieaktywnienie)[24, 29, 59]. Eliminacja tymocytów nieprawidłowych, tzn. nierozpoznających obcych antygenów i ze zbyt wysokim powinowactwem do własnego MHC zachodzi przez apoptozę. Na obwód przedostaje się jedynie niewielka część limfocytów T: 1–5% z całkowitej liczby tymocytów dojrzewających w grasicy. Ta niewielka część tymocytów, która zostaje zachowana i dalej proliferuje rozpoznaje własne antygeny MHC, ale reaguje z nim tylko w przypadku jednoczesnego rozpoznania z obcym antygenem (asocjatywne rozpoznanie antygeny).

W trakcie poszczególnych etapów dojrzewania tymocytów następuje zmiana receptorów na ich powierzchni. Ostatecznie tymocyty po przejściu z grasicy na obwód dzieli się na dwie podstawowe subpopulacje: limfocyty pomocnicze (z receptorem CD4+) oraz limfocyty cytotoksyczne i supresorowe (z receptorem CD8+).

W trakcie dojrzewania limfocytów w grasicy powstają nie tylko klony komórek wykazujące reaktywność w stosunku do własnych tkanek, ale również takie, które mają na swojej powierzchni receptory CD4+ i jednocześnie CD8+ lub przeciwnie nie mają żadnego z nich. Nieprawidłowe komórki są usuwane w procesie apoptozy, zanim przedostaną się na obwód. Chociaż należy zaznaczyć, że u osób zdrowych jest pewien procent limfocytów T podwójnie pozytywnych, tzn. takich, na których powierzchni są zarówno receptory CD4+ i CD8+. Indukcja apoptozy może zachodzić poprzez stymulację receptora TCR/CD3 [38]. Nie bez znaczenia dla selekcji pozytywnej jest również ekspresja genu *bcl-2* w przeżywających komórkach. Zauważono bowiem, że dojrzałe limfocyty T, w których występowała ekspresja *bcl-2*, nie tylko przeżywały dłużej w hodowli, ale również odpowiadały intensywniej na antygen [1, 4, 5, 41, 45].

2. APOPTOZA KOMÓREK NERWOWYCH

W układzie nerwowym, podobnie jak w innych narządach, śmierć komórek jest ważnym aspektem życia. We wczesnym rozwoju embrionalnym występuje nadmiar neuronów, dlatego też znaczna ich część umiera. Na przykład, w procesie tworzenia się rzeźby mózgu, 50% neuronów umiera, zanim zakończy się rozwój embrionalny

[7, 14, 43]. Pięć lat temu wykazano, po raz pierwszy że śmierć neuronów można scharakteryzować jako apoptozę. Jednakże, tak naprawdę do dzisiejszego dnia nie bardzo wiadomo, dlaczego ta a nie inna komórka umarła i czym różniła się od tej, która przeżyła. Być może ma tu pewne znaczenie dostępność do czynników wzrostowych. Wiadomo bowiem, że rozwijające się i rosnące neurony potrzebują czynnika wzrostowego zwanego NGF (*nerve growth factor*), który jest syntetyzowany w docelowych tkankach [14, 68]. Niektóre neurony te, które w swoim środowisku mają wystarczającą ilość NGF – przeżywają, natomiast te, które mają go za mało lub nie są na niego wystarczająco wrażliwe – umierają [7]. Niedawno wykazano, że ekspresja genu *bcl-2* może zapobiegać śmierci komórek nerwowych indukowanej niedoborem NGF. Również w trakcie tworzenia się sieci połączeń synaptycznych część komórek nerwowych pozostaje poza jej obrębem i te komórki również ulegają apoptozie [7, 10].

W przypadku chorób, w których występują objawy demencji, takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer, następuje znaczny ubytek tkanki nerwowej, zwłaszcza w pewnych strukturach, takich jak hipokamp. Wydaje się, że za ten proces odpowiedzialna jest również śmierć komórek poprzez apoptozę [9].

3. APOPTOZA KOMÓREK W EMBRIOGENEZIE

Podczas normalnego rozwoju embrionalnego część komórek ulega apoptozie. Zjawisko to jest bardzo istotne, ponieważ na bardzo wczesnych etapach embriogenezy komórki przemieszczają się i różnicują. U zarodków ssaków w trakcie kształtowania się dróg płciowych, u obydwu płci wytwarzają się zarówno przewody Müllera (późniejsze jajowody), jak i przewody Wolfa (nasieniowody). Na skutek lokalnych oddziaływań z odpowiednią gonadą te, które nie są właściwe dla niej (gonady), zanikają – ulegają apoptozie. Co ciekawe, jeżeli wytniemy gonady, zawsze zachowują się przewody Müllera. Na podstawie takiego doświadczenia możemy wnioskować, że rozwój tych przewodów nie wymaga dodatkowego bodźca [81].

Innym spektakularnym przykładem występowania zjawiska apoptozy w embriogenezie jest obumieranie komórek mezenchymy z paletki ręki, w trakcie kształtowania się palców [81, 95].

4. APOPTOZA W AIDS

AIDS (*acquired immunodeficiency syndrom*) jest to zespół wtórnego niedoboru odporności wywołany wirusem HIV. Znanych jest wiele hipotez próbujących wyjaśnić patogenezę AIDS.

Jedną z nich jest hipoteza zakładająca, że większość immunologicznych i nieimmunologicznych zaburzeń występujących u chorych na AIDS, włączając w to atrofię mózgu i demencję starczą, może być związana z aktywacją apoptozy komórek CD4+ [34, 98]. Chociaż nie ma jednoznaczności co do mechanizmu przekazywania sygnału do apoptozy limfocytów przez wirusa HIV, bierze się pod uwagę kilka możliwości:

1. Uwalnianie się z powierzchni wirionów i komórek, w których wirus ulega replikacji, glikoproteiny gp120, i pojawianie się jej na powierzchni komórek niezakażonych. Glikoproteina gp120 może wiązać się z CD4+, a następnie po internalizacji i połączeniu się z MHC klasy II jest prezentowana na powierzchni komórek. Limfocyty te stają się obiektem ataku swoistych limfocytów cytotoksycznych lub ulegają eliminacji w reakcji ADCC (cytotoksyczność zależna od przeciwciał). Mechanizm łączenia gp120 z CD4+ nie wyjaśnia jednak występowania apoptozy obserwowanej w komórkach CD8+, która ma miejsce u osób chorych na AIDS. Niewykluczone, że apoptoza tych komórek zachodzi pod wpływem takich cytokin, jak TNF(*tumor necrosis factor*) czy TGF- β (*transforming growth factor* – β). Zaobserwowano bowiem zwiększoną ich produkcję przez makrofagi krwi obwodowej osób zainfekowanych [17, 34, 35].

2. Pewne fragmenty białka gp120 i gp41 wykazują podobieństwo budowy do cząsteczki MHC. Tak więc limfocyty mające epitopy wirusa mogą zostać rozpoznane jako komórki obce i zniszczone [3, 54, 55].

3. Białko HIV ma właściwości superantygenu, który po związaniu z łańcuchem β TCR wywołuje aktywację i śmierć komórki [54, 55, 59].

5. APOPTOZA KOMÓREK TKANEK HORMONUZALEŻNYCH

a. METAMORFOZA

Podczas metamorfozy płazów i owadów, zaobserwowano komórki wykazujące pewne cechy charakteryzujące komórki apoptotyczne. Ponieważ część tych badań prowadzono w latach, kiedy zjawisko apoptozy było jeszcze zupełnie nieznanie, obserwacje te interpretowano bardzo różnie. W większości przypadków jako nekrozę, która była wówczas jedynym znanym sposobem śmierci komórki [47, 71].

Mięśnie larw owadów występujące pomiędzy segmentami brzuszными wykazują funkcję lokomotywną. Po przeobrażeniu w postać dorosłą mięśnie te w dwóch pierwszych i dwóch ostatnich segmentach (brzusznych) umierają, ponieważ nie pełnią już żadnej funkcji u osobników dorosłych. Natomiast w pozostałych czterech segmentach zostają zachowane [47, 71]. Komórki tych mięśni umierają po 36 godzinach od pojawienia się postaci dorosłej na skutek obniżenia się poziomu 20-hydroksyekdyzolu [71]. Podobne zjawisko masowego umierania komórek obserwujemy w ogonie kijanek podczas jej przeobrażania w dorosłą postać żaby, które jest indukowane hormonami tyroidowymi [71, 82, 83, 84].

b. ATROFIA

Atrofia w tkankach hormono-zależnych, występująca na skutek obniżenia się poziomu hormonów tropowych we krwi, była znana dawniej jako zmniejszenie się wielkości komórek [78, 82]. Obecnie uważa się, że komórki nie zmieniają swojej wielkości, lecz część ich umiera poprzez apoptozę [82]. I tak, apoptozę komórek obserwowano w korze nadnerczy szczura po usunięciu przysadki mózgowej oraz w

gruczole krokowym szczura po jego kastracji. Śmierć komórek obserwowana w gruczole krokowym zachodzi wyłącznie w części nabłonka hormono-zależnego. Stanowią one ok. 80% całkowitej liczby komórek obecnych w dolnym płacie prostaty i ok. 70% z nich umiera w ciągu 7 dni po kastracji [82, 83]. W umierających komórkach występuje ekspresja specyficznych genów, tj. TRPM-2 (*testosterone repressed prostatic message-2*), TGF- β , kalmoduliny, S-transferazy glutationu. Innymi genami, których ekspresja również pojawia się w tym okresie, są *c-myc*, *Ha-ras*, ale nie są one specyficzne dla procesów apoptozy. Ich ekspresję obserwuje się również w czasie proliferacji [2, 12, 82].

Przykład programowanej śmierci indukowanej również brakiem odpowiedniego hormonu stanowi regresja gruczołu mlecznego po zakończeniu laktacji (spadek poziomu prolaktyny) i zanikanie oocytów (które nie zdołały dojrzeć podczas cyklu miesięcznego) rozpoczynające się od apoptozy komórek ziarnistych, które są hormono-zależne [82].

Dokładne poznanie mechanizmu śmierci komórkowej w tkankach, w których powodowane jest to określonym poziomem hormonów, jest istotne z punktu widzenia możliwości leczenia drogą hormonalną wielu nowotworów hormono-zależnych gruczołów, tj. raka piersi czy raka prostaty [82].

O ile jesteśmy sobie w stanie wyobrazić, że rak prostaty wywołany jest przez nadmierną proliferację komórek androgeno-zależnych i wystarczy pozbawić te komórki dopływu hormonu, aby spowodować ich śmierć, to w przypadku raka komórek prostaty hormono-niezależnych sytuacja nie jest już tak prosta. Ostatnio z powodzeniem udało się wywołać apoptozę w tych komórkach przez zastosowanie miejscowe taspigarginy, która hamuje w siateczce śródplazmatycznej aktywność pompy ATP-azowej zależnej od wapnia [82].

Apoptoza może również wystąpić na skutek nadmiernej stymulacji hormonalnej, np. nadmiar progesteronu stymuluje u chomika zanik endometrium, podobnie jak hormony glukokortykoidowe u wielu gatunków powodują atrofię tkanki limfoidalnej [9, 82, 51].

6. APOPTOZA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Komórki nowotworowe, podobnie jak wiele typów komórek prawidłowych, ulegają apoptozie zarówno spontanicznej, jak też indukowanej wieloma czynnikami stosowanymi w terapii przeciwnowotworowej [27, 31, 51, 89, 92, 93, 94]. Zauważono jednakże, że bardzo często podatność komórek niektórych typów nowotworów na leki przeciwnowotworowe zależy od ich podatności na indukcję apoptozy.

Bardzo często o podatności komórek nowotworowych na apoptozę, indukowaną czynnikami uszkadzającymi DNA, decyduje obecność w nich niezmutowanej formy genu *p53* [48]. W komórkach, w których obserwuje się delecje tego genu supresora nowotworu bądź też został on eksperymentalnie zablokowany, nie udało się wyindukować apoptozy promieniowaniem jonizującym [16, 22, 27]. Podatność komórek

nowotworowych na umieranie przez apoptozę wg Darzynkiewicza może zależeć od fazy cyklu komórkowego, w której zastosowano lek. Niektóre leki preferencyjnie zabijają komórki w fazie G₀, inne, np. UV, w fazie G₂ [11, 30, 32, 46, 72]. Tak więc wiedza dotycząca mechanizmu apoptozy komórek nowotworowych może być również przydatna w stosowanej terapii przeciwnowotworowej.

UWAGI KOŃCOWE

W ostatnich latach coraz bardziej staje się widoczne, że szlaki komórkowe prowadzące do apoptozy, proliferacji, jak i różnicowania zawierają wiele elementów wspólnych. Niewykluczone, że stanowią część tego samego mechanizmu, pozostaje “tylko” znalezienie miejsc na tym szlaku, w których zapada decyzja o być albo nie być komórki.

A jednocześnie program śmierci uruchamiany w komórce wydaje się być specyficzny tkankowo, a nie jeden dla wszystkich komórek.

Praca sponsorowana z grantu KBN nr 6 P20703707.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AKBAR AN, SALMON M, SAVILL J, JANOSSY G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory- a “balancing act” between cell death and survival.. *Immunology Today* 1993; **14**: 526–531.
- [2] AMATI B, LITTLEWOOD TD, EVAN GI, LAND H. The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *The EMBO J* 1993; **12**: 5083–5087.
- [3] AMENDOLA A, LOMBARDI G, OLIVERIO S, COLIZZI V, PIACENTINI M. HIV-1 gp120-dependent induction of apoptosis in antigen-specific human T cell clones is characterized by “tissue” transglutaminase expression and prevented by cyclosporin A. *FEBS Lett* 1994; **339**: 258–264.
- [4] ANDJELIC S, JAIN N, NIKOLIC-ZUGIC J. Immature thymocytes become sensitive to calcium-mediated apoptosis with the onset of CD8, CD4, and the T cell receptor expression: a role for bcl-2?. *J Exp Med* 1993; **178**: 1745–1751.
- [5] ASHWELL JA, BERGER NA, CIDLOWSKI JA, LANE DP, KORSMEYER SJ. Coming to terms with death: apoptosis in cancer and immune development. *Immunology Today* 1994; **15**: 147–151.
- [6] BARBIERI D, TROIANO L, GRASSILLI E, AGNESINI C, CRISTOFALO EA, MONTI D, CAPRI M, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C. Inhibition of apoptosis by zinc: a reappraisal. *Bioch Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1256–1261.
- [7] BARINAGA M. Death gives birth to the nervous system. But how?. *Science* 1993; **259**: 762–763.
- [8] BARINAGA M. Cell suicide: by ice, not fire. *Science* 1994; **263**: 754–756.
- [9] BARR PJ, TOMEI LD. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; **12**: 487–493.

- [10] BATES RC, BURET A, VAN HELDEN DF, HORTON MA, BURNS GF. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol* 1994; **125**: 403–415.
- [11] BERTRAND R, SOLARY E, O'CONNOR P, KOHN KW, POMMIER Y. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 314–321.
- [12] BISSONNETTE RP, SHI Y, MAHBOUBI A, GLYNN JM, GREEN DR c-myc and apoptosis. Tomei. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp.327–356.
- [13] BOWEN ID. Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol Int* 1993; **17**: 365–380.
- [14] BOWEN ID. Apoptosis. *Neuronal Cell Death and Repair*. 1993: pp.7-21.
- [15] BRUENE B, HARTZELL P, NICOTERA P, ORRENIUS S. Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes. *Exp Cell Res* 1991; **195**: 323–329.
- [16] CAELLES C, HELMBERG A, KARIN M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994; **370**: 220–223.
- [17] CHIGIRA M, SHINOZAKI T, WATANABE H. AIDS from an oncological viewpoint: paradoxical immunodeficiency by helper T cell proliferation and senescence. *Int J Onc* 1994; **4**: 101–107.
- [18] CLARKE MF, PURDIE CA, HARRISON DJ, MORRIS RG, BIRD CC, HOOPER ML, WYLLIE AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; **362**: 849–852.
- [19] COHEN JJ. Apoptosis. *Immunology Today* 1993; **14**: 126–130.
- [20] COLLINS MKL, PERKINS GR, RODRIGUES-TARDUCHY G, NIETO MA, LOPEZ-RIVAS A. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *BioEssays* 1994; **16**: 133–138.
- [21] COLOTTA F, POLENTARUTTIN, SIRONI M, MANTOVANI A. Expression and Involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18278–18283.
- [22] COTTER TG, LENNON SV, GLYNN JG, MARTIN SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth. Development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Research* 1990; **10**: 1153–1159.
- [23] DUKE RC, WITTER RZ, NASH PB, DING-E YOUNG J, OJCIUS DM. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *FASEB J* 1994; **8**: 237–246.
- [24] EZINE S, CEREDIG R. Haemopoiesis and early T-cell differentiation. *Immunology Today* 1994; **15**: 151–154.
- [25] FERNANDES RS, COTTER TG. Activation of a calcium magnesium independent endonuclease in human leukemic cell apoptosis. *Anticancer Res* 1994; **13**: 1253–1260.
- [26] FESUS L. Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* 1993; **328**: 1–5.
- [27] FISHER DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; **78**: 539–542.
- [28] FURUYA Y, BERGES R, LUNDMO P, ISAACS JT. Cell proliferation, p53 gene expression, and intracellular calcium in programmed death: prostate model. Tomei. Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp. 231–252.
- [29] GOLSTEIN P, OJCIUS M, DING-E YOUNG J. Cell death mechanisms and the immune system. *J Exp Med* 1991; **121**: 29–65.
- [30] GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. Staurosporine blocks cell progression through G1 between the cyclin D and cyclin E restriction points. *Cancer Res* 1994; **54**: 3136–3139.
- [31] GONOS ES, SPANDIDOS DA. Oncogenes in cellular immortalisation and differentiation. *Anticancer Res* 1993; **13**: 1117–1122.

- [32] GORCZYCA W, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; **53**: 1945–1951.
- [33] GOTTLIEB E, HAFFNER R, VON RUEDEN T, WAGNER EF, OREN M. Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J* 1994; **13**: 1368–1374.
- [34] GOUGEON ML, MONTAGNIER L. Apoptosis in Aids. *Science* 1993; **260**: 1269–1270.
- [35] GREENE WC. Aids and immune system. *Sci Am* 1993; 67–73.
- [36] GROUX H, MONTE D, PLOUVIER B, CAPRON A, AMEISEN JC. CD-3 mediated apoptosis of human medullary thymocytes and activated peripheral T cells: respective roles of interleukin-1, interleukin-2, interferon-gamma and accessory cells. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1623–1629.
- [37] HENGARTNERT MO, HORVITZ HR. Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature* 1994; **369**: 318–320.
- [38] HERMEKING H, EICK D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994; **265**: 2091–2092.
- [39] HICKMAN JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Methast Rev* 1992; **11**: 121–139.
- [40] HOCKENBERY DM, OLTVAI ZN, YIN X-M, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; **75**: 241–251.
- [41] KABELITZ D, POHL T, PECHHOLD K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunology Today* 1993; **14**: 338–339.
- [42] KAMESAKI S, KAMESAKI H, JORGENSEN TJ, TANIZAWA A, POMMIER Y, COSSMAN J. bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 1993; **53**: 4251–4256.
- [43] KAMIŃSKA B. Programowana śmierć komórek w rozwoju układu nerwowego. *Materiały Wiosennej Szkoły Neurobiologii* 1994; 15–22.
- [44] KAWIAK J, MIRECKA J, OLSZEWSKA M, WARCHOŁ J. Podstawy Cytofizjologii. Wydawnictwo Naukowe PWN. 1992; 516–547
- [45] KORSMEYER SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunology Today* 1992; **13**: 285–288.
- [46] LI X, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z. Simultaneous analysis of DNA replication and apoptosis during treatment of HL-60 cells with camptothecin and hyperthermia and mitogen stimulation of human lymphocytes. *Cancer Res* 1994; **54**: 4289–4293.
- [47] LOCKSHIN RA, ZAKERI ZF. Programmed cell death: new thoughts and relevance to aging. *J Gerontol* 1990; **45**: B135–B140.
- [48] LOWE SW, RULEY HE, JACKS T, HOUSMAN DE. p-53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; **74**: 957–967.
- [49] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M. Nowy aspekt metabolizmu poliamin-postranslacyjne, zależne od transglutaminaz, modyfikacje białek przez poliaminy. *Post Bioch* 1993; **39**: 118–126.
- [50] MARTIN SJ. Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends in Cell Biol* 1993; **3**: 141–144.
- [51] MARTIN SJ, COTTER TG. Apoptosis of human leukemia: induction, morphology, and molecular mechanisms. Tomei. Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp.185–227.
- [52] MARTIN SJ, GREEN DR, COTTER TG. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Pharmacol Sci* 1994; **19**: 26–30.
- [53] MCCONKEY DJ, ORRENIUS S. Signal transduction pathways to apoptosis. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 370–374.
- [54] MEYAARD L, OTTO SA, JONKER RR, MIJNSTER MJ, KEET RPM, MIEDEMA F. Programmed death of cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; **257**: 217–219.

- [55] MEYAARD L, SCHUITEMAKER H, MIEDEMA F. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function?. *Immunology Today* 1993; **14**: 161–164.
- [56] NAGATA S. Apoptosis-mediating Fas antigen and its natural mutation. Tomei. Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp. 313–325.
- [57] NG L, FORREST D, CURRAN T. Differential roles for fos and jun in DNA-binding: redox-dependent and independent functions. *Nuc Acids Res* 1993; **21**: 5831–5837.
- [58] NICOTERA P, BELLOMO G, ORRENIUS S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; **32**: 449–470.
- [59] NOSSAL GJV. Life, death and the immune system. *Sci Am* 1993; 21–30.
- [60] NUNEZ G, CLARKE MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 399–403.
- [61] OREN M. The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Methast Rev* 1992; **11**: 141–148.
- [62] OSBORNE BA, SCHWARTZ LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 394–399.
- [63] OWENS GP, COHEN JJ. Identification of genes involved in programmed cell death. *Cancer Methast Rev* 1992; **11**: 149–155.
- [64] PAWLOWSKI TJ, STAERZ UD. Thymic education- T-cells do it for themselves. *Immunology Today* 1994; **15**: 205–209.
- [65] PEITSCH M.C., MUELLER C., TSCHOPP J. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucl Acids Res* 1993; **21**: 4206–4209.
- [66] PEITSCH MC, MANNHERZ HG, TSCHOPP J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death?. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 37–41.
- [67] PIACENTINI M, DAVIAS PJA, FESUS L. Tissue Transglutaminase in cell undergoing apoptosis. Tomei. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp. 143–163.
- [68] RAFF MC, BARRES BA, BURNE JF, COLES HS, ISHIZAKI Y, JACOBSON MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Sci* 1993; **262**: 695–700.
- [69] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórek. *Post Biol Kom* 1994 **21**: 303–318.
- [70] SAVILL J, FADOK V, HENSON P, HASLETT C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunology Today* 1993; **14**: 131–136.
- [71] SCHWARTZ LM. The role of cell death genes during development. *BioEssays* 1991; **13**: 389–395.
- [72] SCHWARTZ LM, OSBORNE BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 1993; **14**: 582–590.
- [73] SEN S, D'INCALCIM. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett* 1992; **307**: 122–127.
- [74] SHI L, NISHIOKA WK, TH'NG J, BRADBURY EM, LITCHFIELD DW, GREENBERG AH. Premature p34^{cdc2} activation required for apoptosis. *Science* 1994; **263**: 1143–1145.
- [75] SHORTMAN K, SCOLLAY R. Death in the thymus. *Nature* 1994; **372**: 44–45.
- [76] SIKORA E. Nieśmiertelność, starzenie i śmierć komórek. Rola protoonkogenów, onkogenów i antyonkogenów. *Post Bioch* 1993; **39(4)**: 212–220.
- [77] SIKORA E. Mechanizmy programowanej śmierci komórek (apoptoza). *Post Bioch* 1994; **40**: 150–160.
- [78] SMETS LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1994; **5**: 3–9.

- [79] SMITH CA, GRIMES EA, MCCARTHY NJ, WILLIAMS GT. Multiple gene regulation of apoptosis: significance in immunology and oncology. Tomei. Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp.43–87.
- [80] SUGIMOTO A, FRIESEN PD, ROTHMAN JH. Baculovirus p35 prevents developmentally programmed cell death and rescues a ced-9 mutant in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 1994; **13**: 2023–2028.
- [81] SURH CD, SPRENT J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 1994; **372**: 100–103.
- [82] TENNISWOOD M, TAILLEFER D, LAKINS J et al. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. Tomei. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994: pp.143–163.
- [83] TENNISWOOD MP, GUENETTE RS, LAKINS J, MOOIBROEKA M, WONG P, WELSH JE. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Methast Rev* 1992; **11**: 197–220.
- [84] THOMPSON EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol* 1994; 665–673.
- [85] TREWES S, TRENTINI PL, ASCANELLI M, BUCCI G, DI VIRGILIO F. Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular calcium in lymphocytes. *Exp Cell Res* 1994; **211**: 339–343.
- [86] VAUX DL, HAECCKER G, STRASSER A. An Evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; **76**: 777–779.
- [87] WALKER PR, WEAVER VM, LACH B, LEBLANC J, SIKORSKA M. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res* 1994; **213**: 100–106.
- [88] WEAVER VM, LACH B, WALKER PR, SIKORSKA M. Role of proteolysis in apoptosis: involvement of serine proteases in internucleosomal DNA fragmentation in immature thymocytes. *Bioch Cell Biol* 1993; **71**: 488–450.
- [89] WHITE E. p53, guardian of Rb. *Nature* 1994; **371**: 21–22.
- [90] WILLIAMS GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; **65**: 1097–1098.
- [91] WILLIAMS GT, SMITH CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993; **74**: 777–779.
- [92] WILLIAMS GT, SMITH CA, MCCARTHY NJ, GRIMES EA. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends in Cell Biol* 1992; **2**: 263–267.
- [93] WRIGHT SC, ZHONG J, LARRICK JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion. *FASEB J* 1994; **8**: 654–660.
- [94] WYLLIE AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Methast Rev* 1992; **11**: 95–103.
- [95] WYLLIE AH. Death gets a brake. *Nature* 1994; **369**: 272.
- [96] WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell Death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; **68**: 251–303.
- [97] YIN X, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994; **369**: 321–323.
- [98] ZINKERNAGEL RM, HENGARTNER H. T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunology Today* 1994; **15**: 262–268.

Otrzymano: 10.03.1995 r.,

Przyjęto: 02.06.1995 r.,

Adres autora: 04-087 Warszawa, Igańska 20/85.

REAKCJE ADP-RYBOZYLACJI BIAŁEK I ICH ZNACZENIE BIOLOGICZNE W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH

THE ADP-RIBOSYLATION OF PROTEINS AND ITS BIOLOGICAL SIGNIFICANCE IN EUKARIOTIC CELLS

Izabela KOŁADKIEWICZ*, Joanna STROSZNAJDER**

*Pracownia Komórkowej Transdukcji Sygnału, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa;**Pracownia Komórkowej Transdukcji Sygnału, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

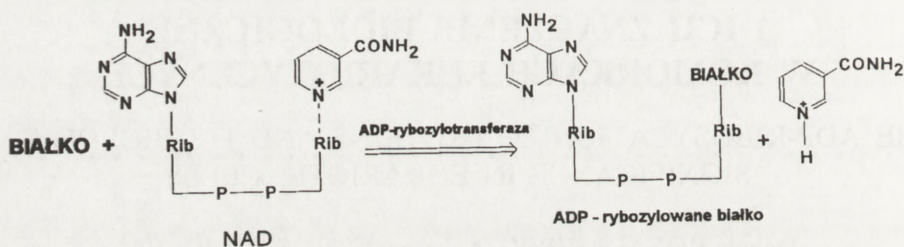
Streszczenie. ADP-rybozylacja jest jednym z ważniejszych procesów, dzięki któremu żyjący organizm może modyfikować swoje struktury białkowe i ich funkcje. Reakcje ADP-rybozylacji polegają na przeniesieniu reszty ADP-rybozy, której donorem jest NAD (dinukleotyd nikotynamidoadeninowy) na białka akceptorowe, takie jak np. histony, enzymy, białka G. Reakcje te zachodzą przy udziale tej samej klasy transferaz: syntazy poli-ADP-rybozy oraz mono-ADP-rybozylotransferazy. Proces poli-ADP-rybozylacji powoduje modyfikację białek jądrowych i DNA, podczas gdy proces mono-ADP-rybozylacji modyfikuje pozajądrowe białka komórki. Proces ADP-rybozylacji reguluje funkcje szeregu białek enzymatycznych oraz jest włączony w szereg procesów biologicznych, w tym w procesy uczenia i pamięci.

Słowa kluczowe: syntaza poli-ADP-rybozy, mono-ADP-rybozylotransferazy, białka G, tlenek azotu.

Summary. ADP-ribosylation is a one of more important processes due to a living organism can modify protein structure and function. ADP-ribosylation is a covalent post-translational protein modification in which the ADP-ribose moiety of NAD is transferred to individual substrates (i.e. histones, different enzymes or G-proteins). This reaction is catalyzed by enzymes: poly-ADP-ribose synthase and mono-ADP-ribosyltransferase. Poli-ADP-ribosylation is responsible for modification of DNA and other nuclear proteins. Mono-ADP-ribosylation is involved in many biological processes, i.e. learning and memory processes.

Key words: poli-ADP-ribose synthase, mono-ADP-ribosyltransferase, G protein, nitric oxide.

Reakcje ADP-rybozylacji polegają na przeniesieniu reszty ADP-rybozy z dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) na specyficzne białka akceptorowe komórki (rys. 1). Łatwość tego procesu wynika z charakteru wiązania N-glikozydowego w NAD, które jest wiązaniem o wysokim potencjale transferu o wartości energetycznej porównywalnej z wiązaniem bezwodnikowym ATP. Reakcje ADP-rybozylacji dzielimy ogólnie na reakcje poli- i mono-ADP-rybozylacji, w zależności od ilości reszt ADP-rybozy przyłączanych do białka oraz chemicznej natury wiązania ADP-ryboza-białko, a także na reakcje enzymatyczne i nieenzymatyczne.



Rys. 1. Schemat ogólny reakcji ADP-rybozylacji, przeniesienie reszty ADP-rybozy na białko, katalizowane przez odpowiednią ADP-rybozylotransferazę, zachodzi z rozerwaniem wiązania N-glikozydowego w NAD, które umownie zaznaczono linią przerywaną; w wyniku reakcji powstaje ADP-rybozylowane

POLI-ADP-RYBOZYLACJA

Ponad 95% reakcji poli-ADP-rybozylacji zachodzi w jądrze komórkowym [24]. Reakcje te są katalizowane przez enzym, zwany syntazą lub inaczej polimerazą poli-ADP-rybozy (tab. 1). Jego masa cząsteczkowa wynosi 110–130 kDa, pI 9–10, a jego aktywność zależy całkowicie od obecności DNA, wielowartościowych kationów (np. Mg^{2+} , histonów i poliamin), związków mających właściwości redukujące wiązanie siarczkowe oraz od obecności glikohydrolaz NAD. Syntaza poli-ADP-rybozy posiada trzy funkcjonalne domeny: dla wiązania substratu, auto-ADP-rybozylacji oraz wiązania z DNA. Znanymi inhibitorami tej syntazy są amid kwasu nikotynowego, amid kwasu benzoowego oraz ich pochodne. Mechanizm przyłączenia ADP-rybozy w reakcji poli-ADP-rybozylacji przebiega z wytworzeniem wiązania estrowego, O-glikozydowego (rys. 2). Do białka przyłączane może być około 100 jednostek ADP-rybozy, między innymi również do samego enzymu [24]. Stwierdzono, że syntaza poli-ADP-rybozy może być auto-ADP-rybozylowana w procesie zależnym od tlenu azotu [27]. Etanol stosowany przewlekłe powoduje wzrost aktywności

TABELA 1. Reakcja poli-ADP-rybozylacji

Enzymy	Substraty	
	białko	aminokwas
Enzymy jądrowe		
Syntaza poli-ADP-rybozy	histon H1 Mg ²⁺ , Ca ²⁺ -zależne endonukleazy syntaza poli-ADP-rybozy polimerazy RNA	glutaminian nieznany nieznany nieznany

procesu poli-ADP-rybozylacji [17]. Nadmierny wzrost aktywności tego procesu może odgrywać istotną rolę w degeneracji i obumieraniu neuronów w ośrodkowym układzie nerwowym.

MONO-ADP-RYBOZYLACJA

Mono-ADP-rybozylacja jest procesem przebiegającym poza jądrem komórkowym. Reakcje mono-ADP-rybozylacji dzielimy na: nieenzymatyczne i enzymatyczne. Procesy mono-ADP-rybozylacji zachodzą z utworzeniem wiązania N-glikozydowego na bocznym łańcuchu niektórych aminokwasów (rys. 2) [24] i w zależności od rodzaju aminokwasu można je podzielić na:

- 1) specyficzne dla diftamidu (pochodna histydyny),
- 2) specyficzne dla lizyny,
- 3) specyficzne dla asparaginy,
- 4) specyficzne dla argininy (tab. 2).

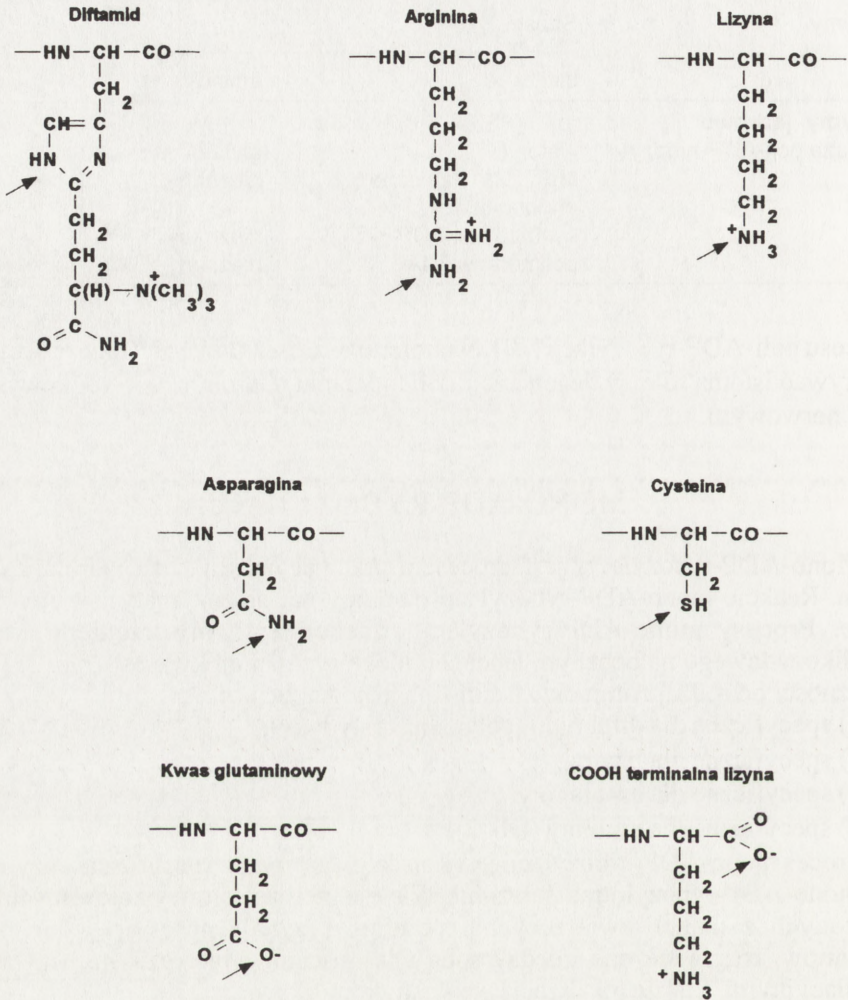
Proces mono-ADP-rybozylacji jest kontrolowany przez specyficzne enzymy zwane mono-ADP-rybozylotransferazami. Wiele z nich zostało wyizolowanych i oczyszczonych z tkanek zwierzęcych i pomimo przynależności do jednej rodziny enzymów, różnią się one między sobą własnościami kinetycznymi, fizycznymi i regulacyjnymi, a także lokalizacją wewnątrzkomórkową.

W schorzeniach wywołanych przez mono-ADP-rybozylotransferazy, takie jak egzotoksyny dyfterytu, krztuśca i cholery, obserwowany jest nadmierny wzrost aktywności procesu ADP-rybozylacji.

MONO-ADP-RYBOZYLACJA NIEENZYMATYCZNA

Mono-ADP-rybozylacja specyficzna dla lizyny

Reakcje mono-ADP-rybozylacji wykorzystujące lizynę jako substrat mają charakter nieenzymatyczny, zaś produktami są addukty ADP-ryboza-białko (tzw. zasady Shiffa). W warunkach wzmożonej aktywności glikohydrolazy NAD, która produkuje



Rys. 2. Substraty wykorzystywane w reakcjach poli- i mono-ADP-rybozylacji, pozycje w których następuje przyłączenie cząsteczki ADP-rybozy do odpowiedniej reszty aminokwasowej białka zaznaczono strzałką

ADP-rybozę w błonach mitochondrialnych i trwale modyfikuje lub ogranicza aktywność mitochondrialnej polimerazy DNA, tworzenie się tych adduktów może odgrywać istotną rolę w modyfikacji białek mitochondrialnych [24].

TABELA 2. Reakcje mono-ADP-rybozylacji

Enzymy	Substraty	
	białko	aminokwas
Egzogenne		
Toksyna dyfterytu	Czynnik elongacyjny EF-2	Diftamid
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Toksyna A)	Czynnik elongacyjny EF-2	Diftamid
Toksyna cholery	Białko G _t	Arginina
	Białko G _s	Arginina
Toksyna krztuśca	Białko G _i	Asparagina
	Białko G _o	Asparagina
	Białko G _t	Asparagina
Endogenne (u ssaków)		
Cytozolowa ADP-rybozylotransferaza	Białko G _t	Diftamid
Komórkowa ADP-rybozylotransferaza	Czynnik elongacyjny EF2	Diftamid
Cytozolowa ADP-rybozylotransferaza	<i>rho</i>	Asparagina
Błonowa ADP-rybozylotransferaza	Białko G _s i inne białka	Arginina
Mitochondrialna ADP-rybozylotransferaza	Białka wewnętrznej błony mitochondrium	Arginina

Mono-ADP-rybozylacja enzymatyczna

Mono-ADP-rybozylacja specyficzna dla diftamid

Reakcje mono-ADP-rybozylacji specyficzne dla diftamid są katalizowane toksyną dyfterytu, egzotoksyną A oraz endogenną ADP-rybozylotransferazą występującą głównie w cytozolu. Powyższe enzymy katalizują reakcje rybozylacji czynnika elongacji EF-2 (ang. *elongation factor 2*), odpowiedzialnego za wydłużanie łańcucha polipeptydowego w rybosomach komórek eukariotycznych [24].

Mono ADP-rybozylacja specyficzna dla asparaginy

Toksyna krztuśca posiadająca aktywność ADP-rybozylotransferazy specyficzną dla asparaginy jest białkiem składającym się z kilku podjednostek, z których największa S1 ma aktywność enzymatyczną, a pozostałe podjednostki pełnią funkcję łącznika toksyny z błoną komórkową [19]. Reakcje mono-ADP-rybozylacji, katalizowane przez toksynę krztuśca zachodzą na podjednostce białka G, w wyniku czego następuje dysocjacja białka G od receptora, a dalszą tego konsekwencją jest inhibicja układu efektorowego. W rezultacie reakcja tego typu może być odpowiedzialna za wyłączenie sygnału receptorowego związanego z aktywacją cykazy adenylanowej [6,11,19]. Dzięki temu toksyna krztuśca jest bardzo dobrym narzędziem badawczym służącym

do identyfikacji białek G, biorących udział w procesach transdukcji sygnału. Katalizuje ona reakcje mono-ADP-rybozylacji takich białek G, jak:

– białko G_t (tzw. transducyna), które jest związane z degradacją cyklicznego GMP wskutek aktywacji fosfodiesterazy cGMP sprzężonej z fotoreceptorami [21,25];

– białko G_i , które jest związane z inhibicją aktywności cykazy adenylanowej i hamuje syntezę cyklicznego AMP w błonie, endosomach, ciałkach Golgiego i w jądrze [20, 21,22];

– białko G_o , które jest związane z receptorowo-zależną regulacją niektórych kanałów jonowych [6,20,21];

– białko G_p (dotychczas niezidentyfikowane), które jest związane z aktywacją fosfolipazy C i produkcją inozytolotrisfosforanu, uwalniającego wapń z retikulum endoplazmatycznego komórki, oraz produkcją diacyloglicerolu, będącego endogennym aktywatorem kinazy białkowej C [6].

Mono ADP-rybozylacja specyficzna dla argininy

Znane enzymy katalizujące reakcje mono-ADP-rybozylacji specyficzne dla argininy, to: białka kodowane fagowo (*phage-encoded proteins*), toksyna cholery i niektóre endogenne ADP-rybozylotransferazy [19,23,24]. Podobnie jak toksyna krztuśca, toksyna cholery znajduje zastosowanie do badania funkcji białek G. Toksyna cholery, posiadająca własności mono-ADP-rybozylotransferazy, zbudowana jest z dwóch fragmentów łańcuchowych, A i B, połączonych ze sobą wiązaniem siarczkowym. Najpierw fragment B wiąże się do specyficznych glikoproteinowych receptorów w błonie komórki, a następnie fragment A, który posiada aktywność enzymatyczną, przechodzi do jej wnętrza [11]. Toksyna cholery katalizuje reakcje mono-ADP-rybozylacji podjednostki α białka G_s , związanego z aktywacją, np. cykazy adenylanowej (reakcja ta wymaga obecności GTP i Mg^{2+}) [23,24] oraz podjednostki białka G_t , związanego z aktywacją fosfodiesterazy cGMP [6]. W wyniku przeniesienia ADP-rybozy z NAD na podjednostkę α białek G_s , następuje permanentna stymulacja zależnych od białek G_s układów efektorowych. Taka modyfikacja białka G_s występuje w przypadku aktywacji cykazy adenylanowej [24].

Wszystkie powyższe reakcje mono-ADP-rybozylacji, katalizowane przez omówione toksyny, mogą być odpowiedzialne za zmianę specyficznych reakcji biochemicznych.

Reakcje ADP-rybozylacji mogą być katalizowane nie tylko egzogennymi czynnikami, takimi jak: toksyny dyfterytu, krztuśca czy cholery, lecz również endogennymi mono-ADP-rybozylotransferazami, które są szeroko rozpowszechnione w większości komórek, a szczególnie w komórkach nerwowych. Proces mono-ADP-rybozylacji odgrywa fundamentalną rolę w utrzymywaniu prawidłowej struktury błon neuronalnych. Białka cytoszkieletu, jak tubulina, mająca znaczenie we wzroście aksonów i dendrytów, czy aktyna, związana z budową receptorów, jak również białko GAP-43, błonowa fosfoproteina ściśle związana z aktyną w błonie neuronalnej, są substratami

dla endogennych ADP-rybozylotransferaz [18]. Mono-ADP-rybozylacja jest ważnym czynnikiem modyfikującym proces przekazywania informacji w ośrodkowym układzie nerwowym, poprzez regulację funkcji białek G oraz sugerowanego udziału tych enzymów w uwalnianiu neurotransmiterów [7].

Wykryto, że proces endogennej mono-ADP-rybozylacji zachodzi zarówno w błonach, jak i cytozolu. Różnice w rozpowszechnieniu tych procesów w różnych częściach mózgu mogą być wynikiem zróżnicowanego poziomu występowania białek, które są substratami w reakcjach ADP-rybozylacji lub różnej ilości ADP-rybozylotransferaz i wymaganych kofaktorów do ich aktywacji [8,27]. Najwyższą aktywność procesów mono-ADP-rybozylacji stwierdzono w hipokampie, podwzgórze i korze mózgu, mniejszą w śródmózgowiu i neostriatum, a najniższą w mózdzku [8].

Enzymy endogenne są wrażliwe na obecność jonów niektórych metali ciężkich, takich jak np. rtęć [18]. W zależności od specyficzności substratowej enzymu wyróżniamy endogenne mono-ADP-rybozylotransferazy, specyficzne dla diftamidu, argininy, asparaginy i cysteiny [24].

ZNACZENIE BIOLOGICZNE PROCESU ADP-RYBOZYLACJI W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH

Znaczenie biologiczne procesu poli-ADP-rybozylacji jest mało poznane. Stwierdzono natomiast, że reakcje poli-ADP-rybozylacji biorą udział w kontroli syntezy białek na poziomie chromosomów. Odgrywają one istotną rolę w metabolizmie NAD, w procesie podziału mitotycznego i różnicowania komórek, w regulacji fosforylacji białek histonowych oraz w kondensacji i dekondensacji chromatyny w cyklu komórkowym [24]. Jednym z metabolitów NAD, ostatnio odkrytym, jest cykliczna ADP-ryboza, która jest endogennym czynnikiem uwalniającym wapń z mikrosomów i może być brana pod uwagę jako nowy przekaźnik drugiego rzędu [11]. Uważa się, że szereg uszkodzeń łańcucha DNA wraz ze spadkiem poziomu komórkowego NAD następuje w wyniku aktywacji procesów poli-ADP-rybozylacji.

Proces mono-ADP-rybozylacji jest odpowiedzialny za modyfikację szeregu procesów biologicznych zachodzących w komórkach. ADP-rybozylacja białek wewnętrznej błony mitochondrialnej może powodować nieodwracalne utlenienie nukleotydów pirymidynowych oraz ich hydrolizę. W konsekwencji tych procesów może dochodzić do zaburzenia funkcji mitochondriów, w tym także funkcji "buforowej" polegającej na wychwytywaniu jonów wapnia z cytozolu komórki [24]. Mono-ADP-rybozylacja reszty diftamidowej białka EF-2 powoduje inhibicję syntezy białek. Synteza białek jest podstawowym procesem w fizjologii komórki i z tego powodu kontrola aktywności procesu ADP-rybozylacji przez endogenne inhibitory, takie jak np. histamina, jest jednym z mechanizmów regulacji syntezy białek poprzez czynnik

EF-2 [14,23]. ADP-rybozylacja tubuliny czy aktyny powoduje zahamowanie polimeryzacji mikrotubul i mikrofilamentów oraz zwiększa proces depolimeryzacji tych białek. Zmiany metabolizmu powyższych białek mogą być przyczyną zwłóknienia neurofibrylarnego w mózgu, procesu charakterystycznego dla choroby Alzheimera [18]. Endogenna mono-ADP-rybozylacja białek G może regulować przekazywanie sygnału receptorowego związanego z aktywacją cykazy adenylanowej, fosfolipaz oraz kanałów jonowych. Przykładowo mono-ADP-rybozylacja białek G_i , przez specyficzną dla cysteiny rybozylotransferazę, zmniejsza wywołaną działaniem norepinefryny inhibicję aktywności cykazy adenylanowej w błonach płytek krwi [6,11,19,24]. Na podstawie badań nad wpływem kortykosteronu na proces ADP-rybozylacji stwierdzono, że ten endogennie zachodzący proces może być modyfikowany przez hormony sterydowe [8].

Stwierdzono, że czynnikiem endogennie aktywującym reakcje ADP-rybozylacji w neuronach jest tlenek azotu (NO) [1,2,3,4,5,9]. Jak wiadomo, NO uwalnia się w warunkach fizjologicznych z argininy, wskutek działania syntazy tlenu azotu, enzymu stymulowanego przez wapń, jak również aktywowanego w wyniku pobudzenia niektórych receptorów, między innymi z układu glutamatergicznego, typu NMDA [4]. Syntaza tlenu azotu występuje w neuronach i komórkach glejowych oraz w komórkach śródbłona naczyń. Tlenek azotu, uwolniony wskutek stymulacji receptorów NMDA, może aktywować szereg dalszych procesów, takich jak np. procesy wolnorodnikowe, wzrost aktywności cykazy guanylowej, procesy S-nitrozylacji oraz jak już wspomniano aktywację procesu endogennej mono-ADP-rybozylacji. Mono-ADP-rybozylacja stymulowana przez NO jest niezależna od cGMP [1,4,8]. Wykazano istnienie trzech różnych form mono-ADP-rybozylotransferaz, pobudzanych przez NO w cytozolu. Wydaje się, że mechanizm aktywacji tych rybozylotransferaz przez NO wymaga interakcji z grupami tiolowymi enzymu [3,5].

Tlenek azotu jako wolny rodnik, aktywując syntazę poli-ADP-rybozy, obniża zapasy energetyczne komórki. Proces ten wymaga wysokoenergetycznego ATP, co może doprowadzać do zaburzeń energetycznych oraz istotnych zmian w materiale jądrowym komórki. W neuronach hipokampa wykazano, że uszkodzenie DNA, wywołane działaniem NO, może być w wystarczającym stopniu eliminowane poprzez zastosowanie inhibitorów poli-ADP-rybozylacji [25]. Na podstawie badań z użyciem inhibitorów zarówno syntazy tlenu azotu, jak i procesu poli-ADP-rybozylacji stwierdzono, że reakcje poli-ADP-rybozylacji, zależne od NO, odgrywają rolę w procesie ekscytotoksycznego uszkodzenia neuronów. W wyniku pobudzenia tych reakcji następują również inne uszkodzenia, jak np. immunologiczne uszkodzenia komórek β trzustki [25].

Tlenek azotu pobudza selektywną ADP-rybozylację szeregu białek, a najlepiej poznano następujące z nich:

– białko cytozolowe o masie 39 kDa, które jest dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), enzymu cyklu glikolitycznego, który katalizuje reakcje

przemiany aldehydu 3-fosfoglicerynowego w 1,3-difosfoglicerynian. W wyniku rybozylacji tego enzymu, następuje inhibicja jego aktywności [1,2,5,9,13] oraz zmiana stanu energetycznego komórki, co może upośledzać np. prawidłową pracę serca i mózgu, dla których proces glikolizy ma szczególne znaczenie. Poza tym sugeruje się, że w wyniku ADP-rybozylacji tego enzymu zaburzona jest jego rola w procesach odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA.

– białko o masie 47 kDa, które jest podjednostką białka G_s . W konsekwencji procesu ADP-rybozylacji tego białka ma miejsce inhibicja aktywności GTP-azy i hydrolizy GTP [27].

– białko o masie 50 kDa, które jest białkiem charakterystycznym dla procesu wzrostu komórki (GAP-43/B50), zwane także neuromoduliną, które bierze udział w regulacji uwalniania neurotransmiterów oraz występuje w dużym stężeniu podczas procesu wzrostu i regeneracji komórek nerwowych. Ufosforylowana forma tego białka gromadzi się w neurytach [8,9,18].

– białko o masie 110 kDa, którego proces ADP-rybozylacji jest obserwowany we wczesnym stadium rozwoju układu nerwowego, a które nie zostało jeszcze dokładnie zidentyfikowane. Istnieją jednak przypuszczenia, że ze względu na podobieństwo w masie, może to być czynnik EF-2 lub jego ADP-rybozylowana forma lub też wapniowo-zależna ATP-aza [27].

Wiadomo, że długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) związane jest z aktywacją receptora NMDA i uwalnianiem tlenu azotu. Ostatnio wykazano, że w rejonie CA1 hipokampa proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego powoduje modyfikację aktywności zależnej od NO ADP-rybozylacji takich białek, jak: GAPDH, G_s i GAP-43/B50. Istnieją dwie hipotezy dotyczące wpływu LTP na proces ADP-rybozylacji zależnej od NO:

- LTP zmniejsza aktywność niektórych NO-zależnych ADP-rybozylotransferaz,
- LTP zmniejsza dostępność specyficznych białek substratowych dla procesu ADP-rybozylacji.

Przyjmuje się, że LTP indukuje proces endogennej ADP-rybozylacji w części presynaptycznej neuronu. Zaobserwowano, że stymulacja elektryczna komórek hipokampa związana z aktywacją receptora NMDA utrzymuje podwyższoną aktywność procesu ADP-rybozylacji nawet w ciągu kilku dni od zaprzestania stymulacji [9].

LITERATURA

- [1] BRÜNE B, LAPETINA EG. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8455–8458.
- [2] BRÜNE B, LAPETINA EG. Properties of a novel nitric oxide-stimulated ADP-ribosyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 1990; **279**: 286–290.
- [3] BRÜNE B, DIMMELER S, VEDIA LM, LAPETINA EG. Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins. *Life Sci* 1994; **54**: 61–70.

- [4] DIMMELER S, BRÜNE B. L-Arginine stimulates an endogenous ADP-ribosyltransferase. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; **178**: 848–855.
- [5] DIMMELER S, LOTTSCHEIDT F, BRÜNE B. Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16771–16774.
- [6] DOLPHIN AC. Nucleotide binding proteins in signal transduction and disease. *TINS* 1987; **10**: 53–57.
- [7] DAWSON TM, DAWSON VL, SNYDER SH. A novel neuronal messenger molecule in brain. The free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; **32**: 297–311.
- [8] DUMAN RS, TERWILLIGER RZ, NESTLER E J. Endogenous ADP-ribosylation in brain: initial characterization of substrate proteins. *J Neurochem* 1991; **57**: 2124–2132.
- [9] DUMAN RS, TERWILLIGER RZ, NESTLER EJ. Alterations in nitric oxide-stimulated endogenous ADP-ribosylation associated with long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurochem* 1993; **61**: 1542–1545.
- [10] JACQUEMIN C, THIBOUT H, LAMBERT B, CORREZE C. Endogenous ADP-ribosylation of G_s subunit and autonomous regulation of adenylate cyclase. *Nature* 1986; **323**: 182–184.
- [11] KATADA T, UI M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of membrane protein. *Proc Natl Acad Sci* 1982; **79**: 3129–3133.
- [12] KIM H, JACOBSON EL, JACOBSON MK. Synthesis and degradation of cyclic ADP-ribose by NAD glycohydrolases. *Science* 1993; **261**: 1330–1333.
- [13] KOTS A, YA, SKURAT AV, SERGIENKO E A, BULARGINA TV, SEVERIN E S. Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono(ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *FEBS* 1992; **300**: 9–12.
- [14] LEE H, IGLEWSKI WJ. Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and *Pseudomonas* toxin A. *Proc Natl Acad Sci* 1984; **81**: 2703–2707.
- [15] MAEHAMA T, TAKAHASHI K, OHOKA Y, OHTSUKA T, UI M, KATADA T. Identification of a botulinum C3-like enzyme in bovine brain that catalyzes ADP-ribosylation of GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 10062–10065.
- [16] NESTLER EJ, ERDOS JJ, TERWILLIGER R, DUMAN RS, TALLMAN J. F. Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 1989; **476**: 230–239.
- [17] NOMURA F, NODA M. Stimulation of mono-ADP ribosylation in rat liver plasma membranes after long-term alcohol intake. *Hepatology* 1993; **18**: 870–873.
- [18] PALKIEWICZ P, ZWIERS H, LORSCHIEDER FL. ADP-ribosylation of brain neuronal proteins is altered by in vitro and in vivo exposure to inorganic mercury. *J Neurochem* 1994; **62**: 2049–2052.
- [19] RIBEIRO-NETO F A, MATTERA R, HILDERBRANDT JD, CODINA J., FIELD J B, BIRNBAUMER L, SEKURA RD. ADP-ribosylation of membrane components by pertussis and cholera toxin. *Meth Enzymol* 1985; **109**: 566–567.
- [20] STERNWEIS PC, ROBISHAW JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 1984; **259**: 13806–13813.
- [21] TAKEI Y, KUROSU H, TAKAHASHI K, KATADA T. A GTP-binding protein in rat liver nuclei serving as the specific substrate of pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 5085–5089.
- [22] TAKEI Y, TAKAHASHI K, KANAHO Y, KATADA T. Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of GTP-binding proteins with digoxigenin-conjugated NAD. Identification of the proteins in plasma membranes and nuclei. *FEBS Letters* 1994; **338**: 264–266.
- [23] TAMIR A, GILL DM. ADP-ribosylation by cholera toxin of membranes derived from brain modifies the interaction of adenylate cyclase with guanine nucleotides and NaF. *J Neurochem* 1988; **50**: 1791–1797.
- [24] UEDA K, HAYAISHI O. ADP-ribosylation. *Ann Rev Biochem* 1985; **54**: 73–100.

- [25] WALLIS R A, PANIZZON KL, HENRY D, WASTERLAIN C G. Neuroprotection against nitric oxide injury with inhibitors of ADP-ribosylation. *Neuroreport* 1993; **5**: 245–248.
- [26] VAN DOP C, YAMANAKA G, STEINBERG F, SEKURA RD, MANCLARK CR, STRYER L. ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors. *J Biol Chem* 1984; **259**: 23–26.
- [27] WILLAMS MB, LI X, GU X, JOPE RS. Modulation of endogenous ADP-ribosylation in rat brain. *Brain Res* 1992; **592**: 49–56.
- [28] VEZZANI A, SPARVOLI S, RIZZI M, ZINETTI M, FRATELLI M. Changes in the ADP-ribosylation status of some hippocampal proteins are linked to kindling progression. *Neuroreport* 1994; **5**: 1217–1220.
- [29] ZHANG J, DAWSON VL, DAWSON TM, SNYDER SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; **263**: 687–689.

Otrzymano: 27.02.1995 r.

Przyjęto: 15.05.1995 r.

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

IZOLOWANIE GAMETOFITÓW I GAMET ŻEŃSKICH U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH (*ANGIOSPERMAE*)

ISOLATION OF MEGAGAMETOPHYTES AND FEMALE GAMETES IN ANGIOSPERMS

Marta LIBIK, Lesław PRZYWARA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki Uniwersytetu
Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie. Ze względu na rolę, jaką odgrywa gametofit żeński w procesie podwójnego zapłodnienia, izolowanie żywych woreczków zalążkowych oraz komórek gametofitowych stało się ważnym celem embriologii eksperymentalnej. Możliwość prowadzenia eksperymentów na wyizolowanych gametofitach i/lub gametach żeńskich spowodowała rozwój nowych kierunków badań embriologicznych związanych zwłaszcza ze zjawiskiem zapłodnienia, badaniem mechanizmu rozpoznawania się gamet przeciwnej płci czy też analizą biochemiczną i genetyczną gametofitu i gamet żeńskich. W pracy zebrano najważniejsze informacje dotyczące stosowanych współcześnie technik izolowania woreczków zalążkowych i komórek gametofitowych oraz dokonano krótkiego podsumowania uzyskanych wyników. Dyskutowane są również perspektywy, jakie pojawiły się dzięki opracowaniu techniki izolowania żywych gametofitów i gamet żeńskich.

Słowa kluczowe: *Angiospermae*, izolowanie woreczków zalążkowych i gamet żeńskich, zapłodnienie.

Summary. The isolation of female gametophytes and gametes in higher plants provides a new approach for better understanding fertilization and embryological development allowing detailed investigations to be carried out from a cellular, biochemical and molecular perspective. Isolated embryo sacs provide a unique material suitable for studying various aspects of megagametophyte behaviour, including cytoskeletal elements and organelles during fertilization and developmental events, and for studies of the relationships of subcellular components. Over the past few years, techniques to isolate gametophytes and gametes from the paternal and maternal structures have been developed and *in vitro* fusion of gametes have been achieved; these techniques are becoming increasingly more important in modern experimental plant embryology. In the paper the methods of isolation of female gametophytes and gametes are described. Some results and prospects are also discussed.

Key words: *Angiospermae*, embryo sac, megagametophyte, egg cell (isolation), double fertilization

WSTĘP

Gametofitem żeńskim u roślin okrytonasiennych jest woreczek zalążkowy, który u większości przebadanych do tej pory przedstawicieli *Angiospermae* składa się z siedmiu komórek. Oprócz komórki centralnej, dwóch synergid i trzech komórek antypod woreczek zalążkowy zawiera komórkę jajową – gametę żeńską, która posiada haploidalny genom oraz zdolność do łączenia się z gametą męską i formowania nowego organizmu. Ze względu na wymienione wyżej cechy, gametofit żeński od dawna stanowił obiekt dużego zainteresowania biologów próbujących zapoznać się z organizacją i funkcjonowaniem tej struktury. W wyniku licznych badań dysponujemy obecnie stosunkowo dużą liczbą danych na temat struktury i ultrastruktury woreczka zalążkowego (podsumowanie [16, 37]). Znacznie mniej natomiast jest informacji dotyczących procesów, jakie mają miejsce podczas zapłodnienia i wczesnych etapów embriogenezy. Niewiele również wiemy na temat fizjologii zróżnicowanych funkcjonalnie komórek gametofitu żeńskiego. Główną przyczyną takiego stanu wiedzy jest lokalizacja gametofitu żeńskiego, który jest głęboko ukryty wśród tkanek zalążka, co bardzo utrudnia jego badanie. Opracowanie w ostatnich latach szeregu technik izolowania woreczków zalążkowych i komórek gametofitowych umożliwiło prowadzenie różnorodnych badań eksperymentalnych i przyczyniło się do rozwiązania niektórych ważnych kwestii embriologicznych. Dostęp do materiału roślinnego w postaci wyizolowanych gametofitów czy też gamet żeńskich otworzył bowiem możliwości:

- szczegółowych obserwacji procesu zapłodnienia *in vitro*,
- badania mechanizmu rozpoznawania się gamet przeciwnej płci, ich adhezji oraz fuzji,
- analizy materiału genetycznego gamet,
- zastosowania inżynierii genetycznej w połączeniu z procesem zapłodnienia *in vitro*.

Dane pochodzące z tego typu doświadczeń pozwoliłyby lepiej poznać budowę i funkcjonowanie jednej z najważniejszych struktur roślin kwiatowych, jaką jest woreczek zalążkowy.

TECHNIKI IZOLOWANIA WORECZKÓW ZALĄŻKOWYCH

Pierwsze metody izolacji woreczków zalążkowych dotyczyły materiału utrwalonego i zostały opracowane dla rodzajów *Nicotiana* i *Petunia* przez Bradleya [3]. Woreczki zalążkowe uzyskiwano poprzez delikatne naciskanie pod szkiełkiem nakrywkowym utrwalonych, hydrolizowanych w HCl zalążków. Następne próby podejmowano przy zastosowaniu techniki maceracji enzymatycznej zalążków. Z nadtrawionych zalążków wyłuskiwano woreczki zalążkowe przy użyciu lupy i igieł preparacyjnych [8, 11].

Na początku lat siedemdziesiątych grupa badaczy rosyjskich rozpoczęła doświadczenia nad możliwością zastosowania enzymów do izolowania woreczków zalążkowych utrwalonych i żywych. Z powodzeniem używali oni pektynazy i celulazy [7], a także enzymów z soku żołądkowego ślimaka *Helix pomatia* do wyizolowania gametofitów żeńskich u ponad 10 gatunków *Angiospermae* [41, 42]. Od tego czasu powszechnie stosuje się techniki maceracji enzymatycznej. W latach osiemdziesiątych wiele sukcesów w izolowaniu nie tylko całych gametofitów żeńskich, ale również komórek gametofitowych, w tym komórki jajowej, odnieśli badacze chińscy [13, 56–64]. Ostatnio metoda maceracji enzymatycznej jest także z powodzeniem stosowana w wielu ośrodkach naukowych w Europie, Kanadzie i USA [14–19, 24–26, 31, 48–52].

METODY WSPÓŁCZEŚNIE STOSOWANE

Mimo iż metody izolowania żywych gametofitów i gamet żeńskich są coraz szerzej stosowane, u niewielu gatunków roślin udało się uzyskać pozytywne rezultaty. Do tej pory nie opracowano jeszcze uniwersalnej metody, którą można wykorzystać do uzyskiwania gametofitów żeńskich u większości gatunków należących do *Angiospermae*. Obecnie znanych jest około 46 gatunków roślin, dla których opracowano techniki izolowania woreczków zalążkowych (tab. 1).

Wybór rośliny do eksperymentu jest jednym z czynników decydujących o powodzeniu doświadczenia. Takie cechy embriologiczne, jak wielkość zalążków, ich duża liczba w zalążni, czy stosunkowo niewielka ilość tkanki sporofitowej otaczającej woreczek zalążkowy, bardzo ułatwiają przeprowadzenie doświadczenia.

Ogólnie techniki izolowania gametofitów i gamet żeńskich można podzielić na trzy grupy:

- 1) techniki mikromanipulacyjne,
- 2) techniki maceracji enzymatycznej,
- 3) techniki maceracji enzymatycznej w połączeniu z mikromanipulacją.

Metody z grupy pierwszej polegają na wyłuskiwaniu woreczków zalążkowych bezpośrednio z zalążków. Znajdują one zastosowanie głównie do materiału utrwalonego, chociaż niektórzy badacze uzyskiwali tą metodą izolowane woreczki zalążkowe również z materiału świeżego [1, 12]. Technika mikromanipulacji umożliwia uzyskanie izolowanych gametofitów, których struktura i kształt pozostają niezmienione na skutek działania czynników chemicznych. Jest to jednak metoda bardzo czasochłonna oraz wymagająca od eksperymentatora dużej sprawności manualnej. Z tych względów techniki mikromanipulacyjne nie są stosowane zbyt często. Należy pamiętać, że izolowanie gametofitów czy gamet żeńskich, to z reguły dopiero pierwszy, wstępny etap badań eksperymentalnych.

TABELA I. Zestawienie dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie izolowania woreczków zalążkowych oraz obserwacji przeprowadzonych na uzyskanym materiale (objaśnienia skrótów znajdują się pod tabelą).

Gatunek	Izolowany materiał WZ	Materiał i metoda	Wybrane dane dotyczące technik i prowadzonych obserwacji	Pozycja w spheric literatury
<i>Adenophora axilliflora</i>	+	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje procesu zapłodnienia, zygoty i endospermy	[56]
<i>Alopecurus alpinus</i>	+	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
<i>Antirrhinum majus</i>	+	ME; WT; materiał świeży i utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[60-63]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	ME; ZG; materiał utrwalony	badanie cytoskieletu w różnych stadiach rozwoju WZ; y megasporogenezy, megagametofitogenezy oraz po zapłodnieniu w stadium zygoty lub prazarodka	[53, 54, 55]
<i>Arctagrostis arundinacea</i>	+	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
<i>Arrapa belladonna</i>	+	ME; ZG; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju na poziomie MŚ	[27]
<i>Belamcanda chinensis</i>	+	ME; ZG; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju n na poziomie MŚ	[27]
<i>Braşsica campestris</i>	+	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[59]
<i>Cañca papaya</i>	+	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju na poziomie MŚ	[36]
<i>Deschampsia glauca</i>	+	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
<i>Duñonitia fisheri</i>	+	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
<i>Festuca</i> sp.	+	MM; materiał świeży		[41, 42]
<i>Galanthus nivalis</i>	+	ZG; materiał utrwalony	szczegółowe obserwacje procesu zapłodnienia	[8]
<i>Gasteria verrucosa</i>	+	MM; ME; materiał utrwalony	obserwacje cytoskieletu aktywnego podczas megasporogenezy	[2]
<i>Glycine max</i>	+		ustalenie poziomu ploidalności i zawartości DNA w jądrach zarodka i endospermy	[6]
<i>Helianthus annuus</i>	+	ME; WT; materiał świeży	obserwacje poszczególnych etapów procesu zapłodnienia	[61]
	+	ME; WT; materiał świeży i utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[58, 62]
<i>Hevea brasiliensis</i>	+	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[36]
<i>Hierochloe</i> sp.	+	MM; materiał świeży		[41, 42]
<i>Hordeum vulgare</i>	+	MM; materiał świeży		[1, 20]
	-		hodowla in vitro izolowanych mechanicznie protoplastów komórek jajowej oraz zygot	[12]
<i>Jasione montana</i>	+	MM; materiał świeży	szczegółowe obserwacje procesu zapłodnienia	[8]
<i>Lilium longiflorum</i>	+	ME; WT; materiał świeży	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[51]
<i>Lolium perenne</i>	-	ME; WT; materiał świeży	obserwacje izolowanych gamet na poziomie MŚ	[47, 48]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	ME; WT; materiał świeży i utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[28]
<i>Malus</i> sp.	+	MM; materiał świeży i utrwalony	zmiany cytologiczne w jądrach endospermy po naświetlaniu promieniami gamma	[34]

Gatunek	Izolowany materiał WZ	PKG	Materiał i metoda	Wybrane dane dotyczące technik i prowadzonych obserwacji	Pozycja w spi- sie literatury
<i>Malus sp.</i>	+	-	ME; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[7]
	+	-	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych MŚ na poziomie MŚ	[59]
	+	+	ME; ZG; materiał świeży i utrwalony	PKG na poziomie MŚ	[13]
	+	-	ME; materiał świeży	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ[40]	[61, 63]
	+	+	ME; WT; materiał świeży i utrwalony	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[17]
	+	+	ME; MM; materiał świeży	obserwacje izolowanych WZ i PKG na poziomie MŚ	[18]
	+	+	ME; MM; materiał świeży i utrwalony	obserwacje procesu degeneracji synergid	[19]
	+	+	ME; SO; materiał świeży	opracowanie nowej techniki szoku osmotycznego do izolowania WZ i PKG oraz obserwacje fuzji protoplastów komórki jajowej synergid[43]	[57]
	+	+	ME; WT; materiał świeży	obserwacja różnych stadiów rozwojowych WZ na poziomie MŚ	[19]
	+	-	ME; MM; materiał utrwalony	obserwacje zmian w cytoskieletcie w zapłodnionych WZ w czasie degeneracji synergid	[27]
<i>Oenothera odorata</i>	+	-	ME; ZG; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju na poziomie MŚ	[11]
	+	-	ME; MM; materiał utrwalony		[60, 63]
	+	-	ME; WT; materiał utrwalony		[3]
	+	+	MM; ZG; materiał utrwalony	badanie izolowanych WZ i PKG; na poziomie MŚ	[49]
	+	+	ME; WT; materiał świeży	wzór rozmieszczenia jonów Ca ²⁺ oraz ich receptora-kalmoduliny w komórkach izolowanych WZ	[46]
	+	-	ME; WT; materiał świeży	obserwacja izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju oraz próby hodowli <i>in vitro</i> izolowanych struktur	[45]
	+	-	ME; ZG; materiał utrwalony		[41, 42]
	+	-	ME; ZG; materiał utrwalony		[27]
	+	+	ME; MM; materiał utrwalony i świeży	badanie izolowanych WZ i PKG przy użyciu MŚ i ME	[14]
	+	+	ME; MM; ZG; materiał utrwalony	badanie izolowanych WZ i protoplastów komórek jajowych na poziomie ME	[39]
<i>Poa sp.</i>	+	+	ME; MM; materiał utrwalony	organizacja izolowanych WZ i komórki jajowej przed i po zapłodnieniu	[15]
	+	-	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
	+	-	ME; MM; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ przed i po zapłodnieniu na poziomie MŚ	[30]
<i>Rudbeckia laciniata</i>	+	-	ME; materiał utrwalony		[41, 42]

cd tab. I

Gatunek	Izolowany materiał		Materiał i metoda	Wybrane dane dotyczące technik i prowadzonych obserwacji	Pozycja w spisie literatury
	WZ	PKG			
<i>Santalum album</i>	+	-	MM; materiał utrwalony	obserwacja izolowanych WZ przed i po zapłodnieniu na poziomie MŚ	[35]
<i>Secale cereale</i>	+	-	MM; materiał świeży	obserwacje izolowanych WZ na poziomie MŚ	[1]
<i>Sesamum indicum</i>	+	-	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacje mezozy w załączku w preparatach	[64]
<i>Solanum tuberosum</i> x <i>S. phureja</i>			ME; materiał utrwalony	rozniotowych barwionych acetokarminem	[21]
<i>Torenia fournieri</i>	+	-	MM; materiał świeży	obserwacje procesu zapłodnienia	[8]
	+	+	ME; materiał świeży	obserwacje izolowanych WZ i PKG na poziomie MŚ	[31]
	-	-	MM; materiał świeży	mikroinjekcja komórek plennikowych do WZ	[22]
<i>Trisetum spicatum</i>	+	-	ME; materiał utrwalony		[41, 42]
<i>Triticosecale</i>	+	-	MM; materiał świeży		[1]
<i>Triticum aestivum</i>	+	-	MM; materiał świeży		[1]
	-	+	MM; materiał świeży	hodowla <i>in vitro</i> izolowanych mechanicznie protoplastów komórki jajowej oraz zygo	[12]
	-	+	MM; materiał świeży	badanie żywotności i morfologii izolowanych mechanicznie komórek jajowych	[23]
<i>Vanilla fragrans</i>	+	-	ME; ZG; materiał utrwalony	obserwacje izolowanych WZ w różnych stadiach rozwoju na poziomie MŚ	[27]
<i>Vicia faba</i>	+	-	ME; WT; materiał utrwalony	obserwacja izolowanych WZ na poziomie MŚ	[59, 63]
<i>Zea mays</i>	+	-	ME; WT; materiał świeży i utrwalony	badanie izolowanych WZ na poziomie MŚ i ME	[40, 52]
	+	-	ME; materiał świeży	badanie izolowanych WZ na poziomie MŚ i ME oraz ich fizjologii i biochemii	[4]
	-	+	ME; WT; materiał świeży	zapłodnienie <i>in vitro</i> oraz przenoszenie organelli cytoplazmatycznych przy wykorzystaniu procesu elektrofuzji izolowanych gamet	[24, 25]
	+	+	ME; MM; materiał świeży	zapłodnienie <i>in vitro</i> i hodowla rozwijającej się zygoty aż do uzyskania dojrzałej rośliny	[26]
	+	-	MM; materiał świeży	hodowla <i>in vitro</i> izolowanych, zapłodnionych WZ w stadium zygoty i dwukomórkowego prazarodka	[32]
	+	+	ME; MM; materiał świeży	obserwacje procesu kariogamii po elektrofuzji izolowanych gamet	[9]
	-	+	ME; MM; materiał świeży	opracowanie systemu zapłodnienia <i>in vitro</i> pozwalającego a adhezję i fuzję izolowanych gamet bez działania czynników zewnętrznych	[10]
	+	-	ME; MM; materiał świeży	mikroinjekcja jąder plennikowych do komórki jajowej izolowanych WZ	[29]
	+	-	MM; materiał utrwalony	szczegółowy opis poszczególnych etapów procesu zapłodnienia	[33]

Wykaz stosowanych skrótów: PKG – protoplasty komórek gametofitowych; ME – maceracja enzymatyczna; MM – mikromanipulacja; SO – szok osmotyczny; WT – wytrząsanie; WZ – woreczki załączkowe; ZG – zgniatanie.

Technika maceracji enzymatycznej jest łatwiejszym sposobem izolowania woreczków zalążkowych i/lub komórek gametofitowych. Podstawą tej metody jest zastosowanie kombinacji enzymów, które powodują delikatne trawienie ścian komórek otaczających woreczek zalążkowy, a w konsekwencji uwalnianie woreczka. Stosowane procedury maceracji enzymatycznej różnią się w doborze parametrów (tab. 2), z których najważniejsze są:

- skład i stężenie enzymów,
- temperatura i czas inkubacji zalążków,
- pH i potencjał osmotyczny roztworu izolującego i stabilizującego.

Spośród enzymów, które używano do maceracji tkanek zalążka, najbardziej skuteczne są celulaza i pektynaza [47, 51, 52, 56, 59, 61–63]. Niektórzy badacze stosowali z równym powodzeniem mieszaniny zawierające hemicelulazę [14], pektoliazę [31], β -glukuronidazę [39], ksylozydazę [40], snailazę [41, 42], celulizynę [43], dricelazę [49] oraz cytohelikazę [50].

Uwolnione na drodze maceracji enzymatycznej woreczki zalążkowe oddziela się od komórek tkanki sporofitowej stosując filtrowanie przez filtry nylonowe [52], wirowanie [58] lub techniki mikromanipulacyjne, np. “odławianie” wyizolowanych gametofitów żeńskich przy pomocy mikropipet. Wyizolowane woreczki zalążkowe lub komórki gametofitowe są następnie przenoszone do roztworu stabilizującego, który różni się od roztworu izolującego jedynie brakiem enzymów.

Żywotność uzyskanego drogą izolacji enzymatycznej materiału wydaje się być uzależniona przede wszystkim od czasu traktowania zalążków enzymami. Im krótszy czas inkubacji, tym większy procent żywych, wyizolowanych woreczków zalążkowych.

Odczyn roztworów izolujących waha się zawsze w granicach pH 5–6. Wartości takie z jednej strony zapewniają optimum aktywności enzymów; z drugiej strony mogą jednak powodować zaburzenia w fizjologii komórek. Dlatego też niektórzy badacze stosują techniki maceracji enzymatycznej w połączeniu z mikromanipulacją, co pozwala na maksymalne skrócenie czasu trawienia, a tym samym pozwala uzyskać większy procent żywych gametofitów i/lub komórek gametofitowych [9, 10, 14, 17, 18, 26, 29].

Potencjał osmotyczny roztworu izolującego, a także roztworu stabilizującego, w którym przechowywane są wyizolowane struktury również odgrywa istotną rolę w utrzymaniu żywotności. Do najczęściej stosowanych stabilizatorów osmotycznych należą: mannitol, sorbitol i sacharoza. Optymalne wartości potencjału osmotycznego muszą być dobierane dla poszczególnych gatunków roślin.

Żywotność wyizolowanych gametofitów czy też komórek gametofitowych ocenia się najczęściej przy zastosowaniu barwników fluorescencyjnych, np. FDA (dwoocjan fluoresceiny). Obserwacje ruchów cytoplazmy czy też reakcje osmotyczne są również dobrymi wskaźnikami żywotności badanego materiału. Jak dotychczas najdłuższy okres żywotności izolowanych woreczków zalążkowych zanotowano dla gatunku

Nicotiana tabacum [57]. Ruchy cytoplazmy w komórkach wyizolowanych, nienaruszonych gametofitów żeńskich obserwowano przez okres 1 tygodnia od czasu izolacji. Wydłużenie żywotności izolowanych struktur wydaje się być w tym przypadku spowodowane odpowiednim doborem pożywki stabilizującej. Użyto tutaj stosunkowo bogatej pożywki MS, podczas gdy w innych eksperymentach pożywki stabilizujące były z reguły znacznie uboższe.

Problemem w stosowaniu techniki izolowania woreczków zalążkowych jest nie tylko brak jednej, uniwersalnej metody, dzięki której można by izolować gametofity żeńskie u większości roślin należących do *Angiospermae*, ale również niemożność zastosowania jednej techniki w stosunku do osobników tego samego gatunku. Niestety stwierdzenie, że dla danego gatunku opracowano technikę izolowania żywych woreczków zalążkowych nie oznacza jeszcze pełnego sukcesu. Jak wynika z powyższych rozważań, powodzenie metody może zależeć od bardzo wielu czynników. Wydaje się, że decydującym krokiem do otrzymania wyizolowanych, żywych woreczków zalążkowych jest odpowiedni dobór rośliny. Przy doborze materiału roślinnego należy zwracać uwagę nie tylko na cechy embriologiczne (liczba i wielkość zalążków, ilość tkanki sporofitowej), ale również na stan fizjologiczny rośliny uzależniony od warunków uprawy oraz na jej genotyp.

CHARAKTERYSTYKA IZOLOWANYCH WORECZKÓW ZALĄŻKOWYCH I KOMÓREK GAMETOFITOWYCH

CHARAKTERYSTYKA CYTOLOGICZNA

Struktura izolowanych woreczków zalążkowych została opisana dla większości badanych gatunków roślin. Z uzyskanych obserwacji wynika, że organizacja wyizolowanego gametofitu żeńskiego pozostaje niezmienną. Gruszkowaty, wydłużony kształt megagametofitu nie ulega zmianie, a komórki gametofitowe pozostają na właściwych im pozycjach, takich samych jak w warunkach *in vivo*. W doniesieniach na temat struktury izolowanych woreczków zalążkowych u *Lilium longiflorum* [51] oraz *Plumbago zeylanica* [14] podkreślany jest fakt braku komórek antypod i/lub zmiany charakterystycznego kształtu komórek gametofitowych, które pod wpływem działania enzymów stają się bardziej zaokrąglone.

Na poziomie mikroskopu świetlnego technika maceracji enzymatycznej zalążków w różnych stadiach rozwoju i uzyskany tą drogą materiał roślinny w postaci izolowanych struktur znalazł zastosowanie głównie do badań megasporogenezy i różnych etapów rozwoju gametofitu żeńskiego [27, 53, 64], podwójnego zapłodnienia [15, 58] oraz wczesnych stadiów embriogenezy [15, 54]. Niewątpliwą korzyścią płynącą z

TABELA 2. Szczegółowe zestawienie metod izolowania woreczków zalążkowych u *Angiospermae* (objaśnienia skrótów znajdują się pod tabelą)

Gatunek	Medium izolacyjne/utrwalacz ^a	Stosowane enzymy ^b	Czas i temperatura inkubacji	Pozycja w spisie literatury
<i>Adenophora axilliflora</i>	FPA	3% P; 2% C	2,5–3,5 godz.; 28–30°C	[56]
<i>Alopecurus alpinus</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Antirrhinum majus</i>	FPA; 2–8% sacharoza; 0,2% PDS, pH 5,0–5,5	2% P; 1,5% C	2–3 godz.; 28–30°C	[60, 63]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PFA; PM5E bufor, pH 6,8	2% Cl; 2% Mc	50 min; TP	[53, 54, 55]
<i>Arctagrostis arundinacea</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Atropa belladonna</i>	FAA/FPA/Carnoy	2% Dri	3–6 godz.; 28°C	[27]
<i>Belamcanda chinensis</i>	FAA/FPA/Carnoy	2% Dri	3–6 godz.; 28°C	[27]
<i>Brassica campestris</i>	FPA	2,5% P; 2,5–3% C	5 godz.; 28–30°C	[59]
<i>Carica papaya</i>	FAA/FPA	3% P; 3% C lub 3–4% Sn	4–6 godz.; 28–30°C	[36]
<i>Deschampsia glauca</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>DuPontia fisheri</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Festuca</i> sp.	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Galanthus nivalis</i>	1% agar; 5% sacharoza			[8]
<i>Gastria verrucosa</i>	0,1M Pipes			[2]
<i>Glycine max</i>	10% formalina; 5% mannitol	5% C; 5% P; 5% mannitol 3 godz.; 37°C		[6]
<i>Helianthus annuus</i>	7–14% sacharoza; 0,2% PDS, pH 5,0–5,5	2–3% P; 2–3% C; 1–2% Sn; 0,4–1% Pcl	2–6 godz.; 28–30°C	[62]
<i>Hevea brasiliensis</i>	10% sacharoza; 0,02% KH ₂ PO ₄ ; 83 µg/ml CaCl ₂	3% P; 2% C; 2% Sn; 1% Pcl 4–5 godz.; 28°C		[58]
<i>Hierchoe</i> sp.	FAA/FPA	3% P; 3% C lub 3–4% Sn 4–6 godz.; 28–30°C		[36]
<i>Hordeum vulgare</i>	AO GHPT bufor, pH 8,4 Kao 90	Sn nieznany skład	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Jasione montana</i>	1% agar; 5% sacharoza			[12]
<i>Lilium longiflorum</i>	4% GA/3,8% mannitol; 0,05% CaCl ₂ , pH 5,2	1,5% P; „4% Pcl; „6% C; 0,8% H 1–5 godz.; 30°C		[8]
<i>Lolium perenne</i>	9% sacharoza; 360 mOsmol/kgH ₂ O, pH 5,0 CPW; 0,7 M mannitol; 5 mM MES; 0,5% BSA, pH 6,0	C; P 1,5% P; 0,2% Pcl; 0,3% C; 0,3% H	nieznane parametry 15 min; 24°C lub 40 min; 4°C	[51] [47] [48]
<i>Lycopersicon esculentum</i>	0,1% MES; 8% mannitol	1% P; 2% C	2 godz.; 30°C	[28]
<i>Malus</i> sp.	AO; 0,2 M PO ₄			[34]

cd. tab. 2

Gatunek	Medium izolacyjne/utrwalacz ^a	Stosowane enzymy ^b	Czas i temperatura inkubacji	Pozycja w spisie literatury
<i>Nicotiana</i> sp.	AO	Sn		[3]
	AO			[7]
	FPA	2,5% P; 2,5-3% C	3-6 godz; 28-30°C	[59]
	0,65 M mannitol; 0,25% PDS	2-3% C; 2-3% P	4-8 godz; 28°C	[13]
	0,2 M mannitol	2% P; 2% Dri; 0,5% Xy	nieznane parametry	[40]
	FPA/0,2% PDS; 7-14% sacharoza	2-3% P; 2-3% C;	2-6 godz; 28-30°C	[61, 62, 63]
	PMEG bufor/PFA	1-2% Sn; 0,4-1% Pcl		
	0,65 M sorbitol	2% Cl; 2% P	2-6 godz; 28-30°C	[17]
	13% mannitol	0,5% C; 0,5% P	30 min; 30°C	[18]
	MS medium, pH 5,7	1,0-1,5% C; 0,5% M;	1 godz; TP	[43]
	1,5% GA; 2% PFA; 0,1 M PO ₄ , pH 7	2% Cl; 0,05% Dri	2,5 godz;	[57]
	FPA/FAA/Carnoy	2% P; 2% C	3-4 godz; 30°C	[19]
<i>Oenothera odorata</i>	AO	2% Dri	3-6 godz; 28°C	[27]
<i>Paspalum</i> sp.	FPA	Pectinol 100-D	3-5 godz; TP	[11]
<i>Pantolonia</i> sp.	AO	1-3% P; 1-3% C	3-6 godz; 28-30°C	[59, 63]
<i>Pepernia hybrida</i>	AO			[3]
	0,1% MES; 8% mannitol; 10% BKM, pH 6,5	3% Dri	2 godz; 30°C	[49]
	jak wyżej	3% Dri	2 godz; 30°C	[46]
	jak wyżej	3% Dri	2 godz; 30°C	[45]
<i>Phippisia aloida</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Platyodon grandiflorum</i>	FPA/FAA/Carnoy	2% Dri	nieznane parametry	[27]
<i>Plumbago zeylanica</i>	FPA; 0,2 M Tris-HCl, pH 4,7/ GA-FA; Pipes, pH 6,8	3% C; 3% H; 3% P;	1 godz; 37°C(materiał utrwalony)	[14]
	0,6 M sorbitol; 4% D-glukoza; 0,05 M CaCl ₂ , pH 5,8	1% β-Gluc	2 godz; TP (materiał świeży)	[14]
	GA; 0,067 M PO ₄ , pH 6,8/ GA-PFA 0,1 M Pipes, pH 7,4	2% C; 2% H; 2% P;c		
	GA-PFA; 0,1 M Pipes, pH 6,8	0,5% Pcl; 1% β-Glu	0,5-1,0 godz; 37°C	[39]
		C; P; β-Gluc; H; Pcl		
		3% C; 3% H; 3% P;	1 godz.	[15]
		1% β-Gluc		
<i>Poa</i> sp.	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]

Gatunek	Medium izolacyjne/utrwalacz ^a	Stosowane enzymy ^b	Czas i temperatura inkubacji	Pozycja w spisie literatury
<i>Primula</i> sp.	AO	P		[30]
<i>Rudbeckia laciniata</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Santalum album</i>	FAA			[35]
<i>Secale cereale</i>	GHPT bufor; pH 8,4	nieznany skład	nieznane parametry	[1]
<i>Sesamum indicum</i>	FPA	3% P; 1% C	3–6 godz.; 28–30°C	[63]
	jak wyżej	jak wyżej	jak wyżej	[64]
<i>Solanum tuberosum</i>	AO/PA	10% P; 1,5% C	4–5 min; 37°C	[21]
x <i>S. phureja</i>				
<i>Torenia fournieri</i>	1% agar; 5% sacharoza 0,7 M mannitol lub 0,57 M mannitol; 20% woda morską	2% C; 0,5% Mc; 1% H; 0,5% Pcl	5 godz.; TP	[8] [31]
	CC- medium			[22]
<i>Trisetum spicatum</i>	AO	Sn	nieznane parametry	[41, 42]
<i>Triticosecale</i>	GHPT bufor, pH 8,4	nieznany skład	nieznane parametry	[1]
<i>Triticum aestivum</i>	GHPT bufor, pH 8,4 Kao 90 medium	nieznany skład	nieznane parametry	[1] [12]
<i>Vanilla fragrans</i>	620 mM mannitol, pH 5,2	2% Dri	3–6 godz.; 28–30°C	[23]
<i>Vicia faba</i>	FPA/FAA/Carnoy	2,5% P; 2,5–3% C	3–6 godz.; 28–30°C	[27]
<i>Zea mays</i>	FPA GA, PO ₄ GA, PO ₄ / 9% sacharoza, pH 4,5–5,0	Ch; P; C; H; Pcl 2% Ch; 3% P; 2% Cl lub H; 1% Pc	1–3 godz. 1–3 godz.; 28°C	[59, 63] [50] [52]
	nieznany skład		nieznane parametry	[4]
	570 mOsmol/kg H ₂ O mannitol, pH 5,0	0,75% P; 0,25% Pcl; 0,5% H; 0,5% C	50 min; 24°C	[24, 25]
	540 mOsmol/kg H ₂ O mannitol, pH 5,0 jak wyżej	jak wyżej	30 min; 24°C 30 min; 24°C	[9] [26]
	NBM medium			[32]
	550 mOsmol/kg H ₂ O mannitol, pH 5,0 NBM medium; 350 mM sacharoza, pH 5,8	1% P; 0,33% Pcl; 0,65% Mc; 0,67% C 0,5% M; 0,5% C; 0,75% P; 0,25% C	25 min; TP C 25 min; TP C 30 min; 4°C	[10] [29]

Wykaz stosowanych skrótów: ^aAO – alkohol octowy; BKM – pożywka Brewbaka i Kwacka; BSA – białko z surowicy krwi wobi; CC – pożywka 0,57 M mannitol, 20% woda morską; CPW – KH₂PO₄, KNO₃, CaCl₂·2H₂O, MgSO₄·7H₂O, KJ, CuSO₄·5H₂O, pH 5,5–5,8; FAA – formalina; kwas octowy lodowaty; alkohol etylowy (1:1:18); FPA – formalina; kwas propionowy; alkohol etylowy (1:1:18); GA – aldehyd glutarowy; GHPT – 100 mM glicyna, 1% heksylenoglikol, 1% propan-2-ol, 0,1% Triton X-100; PA – kwas propionowy; etanol (1:3); PFA – paraformaldehyd; PDS – siarczan potasowy dekstranu; PMEG – 50 mM Pipes, 5 mM MgSO₄, 5 mM EGTA, 4% gliceroi; PMSE – 50 mM Pipes, 2 mM MgSO₄, EGTA; Kao 90 medium; MES – kwas 2 (N-morfolino) etano-sulfonowy; MS – pożywka Murashige i Skooga, NBM – pożywka; PO₄ – bufor fosforanowy; β-Glac – β-glukuronidaza; C – celuloza; Ch – cytohelikaza; Cl – celulizyna; Dri – dricelaza; H – hermiceulaza; Mc – macerozym; P – pektynaza; Pcl – pektolizaza; Sn – snailaza; Xy – ksylolizaza

dostępu do izolowanych gametofitów żeńskich jest możliwość badania cytoszkieletu, rozmieszczenia DNA cytoplazmatycznego i jądrowego, struktury ściany komórkowej oraz rozkładu cytoplazmy wewnątrz woreczka zalążkowego.

Organizacja cytoszkieletu mikrotubularnego podczas megasporogenezy została opisana na podstawie badań prowadzonych na izolowanych woreczkach zalążkowych gatunków: *Arabidopsis thaliana* [53], *Gasteria verrucosa* [2] oraz *Plumbago zeylanica* [15].

Na poziomie mikroskopu elektronowego przeprowadzono dotychczas niewiele wnikliwych badań na izolowanych woreczkach zalążkowych. Z rezultatów obserwacji nad *Plumbago zeylanica* [14, 39] i *Zea mays* [50] wynika, że również pod względem ultrastruktury izolowane megagametofity nie wykazują zmian w porównaniu z gametofitami *in vivo*.

CHARAKTERYSTYKA CYTOCHEMICZNA

Badania cytochemiczne, jakie dotychczas prowadzono na izolowanych żywych i utrwalonych woreczkach zalążkowych, ograniczone są do oznaczania DNA jądrowego i DNA chloroplastowego przy użyciu barwników fluorescencyjnych, takich jak DAPI oraz Hoechst 33258. Przy ich wykorzystaniu śledzono poszczególne fazy zapłodnienia w fazie kariogamii u *Helianthus annuus* [58] oraz badano rozmieszczenie cytoplazmatycznego DNA podczas formowania się woreczka zalążkowego u *Plumbago zeylanica* [15]. Badania nad *Plumbago* wykazały, że plastydy najczęściej gromadzą się wokół jądra położonego najbliżej bieguna mikropylarnego, co wskazuje, iż plastydy mogą determinować różnicowanie się danej komórki megagametofitu w komórkę jajową.

Inne z dotychczas przeprowadzonych badań cytochemicznych dotyczą obecności i składu ściany woreczków zalążkowych. Przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Calcafluor White wykazano, że u większości izolowanych gametofitów żeńskich nie obserwuje się pozytywnej reakcji na obecność polisacharydów w ścianie woreczka zalążkowego [15, 18, 61, 62]. Szczególną budowę ściany woreczka zalążkowego zaobserwowano u *Antirrhinum majus* [60, 63]. U tego gatunku ściana woreczka zalążkowego wykazuje bardzo intensywne zabarwienie po zastosowaniu barwnika Auramina O oraz jest bardzo odporna na działanie enzymów, silnych utleniaczy, a nawet acetolizę. Dane te mogą oznaczać, że ściana woreczka zalążkowego u *Antirrhinum majus* zawiera kutynę lub sporopolleninę.

CHARAKTERYSTYKA IMMUNOLOGICZNA

Metody immunologiczne wykorzystano jak dotychczas jedynie do oznaczania białek cytoszkieletu izolowanych woreczków zalążkowych [53, 54, 55]. Nie podejmowano dotychczas prób immunodetekcji specyficznych dla gamety żeńskiej białek, co niewątpliwie przyczyniłoby się do lepszego zrozumienia mechanizmów rozpozna-

wania się, adhezji oraz fuzji gamet przeciwnej płci. Należy podkreślić, że ograniczenia w zastosowaniu metod immunologicznych do badania wyizolowanych gametofitów lub gamet żeńskich wynikają z trudności w uzyskaniu odpowiednio dużej ilości izolowanego materiału.

BADANIA PROCESU ZAPŁODNIENIA I WCZESNYCH STADIÓW EMBRIOGENEZY ORAZ FUZJI GAMET *IN VITRO*

U roślin okrytonasiennych występuje charakterystyczne zjawisko podwójnego zapłodnienia. Podczas tego procesu dwie komórki plemnikowe, każda bez ściany komórkowej, są uwalniane z łagiewki pyłkowej do jednej z komórek gametofitowych, synergidy. Następnie obydwie komórki plemnikowe przesuwały się poprzez zdegenerowaną synergidę, dostają się do przestrzeni międzykomórkowej pomiędzy dwiema sąsiadującymi ze sobą komórkami gametofitu – komórką jajową i komórką centralną – i łączą z nimi tworząc zygotę i pierwotne jądro endospermy. Wszystkie etapy zapłodnienia u roślin okrytonasiennych przebiegają głęboko ukryte w tkankach żeńskich. Komórka jajowa umieszczona jest w woreczku zalążkowym, który z kolei otoczony jest tkankami zalążka i zalążni, stąd dostęp do niej jest nieporównanie trudniejszy niż do komórki jajowej zwierząt. Większość danych na temat podwójnego zapłodnienia u *Angiospermae* pochodzi z obserwacji mikroskopowych materiału utrwalonego. Dane te są jednak nadal fragmentaryczne (podsumowanie dotychczasowych danych [38]).

W celu poznania i zrozumienia mechanizmów rozmnażania seksualnego u roślin konieczne było opracowanie nowych technik eksperymentalnych, które umożliwiłyby bezpośredni dostęp do wyizolowanych żywych gametofitów i gamet oraz możliwość manipulowania gametami. Metody takie zostały już częściowo opracowane. W niniejszym opracowaniu podano opis technik izolowania gametofitów i gamet żeńskich. Dane na ten temat można również znaleźć w opracowaniach przeglądowych [16, 44]. Metody izolowania gamet męskich szczegółowo omawiają Chaboud i Perez [5].

W badaniach procesu zapłodnienia i zmian, jakie zachodzą w woreczku zalążkowym po zapłodnieniu, wykorzystuje się techniki eksperymentalne, takie jak:

- hodowlę *in vitro* izolowanych woreczków zalążkowych [32] i zapłodnionych komórek jajowych [12],
- mikroiniekcję izolowanych gamet męskich do wyizolowanych woreczków zalążkowych i komórek gametofitowych [29],
- fuzję *in vitro* gamet przeciwnej płci [9, 10, 24, 25],
- fuzję *in vitro* gamet przeciwnej płci i kulturę *in vitro* produktów fuzji aż do uzyskania dojrzałych roślin [26].

Spośród wymienionych metod technika fuzji *in vitro* wydaje się być najbardziej efektywna w przeprowadzaniu doświadczeń nad zapłodnieniem, gdyż pozwala na dowolne manipulowanie materiałem w postaci izolowanych gamet oraz na bardzo dokładne śledzenie poszczególnych etapów łączenia się komórki jajowej z plemnikiem. Techniki zapłodnienia *in vitro* wydają się również łatwiejsze w porównaniu z techniką mikroiniekcji, która jest znacznie bardziej skomplikowana i wymaga od eksperymentatora dużego doświadczenia oraz zdolności manualnych.

Po raz pierwszy fuzję gamet *in vitro* przeprowadzono u gatunku *Zea mays* [24, 25]. Protoplasty komórki jajowej i plemnika łączyły się ze sobą po umieszczeniu w odpowiedniej pożywce w zmiennym polu elektrycznym. Wydajność tej metody wynosiła 79%, a produkty elektrofuzji dzieliły się i ostatecznie otrzymano płodne rośliny [26].

W roku 1994 opracowano nową metodę fuzji *in vitro* gamet przeciwnej płci [10], w której dochodziło do połączenia gamet bez działania czynników zewnętrznych. Zatem warunki eksperymentalne zbliżone były bardziej do warunków panujących *in vivo*. Protoplasty komórki jajowej i plemnika umieszczone w prostej pożywce zawierającej 1 mM mannitol i 1 mM, 5 mM lub 10 mM CaCl_2 łączyły się po upływie zaledwie kilku sekund. Stosując tę metodę autorzy zauważyli, że fuzja gamety żeńskiej z gametą męską jest procesem specyficznym w przeciwieństwie do metody elektrofuzji, gdzie z równą częstością dochodziło do fuzji protoplastów plemników z protoplastami innych komórek gametofitowych niż komórka jajowa, a nawet z protoplastami komórek sporofitowych. W toku opisywanych eksperymentów stwierdzono również, że zapłodniona komórka jajowa nie ulega fuzji z dodatkowymi plemnikami, co wskazywałoby na istnienie również u roślin, podobnie jak u zwierząt, mechanizmów blokujących polispermię.

Przedstawione systemy eksperymentalne badania zjawiska zapłodnienia otwierają nowe perspektywy i kierunki badań w dziedzinie embriologii eksperymentalnej. Opracowane systemy fuzji *in vitro* powinny pozwolić na badanie mechanizmów rozpoznawania się gamet i ich adhezji, a także na badanie zupełnie nieznanych jeszcze u *Angiospermae* mechanizmów molekularnych związanych z procesem zapłodnienia.

Konsekwencją rozwoju nowych technik są interesujące prace eksperymentalne, jakie ukazały się w ostatnich latach. Prace te w znacznym stopniu poszerzają naszą wiedzę na temat rozmnażania seksualnego u roślin. Należy jednak pamiętać, że szereg fundamentalnych kwestii, zwłaszcza dotyczących mechanizmów molekularnych procesu zapłodnienia u roślin nadal czeka na wyjaśnienie.

WNIOSKI I PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Izolowanie gametofitów i gamet żeńskich jest nowym krokiem w kierunku lepszego poznania procesu podwójnego zapłodnienia oraz rozwoju embrionalnego. Możliwość izolowania woreczków zalążkowych czy też komórek gametofitowych pozwala

na przeprowadzenie bardzo szczegółowych badań strukturalnych, biochemicznych i molekularnych. Nienaruszona trójwymiarowa organizacja woreczka zalążkowego stwarza możliwość badania interakcji międzykomórkowych. Techniki izolowania gametofitów żeńskich pozwalają również na badanie zmian zachodzących w cytoszkielecie oraz zmian w rozmieszczeniu organelli cytoplazmatycznych podczas zapłodnienia. Jeżeli przełamane zostaną techniczne problemy związane z uzyskaniem dużej ilości izolowanych woreczków zalążkowych oraz opracowane odpowiednio czułe techniki, możliwe stanie się zbadanie zmian zachodzących podczas rozwoju na poziomie biochemicznym i molekularnym, zwłaszcza zaś zbadanie ekspresji specyficznych białek oraz produkcji glikoprotein charakterystycznych dla woreczków zalążkowych lub gamety żeńskiej.

Badania takie niewątpliwie mogłyby przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmów rozpoznawania się gamet przeciwnej płci oraz ich fuzji, a także rozwiązania problemów regulacji megasporogenezy, megagametofitogenezy, zapłodnienia, inicjacji embriogenezy czy też indukcji rozwoju apomiktycznego.

LITERATURA

- [1] ALLINGTON P M. Micromanipulation of the unfixed cereal embryo sac. [w] The experimental manipulation of ovule tissues. G P Chapman, S H Mantell, R M Daniels (red.). Longman, New York, London, 1985; 39–51.
- [2] BEDNARA J, WILLEMSE M T M, Van LAMMEREN A A M. Organization of actin cytoskeleton during megasporogenesis in *Gasteria verrucosa* visualized with fluorescent-labelled phalloidin. *Acta Bot Neerl* 1990; **39**: 43–48.
- [3] BRADLEY M V. An aceto-carmin squash technique for mature embryo sacs. *Stain Tech* 1948; **23**: 29–40.
- [4] CASS D D. Studies of isolated embryo sacs and sperm cells of maize and winter wheat. *Am J Bot* 1990; **77**, suppl 5–6.
- [5] CHABOUD A, PEREZ R. Generative cells and male gametes: isolation, physiology, and biochemistry. *Intern Rev Cytol* 1992, **140**:205–232.
- [6] CHAMBERLIN M A, HORNER H T, PALMER R G. Nuclear size and DNA content of the embryo and endosperm during their initial stages of development in *Glycine max* (Fabaceae). *Am J Bot*, 1993; **80**:1209–1215.
- [7] ENALEYEVA N K, TYRNOV V S, KHOKHLOV S S. Isolation of embryo sacs of angiosperms by tissue maceration. *Cytol i Genet* 1972; **6**: 439–441.
- [8] ERDELSKA O. Contribution to the study of fertilization events in the living embryo sac. [w] Fertilization in higher plants. H F Linskens (red.). North-Holland Publisher, Amsterdam, 1974; 191–195.
- [9] FAURE J E, MOGENSEN H L, DUMAS C, LÖRZ H, KRANZ E. Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course. *Plant Cell* 1993; **5**: 747–755.
- [10] FAURE J E, DIGONNET C, DUMAS C. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 1994; **263**: 1598–1600.
- [11] FORBES I. A rapid enzyme-smear technique for the detection and study of plural embryo sacs in mature ovaries of several *Paspalum* species. *J Agron* 1960; **52**: 300–301.

- [12] HOLM P B, KNUDSEN S, MOURITZEN P, NEGRI D, OLSEN F L, ROUE C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of fertilized egg cell. *Plant Cell* 1994; **6**: 531–543.
- [13] HU S-Y, LI L G, ZHOU C. Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1985; **27**: 343–347.
- [14] HUANG B Q, RUSSEL S D. Isolation of fixed and viable eggs, central cells and embryo sacs from ovules of *Plumbago zeylanica*. *Plant Physiol* 1989; **90**: 9–12.
- [15] HUANG B Q, RUSSEL S D, STROUT G W, MAO L J. Organization of isolated embryo sacs and eggs of *Plumbago zeylanica* (*Plumbaginaceae*) before and after fertilization. *Am J Bot* 1990; **77**: 1401–1410.
- [16] HUANG B Q, RUSSEL S D. Female germ unit: organization, isolation and function. *Intern Rev Cytol* 1992a; **140**: 233–293.
- [17] HUANG B Q, RUSSEL S D. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sex Plant Reprod* 1992b; **5**: 151–155.
- [18] HUANG B Q, RUSSEL S D. Video-microscopic observations of living, isolated embryo sacs of *Nicotiana* and their component cells. *Sex Plant Reprod* 1992c; **5**: 156–162.
- [19] HUANG B Q, RUSSEL S D. Fertilization in *Nicotiana tabacum*: cytoskeletal modifications in the embryo sac during synergid degeneration. A hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion. *Planta* 1994; **194**: 200–214.
- [20] JENSEN C J, BUCHTER-LARSEN A, CASS D D, THORN E, ENGELL K, OLSEN P. Pollen and ovule cultures of barley to isolate, manipulate and transfer sperm cells in *in vitro* fertilization. [w] Genetic manipulation in plant breeding. W Horn, C J Jensen, W Odenbach, O Schieder (red.). De Gruyter, Berlin, New York, 1986; 473–475.
- [21] JONGEDIJK E. A quick enzyme squash technique for detailed studies on female meiosis in *Solanum*. *Stain Techn* 1987; **62**: 135–142.
- [22] KEIJZER C J, REINDERS M C, LEFERINK-ten-KLOOSTER H B. A micromanipulation method for artificial fertilization in *Torenia*. [w] Sexual reproduction in higher plants. M Cresti, P Gori, E Pacini (red.). Springer, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1988; 119–124.
- [23] KOVACS M, BARNABAS B, KRANZE E. The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Reprod* 1994; **7**: 311–312.
- [24] KRANZ E, BAUTOR J, LÖRZ H. *In vitro* fertilization of single isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex Plant Reprod* 1991a; **4**: 12–16.
- [25] KRANZ E, BAUTOR J, LÖRZ H. Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the *in vitro* fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cell and cell reconstitution in maize. *Sex Plant Reprod* 1991b; **4**: 17–21.
- [26] KRANZ E, LÖRZ H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 739–746.
- [27] LI L G, HU S Y. Isolation of embryo sac with enzyme squash technique. *Acta Bot Sin* 1985; **27**: 561–567.
- [28] LIBIK M. Izolowanie gametofitów żeńskich u wybranych gatunków *Angiospermae*. Praca magisterska. Kraków, 1994 (niepubl.)
- [29] MATTHYS-ROCHON E, MÓL R, HEIZMANN P, DUMAS C. Isolation and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated maize embryo sacs. *Zygote* 1994; **2**: 29–35.
- [30] MAXWELL C D, VALENTINE D H. A dissection technique for embryo sacs. *New Phytol* 1966; **65**: 75–76.
- [31] MÓL R. Isolation of protoplasts from female gametophytes of *Torenia fournieri*. *Plant Cell Rep* 1986; **3**: 202–206.
- [32] MÓL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. *In vitro* culture of fertilized embryo sacs of maize: zygotes and two-celled proembryos can develop into plants. *Planta* 1993; **189**: 213–217.

- [33] MÓL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. The kinetics of cytological events during double fertilization in *Zea mays* L. *The Plant Journ* 1994; **5**: 197–206.
- [34] NICOLL M F, CHAPMAN G P, JAMES D J. Endosperm responses to irradiated pollen in apples. *Theor Appl Genet* 1987; **74**: 508–515.
- [35] PALIWAL R L. A new technique for microdissection of embryo sacs of the *Santalaceae*. *Phytomorph* 1953; **3**: 118–121.
- [36] QIU D, LU F, XIE S. Embryo sacs of *Hevea brasiliensis* and *Carica papaya* isolated with enzyme-squash technique. *Acta Bot Sin* 1991; **33**: 350–355.
- [37] RODKIEWICZ B. (red.). *Embriologia Angiospermae – rozwojowa i eksperymentalna*. Wydawnictwo UMCS. Lublin 1994.
- [38] RUSSEL S D. Double fertilization. *Intern Rev Cytol* 1992, **140**:357–387.
- [39] RUSSEL S D, HUANG B Q, STROUT G W. Preliminary intermediate voltage electron microscopic observations of isolated embryo sacs of *Plumbago zeylanica* L. (*Plumbaginaceae*). [w]: Some aspects and actual orientations in plants embryology. J Pare, M Bugnicourt (red.). Universite de Picardie, Facultes des Sciences, Picardie, 1989;109–111.
- [40] SIDOROVA N V. Characteristic of ultrastructure of isolated tobacco embryo sacs. *Dokl Akad Nauk Ukr SSR* (ser. B). *Geol Chim Biol Nauki* 1985; **12**: 60-63.
- [41] SOLNTSEVA M P, LEVKOVSKII W P. The variant of preparing constant Feulgen's stained slides of total embryo sacs isolated by plant tissue maceration. *Bot Zhurn* 1978; **63**: 827–831.
- [42] SOLNTSEVA M P, LEVKOVSKII W P. Rapid production of permanent preparations of whole plant embryo sacs and pollen complexes. *Cyt i Gen* 1979; **12**: 489–492.
- [43] SU M, YANG H, ZHOU C. A new method for embryo sac isolation and *in situ* fusion of egg and synergid protoplasts in *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1993; **35**: 893–900.
- [44] THEUNIS C H, PIERSON E S, CRESTI M. Isolation of male and female gametes in higher plants. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 145–154.
- [45] THIJSSSEN M H, VAN WENT J L. Isolation and culture of embryo sacs of *Petunia* effects on structure and organisation. [w] *Frontiers in sexual plant reproduction research*, Wiedeń, 1994; 118.
- [46] TIRLAPUR U K, VAN WENT J L, CREST M. Visualization of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs *in situ* and isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L. *Ann of Botany* 1993; **71**: 161–167.
- [47] VAN DER MAAS H M, ZAAL M A C M. Gametoplasts in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Acta Bot Neerl* 1990; **39**: 399.
- [48] VAN DER MAAS H M, ZAAL M A C M, DE JONG E R, KRENS F A, VAN WENT J L. Isolation of viable egg cells of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) *Protoplasma* 1993; **173**: 86–89.
- [49] VAN WENT J L, KWEE H S. Enzymatic isolation of living embryo sacs of *Petunia*. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 257–262.
- [50] WAGNER V T, SONG Y C, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. The isolated embryo sac of *Zea mays*: structural and ultrastructural observations. [w] *Sexual reproduction of higher plants*. M Cresti, P Gori, E Pacini (red.) Springer, Heidelberg Berlin, New York, Tokyo, 1988; 125–130.
- [51] WAGNER V T, KARDOLUS J P, VAN WENT J L. Isolation of the lily embryo sac. *Sex Plant Reprod* 1989 a; **2**: 219–224.
- [52] WAGNER V T, SONG Y C, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. Observations on isolated embryo sac of *Zea mays* L. *Plant Science* 1989 b; **59**: 127–132.
- [53] WEBB M C, GUNNING E S. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. I. Megasporogenesis including the microtubular cytoskeleton. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 244–256.
- [54] WEBB M C, GUNNING E S. The microtubular cytoskeleton during development of zygote, proembryo and free-nuclear endosperm in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Planta* 1991; **184**: 187–195.

- [55] WEBB M C, GUNNING E S. Embryo sac development in *Arabidopsis thaliana*. II. Cytoskeleton during megagametogenesis. *Sex Plant Reprod*, 1994; **7**: 153–163.
- [56] WU Y, ZHOU C. Observation on enzymatically isolated embryo sacs in *Adenophora axilliflora*: fertilization, zygote and endosperm. *Acta Bot Sin* 1988; **30**: 210–212.
- [57] WU Y, ZHOU C, KOOP H U. Enzymatic isolation of viable nucelli at the megaspore mother cell stage and in developing embryo sacs in *Nicotiana tabacum*. *Sex Plant Reprod* 1993; **6**: 171–175.
- [58] ZHOU C. A study of fertilization events in living embryo sacs isolated from sunflower ovules. *Plant Science* 1987; **52**: 147–151.
- [59] ZHOU C, YANG H Y. Enzymatic isolation of fixed and fresh embryo sacs in angiosperms: isolation and microscopical observation on fixed material. *Acta Bot Sin* 1982; **24**: 403–407.
- [60] ZHOU C, YANG H Y. The enzymatic isolation of embryo sacs from fresh and fixed ovules of *Antirrhinum majus* L. *Acta Biol Exp Sin* 1984; **17**: 141–147.
- [61] ZHOU C, YANG H Y. Isolation and identification of viable embryo sacs in several angiosperm species. *Acta Bot Sin* 1985a ; **27**: 258–262.
- [62] ZHOU C, YANG H Y. Observations on enzymatically isolated living and fixed embryo sacs in several angiosperms species. *Planta* 1985 b; **165**: 225–231.
- [63] ZHOU C, YANG H Y. Isolation of embryo sacs by enzymatic maceration and its potential in haploid study.[w] Haploids of higher plants *in vitro*. H Hu, H Yang (red.) Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1986; 192–202.
- [64] YANG H Y, ZHOU C. Observations on megasporogenesis and megagametophytes development in *Paulownia* sp. and *Sesamum indicum* by enzymatic maceration technique. *Acta Bot Sin* 1984; **26**: 342–346.

Otrzymano: 24.04.1995 r.

Przyjęto: 07.06. 1995 r.

Adres autorów: 31-044 Kraków, ul. Grodzka 52

PROTEASOMY I SZLAK DEGRADACJI BIAŁEK ZALEŻNY OD UBIKWITYNY

PROTEASOMES AND THE UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN DEGRADATION PATHWAY

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii AM w Warszawie

Streszczenie: Ostatnie lata przyniosły lepsze poznanie głównego pozalizosomalnego szlaku degradacji białek zlokalizowanego w cytoplazmie. Ukierunkowanie białek na ten szlak degradacji następuje wskutek ich związania się z powszechnie występującym w komórkach drobnocząsteczkowym białkiem zwanym ubikwityną. Rozpad proteolityczny dokonywa się następnie przy udziale wielokatalitycznych kompleksów proteinaz MPC (*multicatalytic proteinase complex*), czyli proteasomów. Te ostatnie są organelami występującymi we wszystkich zbadanych do tej pory komórkach eukariotycznych.

Słowa kluczowe: proteasomy, prosomy, ubikwityna, proteoliza, MPC, prezentacja antygenów

Summary: The last years brought a deeper understanding of the main lysosome independent protein degradation pathway localized in the cytoplasm. The targeting of proteins to this pathway is due to their covalent binding with a small ubiquitous polypeptide known as ubiquitin. The ubiquitin conjugates are degraded by the proteasomes or multicatalytic proteinase complexes (MPCs). The proteasomes are present in all known eukaryotic cells.

Key words: proteasomes, prosomes, ubiquitin, proteolysis, multicatalytic proteinase complexes (MPC), antigen presentation

Wykaz skrótów: CENP (*centromere protein*) – białko centromerowe; CF (*conjugate breakdown factor*) – czynniki powstające z rozpadu koniugatów; CSK (*cytostatic factor*) – czynnik cytotatyczny; DFP (*diisopropylfluorophosphate*) – diizopropylfluorofosforan; INCENPs (*inner centromere proteins*) – wewnętrzne białka centromeru; LMP (*low molecular mass protein*) – białko o niskiej masie cząsteczkowej; MHC (*major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej; MPC (*multicatalytic proteinase complex*) – wielokatalityczny kompleks proteinaz; MPF (*maturation promoting factor*) – czynnik wywołujący dojrzewanie; NTS (*nuclear transfer signal*) – sygnał przenoszenia do jądra komórkowego; pRNA – prosomalny RNA; SDS (*sodium dodecylsulphate*) – dodecylosiarczan

sodu; TAP (*transporter asociated with antigen presentation*) – białko transportujące związane z prezentacją antygenów; UBA (*ubiquitin activating enzyme*) – enzym aktywujący ubikwitynę; UBC (*ubiquitin conjugating enzyme*) – enzym koniugujący ubikwitynę; UC DEN (*ubiquitin conjugate degrading enzyme*) – enzym degradujący koniugaty ubikwityny; YTA (*yeast ATPases*) – ATPazy drożdży.

MECHANIZMY POZALIZOSOMALNEJ DEGRADACJI BIAŁEK

Najlepiej poznany jest system proteolizy występujący w obrębie lizosomów. Spełnia on swe zadania wobec białek pochodzących z otoczenia komórki drogą różnych form endocytozy lub białek wewnątrzkomórkowych dostających się do niego drogą autofagii bądź przepływu struktur błoniastych. W ostatnich czasach zaczęto zwracać uwagę na istnienie innych układów proteolizy [13]. Wiążą się one z usuwaniem z jednej strony zniszczonych lub nienormalnych białek cytoplazmy, a z drugiej strony normalnych białek o charakterze regulacyjnym i krótkim okresie półtrwania, takich jakimi np. są cykliny [27], onkoproteiny, takie jak *mos* [38] czy antyonkoproteina p53 [78] oraz hormony, takie jak gonadoliberyna [50] i kluczowe dla metabolizmu enzymy, takie jak fruktozo-1,6-bisfosfataza [81]. Ostatnio wykazano, że proteasomy spełniają główną rolę także w degradacji stabilnych białek funkcjonalnych i strukturalnych, o długim okresie półtrwania (choć szlak ten może być niezależny od ubikwityny) [74].

Biochemiczne podłoże głównego pozalizosomalnego szlaku degradacji białek polega na ich wiązaniu z drobnocząsteczkowym polipeptydem, zwanym ubikwityną i ukierunkowaniu tak powstałych kompleksów do agregatów enzymów proteolitycznych, zwanymi proteasomami 26 S [8,28,68]. Częstki te są bardzo podobne i/lub mają wspólne składniki z opisanymi wcześniej kompleksami RNA i białek, zwanymi prosomami [79].

O wiele mniej poznana jest rola innych układów proteolitycznych, opartych na samodzielnych proteasomach 20 S, niezależnych od ubikwityny systemach znakujących substraty, lub też enzymach cytoplazmatycznych w rodzaju kalpajny.

Niedawno wykazano, że proteasomy 26 S mogą rozkładać pewne białka bez uprzedniej ubikwitynacji, na przykładzie kluczowego enzymu w biosyntezie poliamin, jakim jest u ssaków dekarboksylaza ornityny. Jest on enzymem o jednym z najkrótszych okresów półtrwania, a jego degradacja jest przyspieszana działaniem tzw. antyzymu, białka indukowanego przez poliaminy. Antyzym spełnia prawdopodobnie rolę ubikwityny w ukierunkowaniu nowo powstałych kompleksów na szlak degradacji [57,89].

BUDOWA UBIKWITYNY

Ubikwityna jest małym białkiem powszechnie występującym wśród wszystkich eukariontów, cechującym się znacznym konserwatywnym ewolucyjnym. Ubikwityna drożdży różni się od ubikwityny ludzkiej zaledwie trzema spośród siedemdziesięciu

sześciu tworzących ją aminokwasów. Zlokalizowano ją we wszystkich przedziałach komórkowych, a więc w obszarze jądra, w cytoplazmie, jak i w powiązaniu z błoną komórkową. Wykryto homologi ubikwityny w genomach wielu wirusów, co może mieć znaczenie w determinowaniu ich zjadliwości wobec komórek eukariotycznych [40,55].

Ubikwityna charakteryzuje się wyjątkową termostabilnością, odpornością na proteolizę i zmiany pH, co uwarunkowane jest jej szczególną strukturą. Trzon białka ma charakter hydrofobowy i globularny, składa się z trzech skupionych zwojów α -helisy oraz z części o charakterze struktury β . Z tego zbitego jądra wystaje krótki C-terminalny łańcuch hydrofilowy, służący do wiązania się poprzez końcową resztę glicylową z grupą ϵ -aminową Lys innych polipeptydów [55].

W genomie ludzkim nie wykryto dotychczas pojedynczego genu dla ubikwityny, stwierdzono natomiast występowanie charakterystycznej dla niej sekwencji w dwóch postaciach:

- 1/ jako poliubikwityna 3- i 5-cząsteczkowa lub jako
- 2/ białko fuzyjne.

To ostatnie pojęcie oznacza, że wskutek translacji odpowiedniego genu powstaje polipeptyd składający się z połączonych koniec do końca kilku białek. Znane białka fuzyjne zawierające ubikwitynę mają jako drugi składnik niektóre z białkowych komponentów obydwu podjednostek rybosomów. Wolna ubikwityna powstaje wskutek działania specyficznej C-terminalnej hydrolazy ubikwityny na białka fuzyjne lub na poliubikwitynę [55].

ZNACZENIE UBIKWITYNY W METABOLIZMIE KOMÓRKI

Ograniczona proteoliza koniugatów ubikwityny z białkami służy prawdopodobnie do obróbki posttranslacyjnej różnych białek, np. podjednostki p50 czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [55].

Zależna od ubikwityny proteoliza wydaje się być niezbędnym elementem odpowiedzi komórki eukariotycznej na stres cieplny bądź uszkodzający DNA. Funkcja ta prawdopodobnie wiąże się ze wzmożoną degradacją białek o zaburzonej konformacji. Wykazano, że u drożdży gen dla poliubikwityny UBI4 oraz gen dla enzymu koniugującego UBC2 ulegają aktywacji transkrypcyjnej w obecności czynników uszkodzających DNA [13,40,82].

Zależnej od ubikwityny proteolizie podlega cyklina B w momencie inaktywacji MPF-u [27], jak również prawdopodobnie cyklina A, a także cykliny G₁/S (np. CLN3 u drożdży). Także produkt anty-onkogeny p53 [78] oraz onkogenów *fos*, *myc* i *mos* [14,38] ulegają eliminacji drogą zależną od ubikwityny.

Obecność wielkocząsteczkowego (ca. 500 kDa), transbłonowego enzymu koniugującego UBCM1 w obrębie błon aparatu Golgiego i siateczki śródplazmatycznej,

sugeruje uczestnictwo proteolizy zależnej od ubikwityny w szlaku proteolitycznym siateczki śródplazmatycznej (*ER degradation*) mającej na celu usuwanie wadliwych białek błonowych i źle zmontowanych kompleksów transbłonowych [55].

Poza dobrze poznaną rolę ubikwityny, polegającą na ukierunkowaniu pewnych białek na drogę proteolizy, wydaje się że ma ona także inne funkcje. Występując w składzie białek fuzyjnych ubikwityna spełnia rolę molekularnej chaperoniny w przestrzennym konstruowaniu rybosomów. Ubikwityna występuje również w wyjątkowo stabilnych monokompleksach z receptorami dla PDGF i hGH odgrywając prawdopodobnie rolę w regulacji ich ekspresji na powierzchni komórki [55]. Działanie rozpuszczalnego czynnika *Steel* stymuluje z kolei szybką poliubikwitynację i następczą degradację receptora *c-kit* [56].

U ssaków do 15% histonu H2A i do 5% H2B występuje w powiązaniu z ubikwityną, przy czym znikają one zupełnie z komórki w czasie metafazy, aby pojawić się znowu pod koniec anafazy. Wydaje się, że ubikwitynowane histony występują głównie w aktywnych transkrypcyjnie regionach chromatyny i mogą modyfikować jej strukturę. W okresie poprzedzającym metafazę histony ulegają deubikwitynacji, a ponowne przyłączanie ubikwityny rozpoczyna się w późnej anafazie. W czasie mitozy enzym aktywujący ubikwitynę E1 (patrz następny podrozdział) wiąże się z chromosomami, co może warunkować powyższe procesy [15].

Koniugacja białek z ubikwityną może też warunkować ich translokację do mitochondriów, gdyż wykazano zablokowanie transportu monoaminooksydazy B pod wpływem przeciwciał antyubikwitynowych [13].

Wysoki poziom ubikwitynacji białek występuje w przebiegu apoptozy. Ubikwitynacja białek stanowi być może sygnał do sekwestracji części cytoplazmy w wakuole autofagalne. Zaobserwowano masową ubikwitynację białek cytoszkieletu w przebiegu różnych procesów degeneracyjnych komórek, wykrywając jej obecność m.in. w pęczkach neurofibrylarnych w przebiegu choroby Alzheimera, ciałkach Lewy'ego w chorobie Parkinsona lub w ciałkach Mallory'ego w przebiegu alkoholowego zapalenia wątroby [55].

CYKL PRZEMIAN UBIKWITYNY W KOMÓRCIE

Ubikwitynacja białek jest procesem wieloetapowym i wymaga udziału różnych enzymów oraz dostarczenia energii. Najpierw, cząsteczka ubikwityny ulega adenylacji przy udziale ATP (rys. 1). Kompleks ADP-ubikwityna przyłącza się do grupy tiolowej reszty cystydylowej wchodzącej w skład enzymu aktywującego ubikwitynę UBA (*ubiquitin-activating enzyme*), czyli tzw. E1. Tak zaktywowana ubikwityna ulega przekazaniu na resztę cystydylową jednego z licznych enzymów koniugujących UBC (*ubiquitin-conjugating enzyme*), czyli tzw. E2. Te ostatnie przekazują ubikwitynę już bezpośrednio na substraty białkowe, choć niektóre z reakcji koniugacji

wymagają obecności dodatkowych enzymów określanych jako ligazy ubikwityny, czyli E3. Do tej pory poznano trzy takie enzymy: E3 α , E3 β i E3 zwany białkiem związanym z E6 wirusa brodawczaka E6AP (*E6 associated protein*) [13,41,40,55].

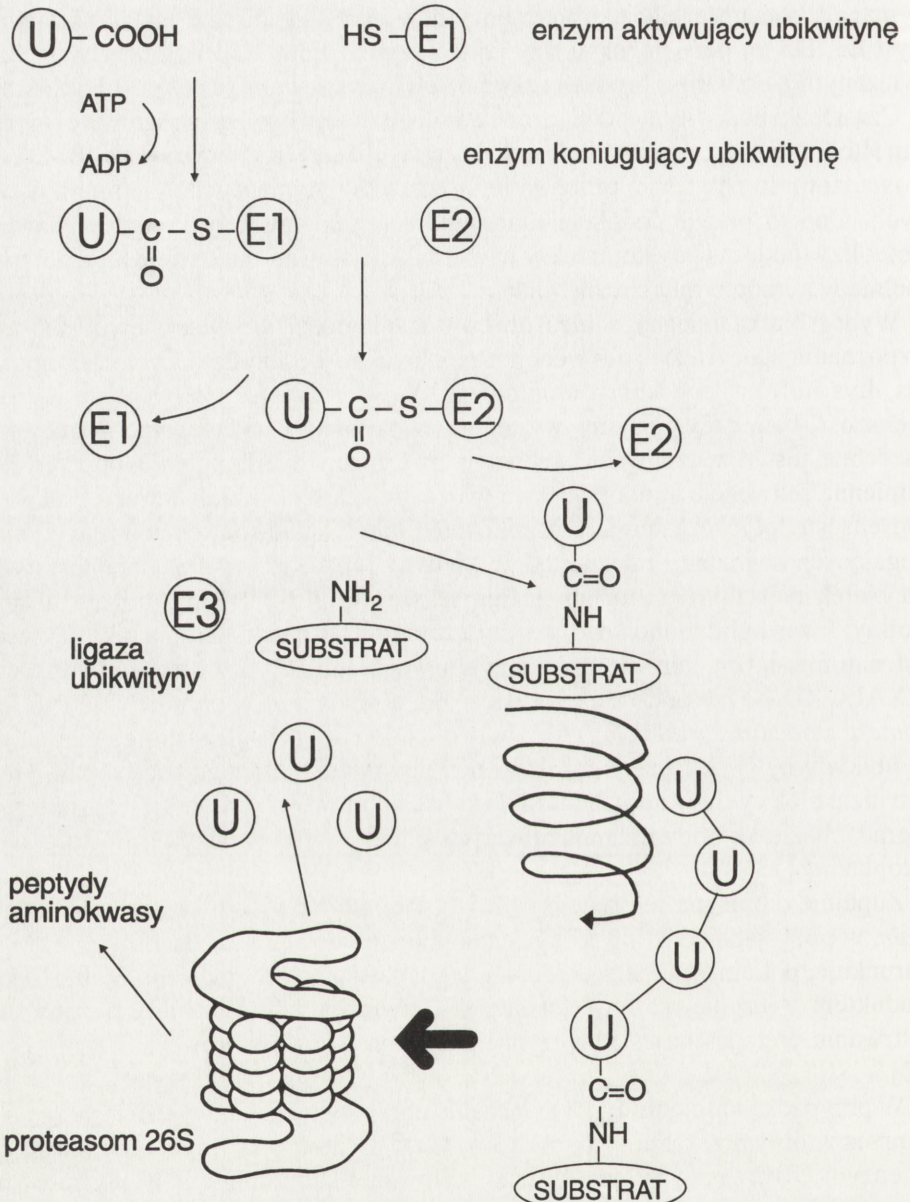
Cząsteczki ubikwityny przyłączone do substratu białkowego z reguły ulegają dalej same ubikwitynacji na jednej z dwóch dostępnych reszt lizylowych (Lys 48 i Lys 63). Prowadzi to do powstania prostych lub rozgałęzionych łańcuchów poliubikwitynowych. One to prawdopodobnie ukierunkowują tak powstały kompleks na drogę proteolizy, podczas gdy kompleksy monoubikwitynowane są o wiele bardziej trwałe i pełnią w komórce specyficzne funkcje [55].

Wybór białka mającego ulec ubikwitynacji może odbywać się na podstawie rozpoznania specyficznej sekwencji aminokwasów destabilizujących (jak np. Arg, His, Lys itd.) na jego końcu aminowym (*N-end rule*), lecz ze względu na to, że większość białek cytoplazmy występuje w postaci N-acetylowanej bardziej powszechne jest rozpoznawanie substratu przez enzymy E2 lub E3 poprzez jakąś odmienną sekwencję aminokwasową wewnątrz cząsteczki białka. Takiej sekwencji konsensusu dotychczas nie zidentyfikowano porównując sekwencje różnych białek ulegających degradacji zależnej od ubikwityny [40]. Nie jest nią charakterystyczna dla białek niestabilnych metabolicznie sekwencja PEST (region bogaty w reszty proliny, kwasu glutaminowego, seryny i treoniny). Kandydatem na taką sekwencję jest natomiast tzw. box destrukcji cyklin, występujący w obrębie cyklin A i B (RXALGXIXN) lub podobna sekwencja zidentyfikowana w obrębie CENP-E (*centromere associated protein E*), które prawdopodobnie także ulega proteolizie zależnej od ubikwityny [11]. Delecja tej sekwencji powoduje brak degradacji cyklin i co za tym idzie blok cyklu w mitozie. Reguła końca aminowego wydaje się uczestniczyć w degradacji źle skompartmentalizowanych białek, które omyłkowo dostały się do cytoplazmy [13].

Zupełnie odmienną sekwencję wykryto w obrębie regionu δ produktu onkogenu *c-jun*, w pozycjach od 31 do 57 łańcucha polipeptydowego. Obecność tej sekwencji warunkuje poliubikwitynację białka i jego następczą degradację. Białko będące produktem *v-jun* nie ma tej sekwencji i w związku z tym ma przedłużony okres półtrwania, co zapewne jest przyczyną transformacji nowotworowej zależnej od *v-jun* [90].

W przypadku kalmoduliny, przyłączenie ubikwityny do tego białka jest regulowane przez wtórny przekaźnik, jakim są jony Ca^{2+} . Uczestniczy w tym procesie specjalny enzym UBC zwany syntetazą ubikwitylowanej kalmoduliny, obecny zarówno u drożdży jak i u ssaków. Enzym ten specyficznie rozpoznaje jedną z reszt lizylowych kalmoduliny [39,48,51].

Ubikwityna połączona ze szczątkowymi peptydami pozostającymi po proteolizie jej koniugatów z białkami ulega odzyskaniu wskutek działania swoistych C-terminalnych hydroksylaz, stanowiących być może jedne z podjednostek proteasomów [41].



Rys.1. Schemat przedstawiający kaskadę reakcji enzymatycznych prowadzących do poliubikwitinacji i degradacji przykładowego substratu białkowego: U – ubikwityna

Poznano do tej pory cztery takie enzymy i wydają się one być ważne w metabolizmie komórki, gdyż pula wolnej ubikwityny szybko się wyczerpuje, a jej brak uniemożliwia proteolizę. Jeden z tych enzymów kodowany jest przez ludzki onkogen *c-tre-2* [13].

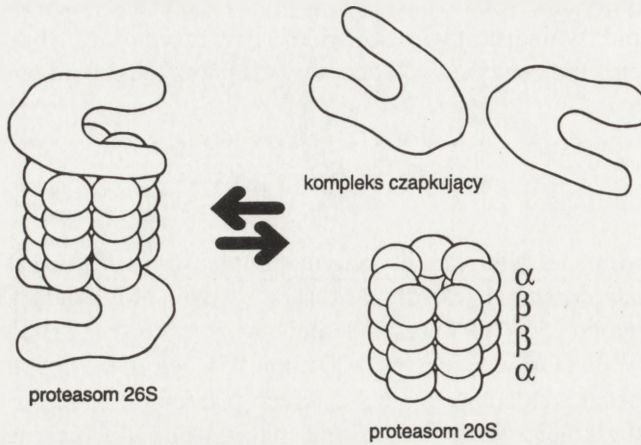
PROTEASOMY

Proteasom zwany też wielokatalitycznym kompleksem proteinaz (MPC – *multicatalytic proteinase complex*) jest dużą cząstką o stałej sedymentacji 20 S i masie cząsteczkowej rzędu 650–700 kDa. Wyizolowany został po raz pierwszy z przysadki bydłej przez Wilk i Orłowskiego w 1980 roku [95]. Ma on kształt pustego w środku cylindra bądź beczki, składającej się z czterech pierścieni. Każdy z tych pierścieni zbudowany jest z kolei z sześciu do ośmiu (najprawdopodobniej siedmiu) różnych podjednostek polipeptydowych. W skład jednego proteasomu może wchodzić 10–20 różnych rodzajów podjednostek o masie cząsteczkowej wahającej się od 20 do 35 kDa [28,45,46,62,63,68,69,86,93].

W obserwacjach z mikroskopu elektronowego proteasomy 20 S widziane z góry wyglądają jak pusty w środku pierścień o średnicy 11 nm, natomiast z boku przedstawiają się jako prostokąty o wymiarach 11 na 15 nm. Centralny otwór ma średnicę wahającą się w różnych doniesieniach od 1 do 4 nm [28,45,63,87,88].

Proteasomy zlokalizowano zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym wszystkich badanych do tej pory komórek eukariotycznych, przy czym w organizmach wielokomórkowych wykazują one tkankowo specyficzny skład podjednostkowy. Białka podjednostek proteasomów tworzą od 0,5 do 1% całkowitego białka komórkowego. O znaczeniu proteasomów w metabolizmie komórki wybitnie świadczy fakt, że większość genów kodujących podjednostki proteasomów jest niezbędna dla żywotności komórek [62,63].

Budowę proteasomu eukariotycznego poznano w dużej mierze dzięki analizie o wiele prostszych proteasomów występujących u archeobakterii *Thermobacterium acidophilum*, które udało się uzyskać w postaci krystalicznej, rozłożyć na podjednostki i z powrotem odtworzyć w aktywnej postaci [31]. Składają się one tylko z dwóch rodzajów podjednostek, α i β , przy czym siedem podjednostek α tworzy dwa pierścienie zewnętrzne, a siedem podjednostek β dwa wewnętrzne (rys. 2). Okazało się, że wszystkie znane podjednostki proteasomów eukariotycznych pod względem sekwencji upodabniają się albo do podjednostek α , albo do podjednostek β proteasomów *T. acidophilum*. Nie wykazują natomiast homologii do żadnej ze znanych proteaz eukariotycznych. Homologi α tworzą pierścienie zewnętrzne, a homologi β wewnętrzne [71]. Ułożone są one w ten sposób, że nadają proteasomowi 20S symetrię typu C2 (*twofold rotational*) [68]. Na podstawie analizy występowania pewnych epitopów



Rys. 2. Schemat przedstawiający dwie główne występujące w komórkach formy proteasomów, 20S i 26S, znajdujące się w stanie dynamicznej równowagi (greckie litery oznaczają każdy z czterech pierścieni wchodzących w skład proteasomu 20S)

antygenowych podjednostek proteasomów wydaje się, iż są one rozmieszczone symetrycznie w przeciwnych pierścieniach, co sugeruje, iż proteasom eukariotyczny ma charakter złożonego dimeru [45].

W dwupierścieniowym monomerze każda podjednostka jest inna i kodowana przez oddzielny gen [34]. Podjednostki typu β odpowiadają prawdopodobnie za właściwości enzymatyczne, a typu α – za przemieszczanie się pomiędzy jądrem i cytoplazmą (gdyż zawierają często NTS – sygnał transferu jądrowego) oraz inne funkcje regulacyjne. Za tym ostatnim przemawia fakt, iż zawierają one często miejsce konsensusu dla fosforylacji zależnej od kinaz tyrozynowych oraz motyw kilku kwasowych reszt aminoacylowych przy końcu karboksylowym [3].

In vitro proteasom 20 S ma trzy główne aktywności proteolityczne: trypsynopodobną, chymotrypsynopodobną i hydrolizującą wiązania peptydyloglutamylowe, oraz co najmniej dwie dodatkowe, hydrolizującą wiązania pomiędzy aminokwasem rozgałęzionym (np. leucyną) a innym oraz wiązania pomiędzy aminokwasem małym i obojętnym elektrycznie (np. glicyną) a innym. Ponieważ każda z tych aktywności jest wrażliwa na inne aktywatory i inhibitory, wywnioskowano, że zależą one od różnych centrów aktywnych. Skoordinowane działanie tych aktywności enzymatycznych prowadzi do szybkiego rozpadu większości wiązań peptydowych w każdym białku [62,63,87]. Kinetyka degradacji dekapeptydu, jakim jest gonadoliberyna, ujawnia pojawianie się najpierw heksa- i pentapeptydów, które stają się dostępne dla innych miejsc katalitycznych proteasomu 20S i mogą ulegać dalszej degradacji do tri- i tetrapeptydów [50]. Badając produkty rozkładu insuliny i hemoglobiny przez prote-

asomy *T. acidophilum* wysnuto wniosek o obecności swoistej “molekularnej linijki” w proteasomach. Determinuje ona powstawanie peptydów mieszczących się głównie w zakresie długości od ok. 5 do 12 aminokwasów [94].

Aktywność proteolityczną proteasomów można zahamować różnymi inhibitorami proteaz, zwłaszcza proteaz serynowych, które mają różne powinowactwo w stosunku do różnych aktywności enzymatycznych proteasomu. Ostatnio odkryto jednak związki specyficznie i odwracalnie blokujące *in vivo* proteasomy. Są to aldehydy peptydów, takie jak LLnL (N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucynal), MG115 (N-karbobenzoksyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norwalinal) i Z-IE(OtBu)AL-CHO (N-benzylloksykarbonyl-izoleucyl-glutamyl-(*O*-*t*-butyl)-alanyl-leucynal) [20,74,91]. Działanie tych związków powoduje gromadzenie w komórce licznych koniugatów poliubikwitynowych białek [20].

Podjednostki proteasomów 20S można rozdzielić działając na nie roztworem mocznika, niskim pH bądź wysokim stężeniem SDS (dodecylosiarczanu sodu). Nie wykazują one oddzielnie żadnej aktywności enzymatycznej. Agregację podjednostek i aktywację proteasomów można wywołać natomiast w obecności niewielkiej ilości wolnych kwasów tłuszczowych, polilizyny, małych stężeń SDS i jonów Mg^{2+} [42].

Proteasom 20 S nie potrafi samodzielnie degradować koniugatów białek z ubikwityną. Te ostatnie ulegają degradacji dopiero przez proteasomy 26 S o masie 1500 kDa, zwane z tego powodu UC DEN (*ubiquitin-conjugate degrading enzyme*), czyli enzymami degradującymi koniugaty ubikwityny [85,92]. Właściwość tę nadają dodatkowe podjednostki. Proteasomy 26S zawierają mianowicie poza proteasomami 20 S dwie inne frakcje białkowe, oznaczone jako CF1 (*conjugate breakdown factors*) o masie 500 kDa i CF2 o masie 250 kDa (proteasomy 20 S stanowią frakcję CF3). CF1 i CF2 stanowi grupa 13–15 białek o masie cząsteczkowej wahającej się od 35 do 110 kDa [43]. Proteasomy 20 S są postacią nieaktywną MPC, gdyż aktywność proteolityczną po ich izolacji wyzwalają dopiero odpowiednie aktywatory, podczas gdy proteasom 26 S jest postacią aktywną [28,68].

W obrazach izolowanych proteasomów z mikroskopu elektronowego można obserwować oprócz proteasomów 20S, także proteasomy 26S. Te ostatnie mają kształt ciężarka gimnastycznego (hantli). Jego “rączka” utworzona jest przez widziany z boku, czteropierścieniowy proteasom 20S. Końce tej struktury utworzone są natomiast przez dwie przeciwsymetryczne masy w kształcie litery V przyczepionej bokiem do brzeżnego pierścienia proteasomu 20S, ustawione w pozycjach, które nazywa się *cis* i *trans* (rys. 2). Takie ich ustawienie odzwierciedla usytuowanie podjednostek w obydwu dyskach α proteasomu 20S. Obserwuje się dodatkowo obecność nieregularnej masy wewnątrz struktury o kształcie litery V. Boczne masy proteasomu 26S można izolować również oddzielnie. W zależności od odkrywców nazwano je cząstkami μ , elementami bądź kompleksami czapkującymi (*cap elements*) lub PA700. Odpowiadają one prawdopodobnie frakcji CF1 lub CF1 + CF2. Mają stałą sedymentacji 19S i zawierają zbiór polipeptydów o masach 35–110 kDa występujący

w proteasomach 26S poza podstawowymi podjednostkami proteasomu 20S. Odpowiadają one prawdopodobnie za rozpoznawanie substratu, właściwości ATPazowe i zmianę jego konfiguracji przestrzennej (*unfolding*) umożliwiającą proteolizę przez jądro proteolityczne proteasomu 26S, czyli proteasom 20S [16,68,69,70]. Jedna z podjednostek tego kompleksu odpowiada za rozpoznawanie białek związanych z łańcuchami poliubikwityny [17]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zidentyfikowano natomiast 12 genów dla ATPaz YTA (*yeast ATPases*), z których co najmniej cztery wchodzi w skład kompleksu czapkującego proteasom 20S i są homologiczne do zsekwencjonowanych podjednostek ludzkiego proteasomu 26S [80]. Proteasom 26S może niekiedy występować w odmiennych formach, różniących się nieco składem podjednostkowym [92].

Element czapkujący 19S przyłącza się do proteasomu 20S z obydwu stron dając wtedy obraz typowego proteasomu 26S w kształcie hantli. Taki proteasom nazywany jest formą D proteasomu 26S, a stosunek stochiometryczny proteasomu 20S do kompleksu czapkującego 19S wynosi w nim jak 1:2. Kompleks czapkujący może się jednak z jednej strony nie przyłączyć i proteasom 26S ma wówczas kształt opisywany jako korek od szampana. Stosunek stochiometryczny proteasomu 20S do kompleksu czapkującego 19S ma się wówczas jak 1:1 [76].

Proteasom 20S może asocjować z różnymi innymi czynnikami regulującymi. I tak, w liszycach retikulocytów królika znaleziono trzy formy proteasomów 20S, różniące się szybkością migracji na żelu, aktywnością proteolityczną oraz obecnością specyficznych białek p30 i p160 [35]. Frakcja CF2 jest prawdopodobnie identyczna z wyizolowanym inhibitorem p240. Stwierdzono obecność jeszcze innych inhibitorów i aktywatorów proteasomów. Warto spośród nich wymienić aktywator PA28 o masie 10 kDa. Tworzy on pierścieniowate oligomery, które następnie łączą się z obydwoma końcami proteasomu 20S, zakrywając je i prawdopodobnie w ten sposób uniemożliwiając interakcję z elementami czapkującymi 19S [68].

Panuje dość duże zamieszanie w nazewnictwie podjednostek proteasomów. Różni autorzy oznaczali je najczęściej w zależności od pozycji osiągniętej w czasie elektroforezy na dwuwymiarowym żelu poliakrylamidowym lub według kolejności elucji. Numery poprzedzane są skrótem oznaczającym gatunek, z którego pochodzą proteasomy, np. szczurze RC od 1 do 10 (*rat* – szczur i *column* – kolumna elucyjna). Niektóre z podjednostek, zwłaszcza związane z regionem genów głównego kompleksu zgodności tkankowej, mają swoje własne nazwy, np. LMP 2 [3]

ZMIANY LOKALIZACJI PROTEASOMÓW W PRZEBIEGU CYKLU KOMÓRKOWEGO

Ograniczona proteoliza specyficznych białek ma kluczowe znaczenie dla procesów zachodzących w przebiegu cyklu komórkowego. Powyżej wspomniano już o proteo-

lizie białek regulacyjnych, takich jak cykliny i produkty onkogenów [96]. Wydaje się, że znaczenie ma także proteoliza kluczowych białek strukturalnych. Rozłączenie się siostrzanych chromatyd w przejściu pomiędzy metafazą i anafazą zależy prawdopodobnie od proteolizy wewnętrznych białek centromeru INCENPs (*inner centromere proteins*) oraz białka CENP-E (*centromere protein E*) [18,36]. Aktywacja proteolizy pewnych białek może zależeć od aktywacji odpowiednich enzymów z grupy E3, np. poprzez fosforylację zależną od *cdc2* [13].

Na podstawie obserwacji transformowanych komórek folikularnych *in vitro* stwierdzono zmiany położenia proteasomów w przebiegu mitozy. W interfazie proteasomy występowały rozproszone w małych grupach zarówno na obszarze jądra, jak i cytoplazmy. Począwszy od profazy wzrastała ich ilość w okolicy chromosomów, gdzie koncentrowały się jeszcze bardziej w metafazie i anafazie. W późnej anafazie antygeny proteasomów były wykrywalne także w pobliżu włókien wrzeciona podziałowego, chociaż w trakcie interfazy nie wykazywały związku z mikrotubulami. Podczas telofazy większość proteasomów pozostawała w pobliżu chromatyny, zaś na początku interfazy ich większość znajdowała się w jądrze, skąd powoli przemieszczały się do cytoplazmy. Indukcja różnicowania się tych komórek za pomocą forskoliny, zwiększającej poziom cAMP, powodowała zmniejszenie się ilości proteasomów w komórkach [6].

W komórkach interfazowych proteasomy występują zarówno na terenie jądra, jak i cytoplazmy. Ich zawartość w jądrze waha się od 17% w hepatocytach szczura do 51% całkowitej ilości proteasomów w komórkach L-132. W hepatocytach do 14% proteasomów wiąże się ze strukturami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Pozostałe są rozproszone w cytoplazmie lub związane z polisomami. Na terenie jądra, proteasomy lokalizują się w euchromatynie oraz na obwodzie heterochromatyny i jąder [73].

Wykazano w badaniach przeprowadzonych metodą immunofluorescencji z użyciem surowic poliklonalnych na komórkach HeLa i PtK2 hodowanych *in vitro* fluktuację rozmieszczenia antygenów proteasomalnych w komórce w zależności od różnych faz cyklu komórkowego. Jądro komórkowe wybarwiało się w fazach G1 i S raczej słabo i wykazywało dyskretne skupienia proteasomów. W miarę progresji przez fazę G2 barwienie robiło się coraz to intensywniejsze i rozmyte. W cytoplazmie proteasomy lokalizowały się wokół jądra w postaci bardziej rozproszonej w fazie G1 i bardziej zebranej w dyskretne skupienia w fazie S, po czym przesunęły się na obwód w miarę progresji przez fazę G2. W czasie tej ostatniej wykazywały kolokalizację z filamentami cytokeratynowymi. Zmianom lokalizacji proteasomów w przebiegu cyklu komórkowego nie towarzyszyły zmiany całkowitej zawartości proteasomów w komórce lub ich składu podjednostkowego [66].

Badania przeprowadzone na komórkach HeLa metodą immunofluorescencji za pomocą przeciwciał monoklonalnych w przypadku komórek interfazowych wykazały jednorodnie wybarwienie jądra i cytoplazmy bez zmian zależnych od cyklu komórko-

wego. Dopiero ekstrakcja większości proteasomów za pomocą Tritonu X-100 ujawniła, iż obecność wewnątrzjądrowej frakcji proteasomów odpornej na ekstrakcję charakteryzuje komórki w fazie G2 cyklu komórkowego [97, 98]. W przypadku komórek mitotycznych, ekstrakcja Tritonem X-100 ujawniła powiązanie proteasomów z biegunami wrzeciona podziałowego w prometafazie i metafazie, z regionem wrzeciona pomiędzy oddalającymi się grupami chromosomów w anafazie i z ciałkiem pośredkowym (*midbody*) w telofazie [97, 98].

W przebiegu cyklu komórkowego u zachwy *Halocynthia roretzi* stwierdzono natomiast, że poza zmianą położenia, również aktywność chymotrypsynowa proteasomów 20S ulega oscylacji. Jest ona największa w profazie i w metafazie [44]. W odróżnieniu od powyższych doniesień, nie stwierdzono żadnych zmian w dystrybucji proteasomów w przebiegu cyklu komórkowego u *Dictyostelium discoideum* [77].

U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykryto 14 genów kodujących podjednostki proteasomów, z czego co najmniej 7 jest niezbędnych do wzrostu komórek. Delecja takich genów, jak PRS1, 2 czy 3, jest letalna [34,49]. Z kolei zmutowany gen PRG1 powoduje defekt aktywności chymotrypsynowej proteasomów oraz upośledzony podział jądra komórkowego z częstszą utratą chromosomów. Delecja genu dla cykliny mitotycznej CLB2 powoduje supresję tego fenotypu, co można wytłumaczyć, przyjmując iż proteasomy są odpowiedzialne za degradację białka CLB2 [21,72].

Działanie na komórki HeLa specyficznym inhibitorem aktywności chymotrypsynowej proteasomów *N*-benzyloksykarbonyl-izoleucyl-glutamyl-(*O*-*t*-butyl)-alanyl-leucynalem [20] wywołuje blok cyklu komórkowego w fazie G2 oraz w metafazie [98,99].

W proliferujących komórkach białaczkowych pobranych od pacjentów stwierdza się wyższy poziom proteasomów oraz mRNA dla ich podjednostek w porównaniu z prawidłowymi komórkami jednojądrzastymi uzyskanymi z krwi obwodowej. Gdy jednak na te ostatnie zadziałać mitogenami, takimi jak np. fitohemaglutynina, następuje szybki wzrost obydwu tych parametrów. Świadczy to o udziale proteasomów w procesach komórkowych związanych z proliferacją [47,83]. Zwiększenie poziomu mRNA dla podjednostek typu α i β proteasomów stwierdzono także w przypadku pobudzonych do proliferacji komórek roślinnych. Zwiększenie to następowało wcześniej w fazie G₁, jeszcze przed wzrostem zawartości mRNA dla histonów [26].

Badania nad oogenezą i wczesnym cyklem zarodkowym myszy sugerują powiązanie układu degradującego cykliny – a więc najprawdopodobniej proteasomów – z wrzecionem podziałowym i możliwość jego czasowego unieczynnienia poprzez działanie czynnika cytostatycznego (CSF). Ten ostatni odpowiedzialny jest za utrzymanie wysokiego poziomu MPF-u podczas zablokowania cyklu w metafazie II podziału mejotycznego [52]. Również proces dojrzewania oocytów wydaje się być zależny od proteasomów, gdyż działanie typowym inhibitorem proteaz serynowych, jakim jest diizopropylfluorofosforan (DFP), na oocyty ropuchy *Bufo japonicus* zapobiega aktywacji MPF i co za tym idzie rozpadowi otoczki jądrowej pomimo stymulacji progesteronem. Aktywność proteolityczna w oocytach nie poddanych

działaniu DFP wzrasta w dwóch momentach: bezpośrednio przed i bezpośrednio po rozpadzie otoczki jądrowej pęcherzyka zarodkowego. Stwierdza się również zmianę ruchliwości elektroforetycznej podjednostek proteasomów w miarę dojrzewania oocytów, co świadczy o ich modyfikacjach potranslacyjnych [84].

ROLA PROTEASOMÓW W ROZWOJU I RÓŻNICOWANIU TKANKOWYM

Zawartość proteasomów różni się w komórkach pochodzących z różnych tkanek. Liczba proteasomów jest duża w komórkach o intensywnym metabolizmie, takich jak np. hepatocyty, jak również w tkankach nowotworowych i zarodkowych. W zróżnicowanych tkankach proteasomy mogą pełnić swoiste tkankowo funkcje, np. w plemnikach stwierdzono obecność proteasomów, które lokalizują się wzdłuż witki. Wydaje się to mieć znaczenie dla właściwej ruchliwości plemników, gdyż jest ona upośledzona po działaniu inhibitorów proteolizy [37].

Stwierdzono zmianę aktywności proteolitycznej proteasomów 20S w stosunku do różnych substratów w czasie miogenezy u kurcząt. Malą aktywność chymotrypsynowa i trypsynowa, natomiast rosła zdolność do degradacji kazeiny. Analogiczne zmiany występowały także w przypadku proteasomów izolowanych z rozwijającej się wątroby, lecz nie stwierdzono ich w przypadku próbek tkanki nerwowej. Na podstawie analizy dwuwymiarowej elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, stwierdzono również zmiany w składzie podjednostkowym proteasomów 20S, zwłaszcza dotyczących mniej obficie występujących podjednostek. Zmiany te najprawdopodobniej wiążą się nie ze zmianą ekspresji odpowiednich genów, lecz z modyfikacjami posttranslacyjnymi i zapewne wykazują korelację ze zmianą aktywności proteolitycznej [1]. Podobne wnioski wysnuto na podstawie badań składu proteasomów w trakcie rozwoju zarodkowego *Drosophila melanogaster* [32].

Wolne proteasomy występują normalnie w osoczu krwi ludzkiej a wzrost ich zawartości jest charakterystyczny dla chorób wątroby i chorób rozrostowych układu krwionośnego. Wiąże się to prawdopodobnie z wzmożonym rozpadem komórek zawierających duże ilości proteasomów, takich jak hepatocyty lub blasty białaczkowe. Stwierdzono występowanie w surowicy przeciwciał przeciwko podjednostkom proteasomów u niektórych pacjentów z liszajem rumieniowatym układowym (SLE) [63].

ROLA PROTEASOMÓW W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM

Dwa geny dla ludzkich podjednostek proteasomów lokują się w obrębie regionu kodującego MHC klasy II (LMP2, LMP7), co pośrednio świadczy o ich znaczeniu dla układu immunologicznego. LMP2 wykazuje silny polimorfizm, a ekspresja LMP2 i LMP7 ulega indukcji przez interferon γ [4,100]. Są to cechy charakterystyczne dla genów ważnych w funkcjonowaniu genów związanych z MHC [23,28].

Pod wpływem działania interferonu γ nie zmienia się całkowita ilość proteasomów w komórkach, lecz ulega zmianie ich skład podjednostkowy. Dotyczy to jednak wyłącznie nowosyntetyzowanych proteasomów [3]. LMP2 jest wbudowywane zamiast podjednostki 2 (zwanej też X lub MB1), a LMP7 zamiast podjednostki 10 (zwanej też Y lub Delta), ludzkich proteasomów [5,9,22]. LMP2 występować może w proteasomach w dwóch różnych formach, LMP2a i LMP2b, pozbawione dwudziestu N-terminalnych aminokwasów [67]. Wbudowanie się LMP2 do proteasomów osłabia aktywność peptydylglutamylpeptydową, wzmacnia trypsynową i nie zmienia chymotrypsynowej, zaś wbudowanie LMP7 wzmacnia aktywność chymotrypsynową i trypsynową, nie zmieniając peptydylglutamylpeptydowej. Faworyzuje to powstawanie peptydów z resztami zasadowymi i hydrofobowymi na końcach karboksylowych, a więc takich, które wiążą się z MHC klasy I [24].

Interferon γ wywiera również działanie na izolowane proteasomy 20 S. Stymuluje on wytwarzanie przez nie *in vitro* okta- i nonapeptydów z substratów białkowych, a wiadomo, że właśnie peptydy tej wielkości łączą się najczęściej z MHC klasy I. Interferon γ stymuluje aktywności chymotrypsynową i trypsynową proteasomów 20S, obniża aktywność peptydylglutamylpeptydową, a nie zmienia aktywności proteolizy zależnej od ATP i ubikwityny proteasomów 26S [3,74]. Przypuszcza się, że interferon γ oddziałuje na zasadzie regulatora allosterycznego, powodując odpowiednią zmianę odległości pomiędzy centrami aktywnymi w proteasomie, bezpośrednio lub poprzez czynnik regulujący.

Powstające w pewnych regionach cytoplazmy peptydy antygenowe ulegają przekazaniu w obręb szorstkiej siateczki śródplazmatycznej za pomocą specjalnych białek transporterowych TAP, a następnie w jej obrębie powstają ich kompleksy z MHC klasy I [75]. Wykryto jednak również populację proteasomów bezpośrednio związanych z szorstką siateczką śródplazmatyczną. Różnią się one składem od proteasomów cytoplazmatycznych [23,28,73].

Ostateczna rola proteasomów w prezentacji antygenów związanych z MHC klasy I nie jest jednak do końca ustalona. Myszy ze znokautowanym genem LMP7 mają obniżoną ekspresję MHC klasy I na powierzchni splenocytów i nieefektywnie prezentują antygen HY. Dostarczenie splenocytom gotowych peptydów przywraca normalny poziom ekspresji MHC klasy I [19]. Z drugiej jednak strony, komórki pozbawione zarówno LMP2 jak i LMP7 oraz innych genów z regionu MHC klasy II poza TAP1 i TAP2 były w pełni zdolne do prezentacji różnych antygenów wirusowych w kontekście MHC klasy I [101]. Być może ma to związek z ekspresją homologicznych do LMP2 i 7 podjednostek MB1 i Delta proteasomów [9].

PROSOMY CZY PROTEASOMY?

Do dnia dzisiejszego brak jest zgody, czy proteasomy są *de novo* odkrytymi prosomami, czy też całkowicie odmiennymi organelami. Prosomy są to występujące powszechnie w komórkach eukariotycznych kompleksy rybonukleoprotein (RNP),

wykryte już pod koniec lat sześćdziesiątych w obrazach z mikroskopu elektronowego [33,42,59,79,85]. Mają na nich charakterystyczny kształt, porównywany do owoców maliny bądź morwy, który przypomina wygląd proteasomów. Prosomy mają średnicę 12 nm, względną masę cząsteczkową 650 kDa i stałą sedymentacji 19S. Ich skład jest dość zmienny. Zbudowane są w ok. 85% z białek (ok. 25 podjednostek o masach pomiędzy 21 a 35 kDa, z których najpowszechniejsze jest białko p27) oraz w 15% z RNA [53,79]. Opisano także szczególny prosom, będący homooligomerem białka o masie 21 kDa [2]. O tym jak trudno wyrobić sobie opinię o naturze tych organeli, świadczy fakt, że podczas gdy część badaczy twierdzi, iż prosomy są bardzo stabilnymi kompleksami RNP [29,60], to inna uważa, iż obecność RNA wynika tylko z zanieczyszczeń spowodowanych niedokładną preparatyką i że prosomy są artefaktem powstałym z proteasomów zmieszanych z innymi frakcjami [8].

Prosomalny RNA (pRNA) składa się z krótkich (80–150 par zasad) odcinków, które łatwo ulegają dysocjacji bądź zniszczeniu w procesie oczyszczania prosomów z lizatów komórkowych. Wyjątkową cechą pRNA jest jego powinowactwo do mRNA, które powoduje, iż w systemach *in vitro* obecność pRNA blokuje translację. Fakt ten sugeruje tworzenie przez prosomy większych kompleksów RNP mających znaczenie w regulacji posttranslacyjnej ekspresji różnych białek. Opisano również cząstkę o wyglądzie prosomu związaną z obróbką pre-tRNA [12], a ostatnio wykazano, że większość RNA związanego z prosomami nie stanowi pRNA, lecz tRNA dla lizyny - tRNA^{Lys,3} [58].

Na korzyść hipotezy uczestnictwa prosomów w regulacji posttranslacyjnej ekspresji białek przemawia fakt, że w przebiegu oogenezy kręgowców prosomy akumulują się w cytoplazmie, jednak w miarę dojrzewania oocyty przemieszczają się do pęcherzyka zarodkowego. Ponieważ oocyty nie wytwarzają prosomów, pochodzą one prawdopodobnie z komórek ziarnistych [25]. Po zapłodnieniu bruzdkujące zarodki traszki *Pleurodeles waltii* nie wytwarzają prosomów aż do gastrulacji. W czasie bruzdkowania aż do stadium średniozaawansowanej blastuli antygeny prosomalne lokalizują się w cytoplazmie i przy błonie komórkowej, podczas gdy w późniejszych stadiach przemieszczają się do jąder komórkowych. Jeden z antygenów prosomalnych, p31, w stadium blastuli gromadzi się w komórkach prospektywnej ektodermy na biegunie animalnym, zaś w stadium neuruli jest nieobecny w komórkach neuroektodermalnych. W miarę dalszego rozwoju i różnicowania się zarodka antygeny prosomalne ponownie gromadzą się w cytoplazmie. Widać to wyraźnie w przypadku naskórka, gdzie niezróżnicowane komórki warstwy podstawnej mają antygeny prosomalne zlokalizowane w jądrze komórkowym, zaś w miarę różnicowania się przechodzą one w obręb cytoplazmy [64]. Podobna zmiana lokalizacji prosomów występuje również w przebiegu terminalnego różnicowania się erytroblastów [31]. Natomiast w przebiegu organogenezy wątroby u płodów szczurzych obserwuje się specyficzną lokalizację prosomalnego antygeny p31 w okolicy cytoplazmy hepatocytów otaczającej pierwotne przewodniki żółciowe, podczas gdy we wcześniejszych

stadiach rozwojowych antygen ten obecny był w całej cytoplazmie [10]. Analogiczne do zmian u *P. waltii* zmiany wykazano w przebiegu wczesnej embriogenezy kurczęcia [65].

Prosome występują zarówno na obszarze cytoplazmy, jak i w jądrze komórkowym, gdzie jest ich jednak znacznie mniej. Koncentrują się tam głównie w nukleoplazmie, słabiej się wiążą natomiast z chromatyną. [30]. W cytoplazmie prosomy wiążą się natomiast z siecią filamentów cytokeratynowych i w mniejszym stopniu wimentynowych [29], podobnie jak to wykazano dla proteasomów [66]. Różne antygeny prosomalne wiążą się z różnymi obszarami sieci filamentów pośrednich, tworząc swoiste "podsieci". Może to mieć znaczenie w lokalizacji odpowiednich mRNA w różnych obszarach komórki [7,29,30,61]. Niejasne jest znaczenie występowania prosomów we wspólnych kompleksach z niektórymi białkami szoku cieplnego, stwierdzone w hodowanych *in vitro* komórkach muszki owocowej [54].

PODZIĘKOWANIA

Napisanie tej pracy stało się możliwe w dużej mierze dzięki pobytowi w laboratorium kierowanym przez prof. N. Paweltza w Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg, RFN). Pobyt sponsorowany został przez Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, Bonn, RFN). Autor niniejszym wyraża swą wdzięczność prof. N. Paweltzowi oraz DAAD.

LITERATURA

- [1] AHN JY, HONG SO, KWAK KB, KANG SS, TANAKA K, ICHIHARA A, HA DB, CHUNG CH: Developmental regulation of proteolytic activities and subunit pattern of 20 S proteasome in chick embryonic muscle. *J Biol Chem* 1991; **266**: 15746–15749.
- [2] AKHAYAT O, INFANTE AA, INFANTE D, MARTINS DE SA C, GROSSI DE SA MF, SCHERRER K: A new type of prosome-like particle composed of small cytoplasmic RNA and multimers of a 21 kDa protein, inhibits protein synthesis *in vitro*. *Eur J Biochem* 1987; **170**: 23–33.
- [3] AKI M, SHIMBARA N, TAKASHINA M, AKIYAMA K, KAGAWA S, TAMURA T, TANAHASHI N, YOSHIMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A: Interferon- induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1994; **115**: 257–269.
- [4] AKI M, TAMURA T, TOKUNAGA F, IWANAGA S, KAWAMURA Y, SHIMBARA N, KAGAWA S, TANAKA K, ICHIHARA A. cDNA cloning of rat proteasome subunit RC1, a homologue of RING10 located in the human MHC class II region. *FEBS Letters* 1992; **301**: 65–68.
- [5] AKIYAMA KY, YOKOTA KY, KAGAWA S, SHIMBARA N, TAMURA T, ANIOKA H, NOTHWANG HG, NODA C, TANAKA K, ICHIHARA A. cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. *Science* 1994; **265**: 1231–1234.
- [6] AMSTERDAM A, PITZER F, BAUMEISTER W. Changes in intracellular localization of proteasomes in immortalized ovarian granulosa cells during mitosis associated with a role in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 99–103.

- [7] ARCANGELETTI C, OLINK-COUX M, MINISINI R, HUESCA M, CHEZZI C, SCHERRER K. Patterns of cytodistribution of prosomal antigens on the vimentin and cytokeatin networks of monkey kidney cells. *Eur J Cell Biol* 1992; **59**: 464–470.
- [8] ARRIGO AP, TANAKA K, GOLDBERG AL, WELCH WJ. Identity of the 19S “prosome” particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 1988; **331**: 192–194.
- [9] BELICH MP, GLYNNE RJ, SENGER G, SHEER D, TROWSDALE J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 1994; **4**: 769–776.
- [10] BRIANE DM, OLINK-COUX J, VASSY O, OUDAR M, HUESCA K, SCHERRER K, FOUCHER J. Immunolocalization of a specific type of prosome close to the bile canaliculi in fetal and adult rat liver. *Eur J Cell Biol* 1992; **57**: 30–39.
- [11] BROWN KD, COULSON RMR, YEN TJ, CLEVELAND DW. Cyclin-like accumulation and loss of the putative kinetochore motor CENP-E results from coupling continuous synthesis with specific degradation at the end of mitosis. *J Cell Biol* 1994; **125**: 1303–1312.
- [12] CASTANO JG, ORNBERG R, KOSTER JG, TOBIAN J, ZASLOFF M. Eukaryotic pre-tRNA 5' processing nuclease: co-purification with a cylindrical particle. *Cell* 1986; **46**: 377–387.
- [13] CIECHANOVER A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell* 1994; **79**: 13–21.
- [14] CIECHANOVER AJ, DI GIUSEPPE JA, BERCOVICH B, ORIAN A, RICHTER JD, SCHWARTZ AL, BRODEUR GM. Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 139–143.
- [15] COOK JC, CHOCK PB. Association of ubiquitin-activating enzyme with HeLa cell chromosomes during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11388–11392.
- [16] DEMARTINO GN, MOOMAW CR, ZAGNITKO OP, PROSKE RJ, CHUPING M, AFENDIS SJ, SWAFFIELD JC, SLAUGHTER CA. PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem* 1994; **269**: 20878–20884.
- [17] DEVERAUX Q, USTRELL U, PICKART C, RECHSTEINER M. A 26S protease subunit that bind ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 1994; **269**: 7059–7061.
- [18] EARNSHAW WC, MCKAY AM. Role of nonhistone proteins in the chromosomal events of mitosis. *FASEB J* 1994; **8**: 947–956.
- [19] FEHLING HJ, SWAT W, LAPLACE C, KUHN R, RAJEWSKY K, MÜLLER U, VON BOEHMER H. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP7. *Science* 1994; **265**: 1234–1237.
- [20] FIGUEIREDO-PEREIRA ME, BERG KA, WILK S. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity in the Multicatalytic Proteinase Complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J Neurochem* 1994; **63**: 1578–1581.
- [21] FRIEDMAN H, SNYDER M. Mutations in PRG1, a yeast proteasome-related gene, cause defects in nuclear division and are suppressed by deletion of a mitotic cyclin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2031–2035.
- [22] FRÜH K, GOSSEN M, WANG K, BUJARD H, PETERSON PA, YANG Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J* 1994; **13**: 3236–3244.
- [23] FRÜH K, YANG Y, ARNOLD D, CHAMBERS J, WU L, WATERS JB, SPIES T, PETERSON PA. Alternative exon usage and processing of the major histocompatibility complex-encoded proteasome subunits. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22131–22140.
- [24] GACZYNSKA M, ROCK KL, SPIES T, GOLDBERG AL. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9213–9217.

- [25] GAUTIER J, PAL JK, GROSSI DE SA MF, BEETSCHEN JC, SCHERRER K Differential cytolocalization of prosomes in axolotl during oogenesis and meiotic maturation. *J Cell Sci* 1988; **90**: 543–553.
- [26] GENSCHIK P, JAMET E, PHILIPPS G, PARMENTIER Y, CIGOT C, FLECK J. "Molecular characterization of a β -type proteasome subunit from *Arabidopsis thaliana* co-expressed at a high level with an α -type proteasome subunit early in the cell cycle. *Plant J* 1994; **6**: 537–546.
- [27] GLOTZER M, MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [28] GOLDBERG AL, ROCK KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; **357**: 375–378.
- [29] GROSSI DE SA MF, MARTINS DE SA C, HARPER F, OLINK-COUX M, HUESCA M, SCHERRER K. The association of prosomes with some of the intermediate filament networks of the animal cell. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1517–1530.
- [30] GROSSI DE SA MF, MARTINS DE SA C, HARPER F, COUX O, AKHAYAT O, PAL JK, FLORENTIN Y, SCHERRER K. Cytolocalization of prosomes as a function of differentiation. *J Cell Sci* 1988; **89**: 151–165.
- [31] GRZIWA A, MAACK S, PUHLER G, WIEGAND G, BAUMEISTER W, JAENICKE R. Dissociation and reconstitution of the *Thermoplasma proteasome*. *Eur J Biochem* 1994; **223**: 1061–1067.
- [32] HAAS C, KLOETZEL PM. The *Drosophila* proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development. *Exp Cell Res* 1989; **180**: 243–252.
- [33] HARRIS JR. Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghost. *J Mol Biol* 1968; **46**: 329–335.
- [34] HEINEMEYER W, TRONDLE N, ALBRECHT G, WOLF DH. PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry* 1994; **33**: 12229–12237.
- [35] HOFFMAN L, PRATT G, RECHSTEINER M. Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22362–22368.
- [36] HOLLOWAY SL, GLOTZER M, KING RW, MURRAY AW. Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of Maturation Promoting Factor. *Cell* 1993; **73**: 1393–1402.
- [37] INABA K, AKAZOME Y, MORISAWA M. Purification of proteasomes from salmonid fish sperm and their localization along sperm flagella. *J Cell Sci* 1993; **104**: 907–915.
- [38] ISHIDA N, TANAKA K, TAMURA T, NISHIZAWA M, OKAZAKI K, SAGATA S, ICHIHARA A. Mos is degraded by the 26S proteasome in a ubiquitin-dependent fashion. *FEBS Lett* 1993; **324**: 345–348.
- [39] JENNISSEN HP, BOTZET G, MAJETSCHAK M, LAUB, ZIEGENHAGEN R, DEMIROGLOU A. Ca^{2+} -dependent ubiquitination of calmodulin in yeast. *FEBS Lett* 1992; **296**: 51–56.
- [40] JENTSCH S. The Ubiquitin-Conjugation System. *Ann Rev Genet* 1992; **26**: 179–207.
- [41] JENTSCH S. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. *T in Cell Biol* 1992; **2**: 98–103.
- [42] KALTOFT MB, KOCH C, UERKVITZ W, HENDIL KB. Monoclonal antibodies to the human multicatalytic proteinase (proteasome). *Hybridoma* 1992; **11**: 507–517.
- [43] KANAYAMA HO, TAMURA T, UGAI S, KAGAWA S, TANAHASHI N, YOSHIMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A. Demonstration that a human 26S proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms. *Eur J Biochem* 1992; **206**: 567–578.
- [44] KAWAHARA H, SAWADA H, YOKOSAWA H. The 26S proteasome is activated at two points in the ascidian cell cycle. *FEBS Lett* 1992; **310**: 119–122.

- [45] KOPP F, DAILMANN B, HENDIL KB. Evidence Indicating that the Human Proteasome is a Complex Dimer. *J Mol Biol* 1993; **229**: 14–19.
- [46] KOPP F, STEINER R, DAHLMANN B, KUEHN L, REINAUER H. Size and shape of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle. *Bioch Biophys Acta* 1986; **872**: 253–260.
- [47] KUMATORI A, TANAKA K, INAMURA N, SONE S, OGURA T, MATSUMOTO T, TACHIKAWA T, SHIN S, ICHIHARA A. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7071–7075.
- [48] LAUB M, JENNISSEN HP. Ubiquitination of endogenous calmodulin in rabbit tissue extracts. *FEBS Lett* 1991; **294**: 229–233.
- [49] LEE DH, TANAKA K, TAMURA T, CHUNG CH, ICHIHARA A. PRS3 Encoding an Essential Subunit of Yeast Proteasomes Homologous to Mammalian Proteasome Subunit C5. *Bioch Biophys Res Comm* 1992; **182**: 452–460.
- [50] LEIBOVITZ D, KOCH Y, PITZER F, FRIDKIN M, DANTES A, BAUMEISTER W, AMSTERDAM A. Sequential degradation of the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone by the 20S granulosa cell proteasomes. *FEBS Lett* 1994; **346**: 203–206.
- [51] MAJETSCHAK M, LAUB M, JENNISSEN HP. A ubiquityl-calmodulin synthetase that effectively recognizes the Ca^{2+} -free form of calmodulin. *FEBS Lett* 1993; **315**: 347–352.
- [52] MARO B, KUBIAK JZ, VERLHAC MH, WINSTON NJ. Interplay between the cell cycle control machinery and the microtubule network in mouse oocytes. *Sem in Devl Biol* 1994; **5**: 191–198.
- [53] MARTINS DE SA C, GROSSI DE SA MF, AKHAYAT O, BRODERS F, SCHERRER K. Prosomes. Ubiquity and Inter-species structural variation. *J Mol Biol* 1986; **187**: 479–493.
- [54] MARTINS DE SA C, ROLLET E, GROSSI DE SA MF, TANGUAY RM, BEST-BELPOMME M. Prosomes and heat shock complexes in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 2672–2681.
- [55] MAYER RJ, DOHERTY FJ. Ubiquitin. *Essays Biochem* 1992; **27**: 37–48.
- [56] MIYAZAWA K, TOYAMA K, GOTOH A, HENDRIE PC, MANTEL C, BROXMEYER HE. Ligand-dependent polyubiquitination of c-kit gene product: a possible mechanism of receptor down-regulation in MO7e cells. *Blood* 1994; **83**: 137–145.
- [57] MURAKAMI Y, MATSUFUJI S, KAMEJI T, HAYASHI S, IGARASHI K, TAMURA T, TANAKA K, ICHIHARA I. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992; **360**: 597–599.
- [58] NOTHWANG HG, COUX O, KEITH G, SILVA-PEREIRA I, SCHERRER K. The major RNA in prosomes of HeLa cells and duck erythroblast is tRNA^{Lys,3}. *Nucl Acids Res* 1992; **20**: 1959–1965.
- [59] NOTHWANG HG, COUX O, BEY F, SCHERRER K. Prosomes and their multicatalytic proteinase activity. *Eur J Biochem* 1992; **207**: 621–630.
- [60] NOTHWANG HG, COUX O, BEY F, SCHERRER K. Disruption of prosomes by some bivalent metal ions results in the loss of their MCP activity and cancels the nuclease resistance of prosomal RNA. *Biochem J* 1992; **287**: 733–739.
- [61] OLINK-COUX M, HUESCA M, SCHERRER K. Specific types of prosomes are associated to subnetworks of the intermediate filaments in PtK1 cells. *Eur J Cell Biol* 1992; **59**: 148–159.
- [62] ORLOWSKI M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990; **29**: 10289–10297.
- [63] ORLOWSKI M. The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: Diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med* 1993; **121**: 187–189.
- [64] PAL JK, GOUNON P, GROSSI DE SA MF, SCHERRER K. Presence and distribution of specific prosome antigens change as a function of embryonic development and tissue-type differentiation in *Pleurodeles waltii*. *J Cell Sci* 1988; **90**: 555–567.
- [65] PAL JK, MARTINS DE SA C, SCHERRER K. Differential synthesis and cytolocalization of prosomes in chick embryos during development. *Int J Dev Biol* 1994; **38**: 525–534.

- [66] PALMER A, MASON GF, PARAMIO JM, KNECHT E, RIVETT AJ. Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur J Cell Biol* 1994; **64**: 163–175.
- [67] PATEL SD, MONACO JJ, MCDEVITT HO. Delineation of the subunit composition of human proteasomes using antisera against the MHC-encoded LMP2 and LMP7 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 296–300.
- [68] PETERS JM. Proteasomes: protein degradation machines of the cell. *Trends in Biochem Sci* 1994; **19**: 377–382.
- [69] PETERS JM, CEJKA Z, HARRIS JR, KLEINSCHMIDT JA, BAUMEISTER W. Structural features of the 26S proteasome complex. *J Mol Biol* 1993; **234**: 932–937.
- [70] PETERS JM, HARRIS JR, KLEINSCHMIDT JA. Ultrastructure of the 26S complex containing the 20S cylinder particle (multicatalytic proteinase/proteasome). *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 422–432.
- [71] PÜHLER G, PITZER F, ZWICKL P, BAUMEISTER W. Proteasomes: multisubunit proteinases common to *Thermoplasma* and Eukaryotes. *System Appl Microbiol* 1994; **16**: 734–741.
- [72] RICHTER-RUOFF B, WOLF DH. Proteasome and cell cycle: evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *FEBS Lett* 1993; **336**: 34–36.
- [73] RIVETT AJ, PALMER A, KNECHT E. Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1165–1172.
- [74] ROCK KL, GRAMM C, ROTHSTEIN L, CLARK K, STEIN R, DICK L, HWANG D, GOLDBERG AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC Class I molecules. *Cell* 1994; **78**: 761–771.
- [75] RÖMISCH K. Peptide traffic across the ER membrane: TAPs and other conduits. *Trends in Cell Biol* 1994; **4**: 311–314.
- [76] SAWADA H, MUTO K, FUJIMORO M, AKASHI T, SAWADA MT, YOKOSAWA H, GOLDBERG AL. Different ratios in 20S proteasomes and regulatory subunit complexes in two isoforms of the 26S proteasome purified from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; **335**: 207–212.
- [77] SCHAUER TM, NESPER M, KEHL M, LOTTSPREICH F, MÜLLER-TAUBENBERGER A, GERISCH G, BAUMEISTER W. Proteasomes from *Dictyostelium discoideum*: Characterization of structure and function. *J Struct Biol* 1993; **111**: 135–137.
- [78] SCHEFFNER M, WERNES BA, HUIBREGTSE JM, LEVINE AJ, HOWLEY PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; **63**: 1129–1136.
- [79] SCHERRER K. Prosome, subcomplexes of untranslated mRNP. *Mol Biol Reprod* 1990; **14**: 1–9.
- [80] SCHNALL R, MANNHAUPT G, STUCKA R, TAUER R, EHNLE S, SCHWARZLOS E, VETTER I, FELDMANN H. Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast* 1994; **10**: 1141–1155.
- [81] SCHORK SM, BEE G, THUMM M, WOLF DH. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* 1994; **349**: 270–274.
- [82] SEUFERT W, JENTSCH S. *In vivo* function of the proteasome in the ubiquitin pathway. *EMBO J* 1992; **11**: 3077–3080.
- [83] SHIMBARA N, ORINO E, SONE S, OGURA T, TAKASHINA M, SHONO M, TAMURA T, YASUDA H, TANAKA K, ICHIHARA A. Regulation of gene expression of proteasomes (multi-protease complexes) during growth and differentiation of human hematopoietic cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18100–18109.
- [84] TAKAHASHI M, TOKUMOTO T, ISHIKAWA K. DFP-sensitive multicatalytic protease complexes (prosome) involved in the control of oocyte maturation in the toad, *Bufo japonicus*. *Mol Reprod Dev* 1994; **38**: 310–317.

- [85] TANAKA K, TAMURA T, YOSHIMURA T, ICHIHARA A. Proteasomes: Protein and Gene Structures. *New Biologist* 1992; **4**: 173–187.
- [86] TANAKA K, ICHIHARA A, WAXMAN L, GOLDBERG AL. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties and tissue distribution. *J Biol Chem* 1986; **261**: 15197–15203.
- [87] TANAKA K, YOSHIMURA T, KUMATORI A, ICHIHARA A, IKAI A, NISHIGAI M, KAMEYAMA K, TAKAGI T. Proteasomes (multi-protease complexes) as 20S ring-shaped particles in a variety of eukaryotic cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16209–16217.
- [88] TOKUMOTO T, ISHIKAWA K. 20S latent proteasomes isolated from the cytosol of *Xenopus* oocytes: purification and partial characterization. *Biomed Res* 1993; **14**: 391–401.
- [89] TOKUNAGA F, GOTO T, KOIDE T, MURAKAMI Y, HAYASHI S, TAMURA T, TANAKA K, ICHIHARA A. ATP- and antizyme-dependent endoproteolysis of ornithine decarboxylase to oligopeptides by the 26S proteasome. *J Biol Chem* 1994; **269**: 17382–17385.
- [90] TREIER M, STASZEWSKI LM, BOHMANN D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the δ domain. *Cell* 1994; **78**: 787–798.
- [91] TSUBUKI S, KAWASAKI H, SAITO Y, MIYASHITA N, INOMATA M, KAWASHIMA S. Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; **196**: 1195–1201.
- [92] UGAI SI, TAMURA T, TANAHASHI N, TAKAI S, KOMI N, CHUNG CH, TANAKA K, ICHIHARA A. Purification and characterization of the 26S proteasome complex catalyzing ATP-dependent breakdown of ubiquitin-ligated proteins from rat liver. *J Biochem* 1993; **113**: 754–768.
- [93] WAXMAN L, FAGAN JM, GOLDBERG AL. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem* 1987; **262**: 2451–2457.
- [94] WENZEL T, ECKERSKORN C, LOTTSPREICH F, BAUMEISTER W. Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett* 1994; **349**: 205–209.
- [95] WILK S, ORLOWSKI M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem* 1980; **35**: 1172–1182.
- [96] WÓJCIK C. Mechanizmy regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 331–352.
- [97] WÓJCIK C, PAWELETZ N, SCHROETER D. Localization of proteasomal antigens during different phases of the cell cycle in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* accepted
- [98] WÓJCIK C, PAWELETZ N, SCHROETER D. Relationship between the cell cycle and the proteasomes (multicatalytic proteinase complexes) in HeLa cells. *Eur J Cell Biol* 1995; **Suppl**: 124.
- [99] WÓJCIK C, SCHROETER D, STOEHR M, WILK S, PAWELETZ N. An inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) affects cell cycle progression in HeLa cells. *J Cell Sci* submitted.
- [100] YANG Y, WATERS JB, FRUH K, PETERSON P.A. Proteasomes are regulated by interferon: Implications for antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4928–4932.
- [101] ZHOU XZ, MOMBURG F, LIU TM, MOTAL UMA, JONDAL M, HAMMERLING GJ, LJUNGGREN HG. Presentation of viral antigens restricted by h-2k(b), d-b or k-d in proteasome subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1863–1868.

Otrzymano: 15.11.1994 r.

Przyjęto: 30.06.1995 r.

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

PROTEOGLIKANY: STRUKTURA I BIOSYNTeza

PROTEOGLYCANS: STRUCTURES AND BIOSYNTHESIS

Iwona ŻAK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii Śląskiej Akademii Medycznej, Katowice

Streszczenie. W przeglądzie omówiono podstawy klasyfikacji oraz przykłady reprezentatywnych proteoglikanów. Ponadto, praca eksponuje model biosyntezy proteoglikanów w formie prekursorowych glikoprotein, rolę inhibitorów glikozylacji i środkomórkowego transportu pęcherzykowego oraz biosyntetyczne podstawy heterogenności łańcuchów glikozoaminoglikanowych.

Słowa kluczowe: glukozaaminoglikany, galaktozaaminoglikany, białka mozaikowe, N-, O-glikozylacja, sulfonowanie, inhibitory glikozylacji, brefeldyna A, aparat Golgiego.

Summary. The basis of classification and the examples of representative proteoglycans were discussed in the review. Moreover, the review exposes the model of proteoglycans biosynthesis in the form of precursor glycoproteins, the role of glycosylation inhibitors and intracellular vesicle transport inhibitors and the biosynthetic bases of glycosaminoglycan chains heterogeneity.

Key words: glucosaminoglycans, galactosaminoglycans, mosaic proteins, N-, O-glycosylation, sulfation, glycosylation inhibitors, brefeldin A, Golgi apparatus.

Wykaz głównych skrótów: PG – proteoglikany, GAG – glikozoaminoglikany, KS – siarczan keratanu, CS – siarczan chondroityny, HS – siarczan heparanu, DS – siarczan dermatanu, CCP (*complement controlling protein*) – białko kontrolujące dopełniacz, HSPG – proteoglikan siarczanu heparanu, CSPG – proteoglikan siarczanu chondroityny, DSPG – proteoglikan siarczanu dermatanu, KSPG – proteoglikan siarczanu keratanu.

Proteoglikany (PG) należą do glikoprotein, najpowszechniejszych białek zwierzęcych, wśród których wyróżniają się specyficznością jednostek polisacharydowych zwanych glikozoaminoglikanami (GAG), które są podstawowymi nośnikami grup siarczanowych. Siarczanowane węglowodany, poza PG, występują w nielicznej grupie glikoprotein, do których należą glikohormony przysadkowe [91]. PG występują pozakomórkowo we wszystkich tkankach, szczególnie obficie w tkance łącznej. Wraz

z innymi glikoproteinami [19], współtworzą wyspecjalizowane formy substancji międzykomórkowej, jakimi są błony podstawne [27]. Ponadto, pozakomórkowe domeny PG błonowych wraz z innymi glikoproteinami tworzą glikokaliks na zewnętrznej powierzchni różnorodnych komórek [74].

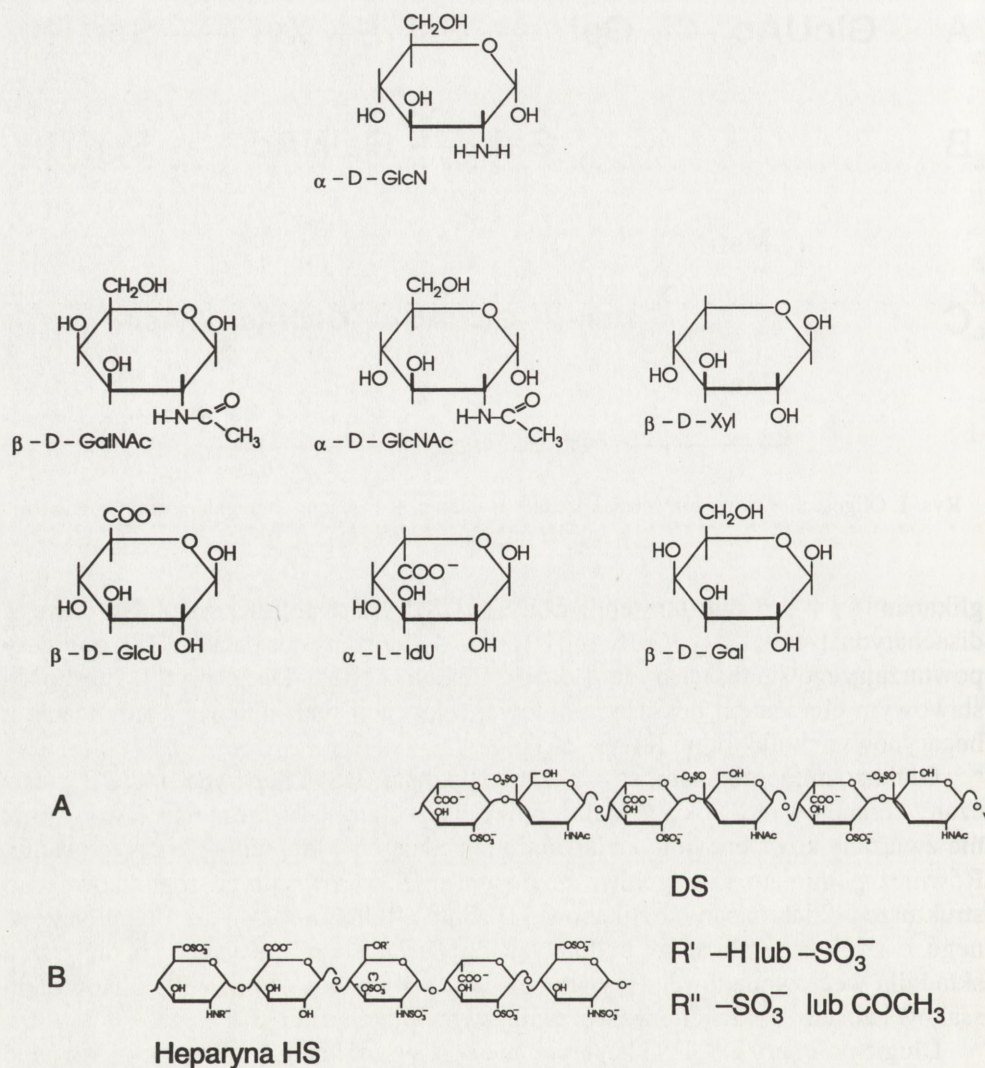
PG spełniają dwojaką rolę biologiczną. Z jednej strony bezpośrednio uczestniczą w powstawaniu "złączy" warunkujących tworzenie ponadmolekularnej organizacji substancji międzykomórkowej, w ten sposób realizują swe stosunkowo proste funkcje mechaniczno-strukturalne. Z drugiej strony, pośrednio lub bezpośrednio, oddziałują z komórkami, promując i regulując swoiste funkcje komórkowe, w takich procesach jak: adhezja, migracja, proliferacja, wzrost, różnicowanie oraz morfogeneza [2,13,14,24,30,27-29,62,63,74,76].

W niniejszym opracowaniu pominięto zagadnienia dotyczące PG omówione szczegółowo we wcześniejszych polskojęzycznych artykułach [38,70,89], do których odsyłam zainteresowanych.

1. STRUKTURA PROTEOGLIKANÓW: GLIKOZOAMINOGLIKANY

Siarczanowane GAG połączone są kowalencyjnym wiązaniem O-glikozydowym z seryną lub treoniną polipeptydu za pośrednictwem β -D-ksylozy wchodzącej w skład tetrasacharydu, jednakowego dla większości PG (rys. 1A), z wyjątkiem siarczanów keratanu (KS). KS typu II z chrząstki połączone są z białkiem rdzennym podobnie jak oligosacharydy w mucynach, mianowicie poprzez resztę α -N-acetylogalaktozoaminową (GalNAc) (rys. 1B), natomiast KS typ I rogówkowy, wiązaniem N-glikozydowym z asparaginą poprzez pentasacharydową sekwencję (rys. 1C) charakterystyczną dla wszystkich N-glikanów glikoprotein [89]. Proteoglikany siarczanów keratanu o strukturze KS podobnej do typu rogówkowego występują również w wielu innych tkankach, między innymi na terenie ściany aorty [22,23]. Poza GAG, proteoglikany mogą zawierać również N-glikany typowe dla innych glikoprotein [34,36]. Kwas hialuronowy jedynie nie jest związany kowalencyjnie w PG.

GAG, w których występują jedynie cztery różne monocukry i dwie pochodne cukrowe (mianowicie, kwasy uronowe) (rys. 2) są długimi nierozgałęzionymi polimerami powtarzających się jednostek disacharydowych. Jednostki te utworzone są z reszt kwasu heksuronowego (kwasu D-glukuronowego [GlcU] lub L-iduronowego [IdU]) oraz heksozoaminy (rys. 2). Rodzaj występującej reszty heksozoaminowej pozwala sklasyfikować GAG na dwie grupy, mianowicie: glukozaaminoglikany (gdy występuje D-glukozaamina [GlcN]) i galaktozaaminoglikany (gdy występuje D-N-acetylogalaktozaamina [GalNAc]), natomiast rodzaj kwasu heksuronowego może być podstawą dalszej klasyfikacji GAG w obrębie każdej z grup [21,34]. Galaktozaamino-



Rys. 2. Podstawowe monocukry i pochodne cukrowe występujące w obrębie łańcuchów glikozoaminoglikanowych; galaktozoaminoglikan (A) i glukozaaminoglikan (B) – przykładowe fragmenty sekwencji rozpoznawalnych przez (A) heparynowy kofaktor II i (B) przez antytrombinę III

2) z różnej pozycji podstawienia grup siarczanowych przy określonych resztach monosacharydowych;

3) z niejednorodnej gęstości rozmieszczenia grup siarczanowych na całej długości łańcucha glikozoaminoglikanowego, a tym samym niejednorodnej gęstości ładunku;

4) z obecności różnej długości “bloków” utworzonych z disacharydów zawierających reszty GlcNAc, które są poprzedzane sekwencjami różnej długości, zawierającymi reszty N-siarczanowanej GlcN w powtarzających się disacharydach.

Szczególnym znakiem identyfikacyjnym dla rodziny heparyna-HS [34] jest heterogenność wynikająca z nieregularności występowania “bloków” sekwencji zawierających GlcNAc i “bloków” zawierających N-siarczanowaną GlcN w powtarzających się disacharydach tych GAG [2,24,41]. Na przykład, HSPG z błon podstawnych kłębków nerkowych ma w swych GAG niejednolicie rozmieszczone grupy N-siarczanowe i reszty GlcNAc. Sprawia to, że pojedynczy łańcuch polisacharydowy zawiera co najmniej dwa odmienne regiony, zewnętrzne i wewnętrzne [18]. W peryferycznych regionach tego GAG, obejmujących około 10 jednostek disacharydowych bogatych w IdU, zlokalizowane są nośniki ujemnych ładunków, zarówno grupy N- jak i O-siarczanowe. Struktura glikanowa tego peryferycznego regionu zbliżona jest raczej do heparyny. Natomiast bardziej wewnętrzny region łańcucha HS składa się z około 20 jednostek disacharydowych -GlcU β 1.4GlcNAc-, które całkowicie pozbawione są modyfikacji i można je przyjąć jako bardziej typowe dla HS [18].

Heterogenność łańcuchów galaktozoaminoglikanowych w porównaniu z heterogennością glukozaaminoglikanów jest mniej zaznaczona, między innymi przez fakt, że reszty GalNAc pozostają zawsze acetylowane, dlatego też nie są N-siarczanowane.

Heterogenność GAG wynika z ich biosyntezy, szczególnie reakcji modyfikacyjnych, których postępowanie nie jest powtarzalne wzdłuż całego polisacharydu. Sprawia to, że pierwotnie jednolity polimer jednostek disacharydowych staje się urozmaicony w swej strukturze.

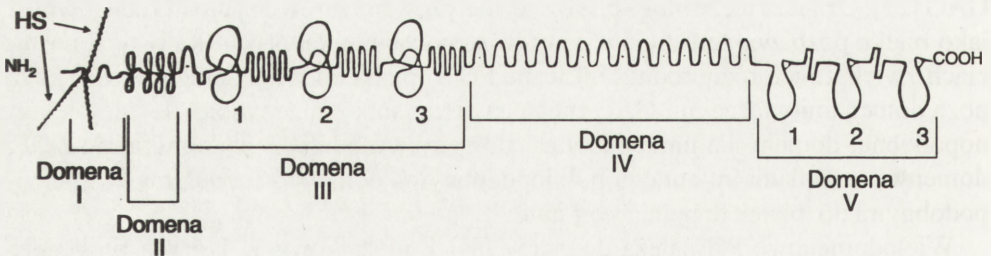
2. STRUKTURA PROTEOGLIKANÓW: BIAŁKA RDZENNE

Białka rdzenne PG mają domenę wiążącą kowalencyjnie GAG. W niektórych PG, mianowicie w tzw. *part-time PG* (po części PG) domeny te mogą być pozbawione GAG [21]. Oznacza to, że mogą one być syntetyzowane zarówno jako PG, ale również jako białka pozbawione GAGów. Fakt występowania niektórych PG w tych postaciach zwiększa ich różnorodność. Liczne PG są białkami wielodomenowymi, gdyż poza domenami wiążącymi GAG mogą zawierać inne, mianowicie: domeny lektynopodobne, domeny lamininopodobne, domeny z modułami podobnymi do EGF, domeny z modułami immunoglobulinopodobnymi, domeny z modułami CCP, czyli podobnymi do białek dopełniacza i inne.

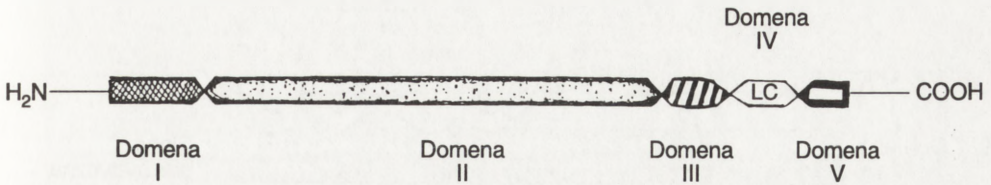
Wielodomenowe PG należą do grupy białek mozaikowych, których filogeneza zdeterminowana jest takimi procesami, jak przetasowanie eksonowe (*exon shuffling*) i duplikacja [1]. Białka mozaikowe zbudowane są z niewielu, funkcjonalnie różnych modułów peptydowych, które mogą powtarzać się wielokrotnie [90]. Modułową strukturę mają również kolageny, niektóre z nich np. kolagen IX mają domeny

“dźwigające” glikoaminoglikany [3]. Wiele PG należy do białek mozaikowych, wśród nich proteoglikan siarczanu heparyny – perlekan (rys. 3) [31,54] oraz proteoglikan siarczanu chondroityny – wersikan (rys. 4) [63,78]. W perlekanie domenę I stanowi N-końcowa sekwencja sygnałowa, po której następuje 172 aminokwasowy segment dźwigający trzy łańcuchy siarczanów heparanu. Domenę II stanowią powtórzenia bogate w cysteinę i kwaśne aminokwasy, które są podobne do obecnych w receptorze LDL. W domenie III występują regiony bogate w cysteinę i regiony globularne, które wykazują podobieństwo do obecnych w krótkim ramieniu łańcucha A lamininy. Domenę IV tworzy 14 powtórzeń immunoglobulinopodobnych. Domena V zawiera trzy powtórzenia, podobne do globularnych domen G łańcucha A lamininy, poprzedzielane modułami podobnymi do EGF, których brak w tej części łańcucha A lamininy. W wersikanie (rys. 4) [63,78] rejon N-końcowy polipeptydu stanowi domenę lektynopodobną oddziałującą z hialuronianem, która jest homologiczna do białek wiążących (ang. *link protein*), szczególnie białka wiążącego hialuronian pochodzącego z neurogleju. Domenę II stanowi pośrodkowy fragment polipeptydu dźwigający łańcuchy GAG, głównie CS. Domenę III stanowią dwa moduły podobne do EGF. Domena IV to druga domena lektynopodobna w tym białku, o strukturze podobnej do lektyn kręgowców, rozpoznających terminalne reszty monocukrowe, mianowicie: Gal, GlcNAc lub Man, której ligandem mogą być przypuszczalnie asjaloglikoproteiny. Domenę V stanowi rejon zawierający moduły CCP charakterystyczne dla białek dopełniacza, podobne do występujących w składniku H dopełniacza. Domeny podobne do obecnych w wersikanie, który pochodzi z fibroblastów, występują również w lepiej poznanym agrekanie.

Błonowe PG mogą być w różny sposób zakotwiczone w błonie plazmatycznej [2,13,14,21,24,30,85-87] (rys. 5). Integralne PG błonowe połączone są za pośrednictwem hydrofobowej przezbłonowej domeny kotwiczącej, która może znajdować się



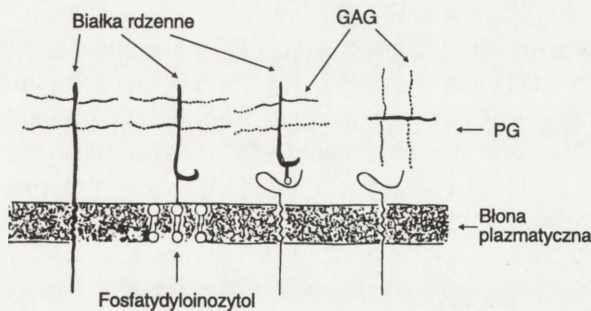
Rys. 3. Organizacja modułowa i domenowa perlekanu (objaśnienia w tekście) [54]



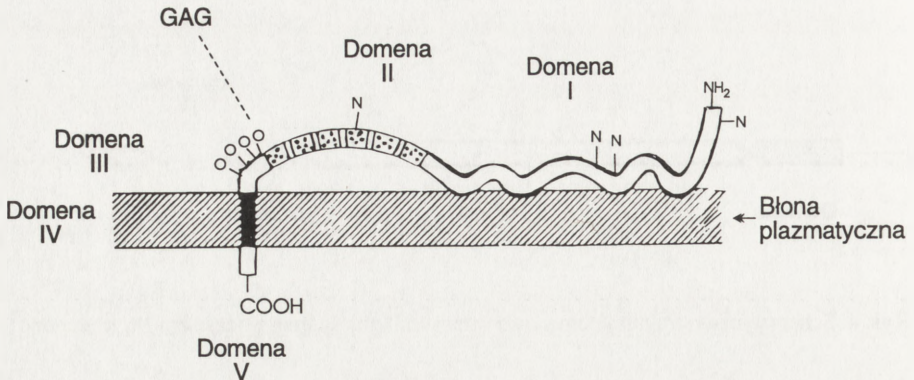
Rys. 4. Schematyczna struktura domenowa wersikanu (objaśnienia w tekście) [78, zmienione]

zarówno w obrębie N-końcowego fragmentu polipeptydu, jak np. w receptorze transferyny lub w obrębie C-końca polipeptydu, jak np. w trombomodulinie czy syndekanie [2,13,30]. Reprezentatywnym PG błonowym jest trombomodulina z komórek śródbłonkowych (rys. 6) [58,61]. Funkcjonalnie trombomodulina jest odpowiedzialna za antykrzepliwą aktywność śródbłonków. Pod względem strukturalnym trombomodulina należy do białek mozaikowych i składa się z pięciu domen. Domenę I stanowi N-końcowy fragment polipeptydu homologiczny z receptorem asjaloglikoprotein, domenę II rejon zawierający sześć modułów podobnych do EGF, domenę III stanowi rejon “dźwigający” związane kowalencyjnie GAG, zwykle pojedynczy łańcuch CS. Domenę IV stanowi hydrofobowy, przezbłonowy fragment polipeptydu, po którym następuje C-końcowa domena polipeptydu znajdująca się w cytoplazmie.

Niektóre PG mogą być kowalencyjnie związane z błoną poprzez kotwiczący fosfatydyloinozytol (rys. 5) [16,21,86,87]. Skutkiem działania zewnątrzpochođnej swoistej fosfolipazy C, PG może być uwolniony z tego połączenia i powierzchni komórki. Uwolniony PG może zostać na powrót związany przez resztę fosforanową inozytolu ze swoim receptorem błonowym obecnym na powierzchni kompeten-



Rys. 5. Proteoglikany powierzchni komórki – sposoby zakotwiczenia w błonie plazmatycznej [21]



Rys. 6. Struktura wielodomenowa trombomoduliny, przezbłonowego proteoglikanu komórki śródbłonna (objaśnienia w tekście) [58,68]

tnych komórek. Może również po endocytozie receptorowej ulegać wewnątrzkomórkowej degradacji lub po modyfikacji ponownie wrócić na powierzchnię komórki [13,14].

Innym możliwym połączeniem PG z błoną jest oddziaływanie ich GAG z błonowym receptorem lektynowym (rys. 5). Receptory lektynowe mogą uczestniczyć w endocytozie pozakomórkowych PG oraz w rozpoznawaniu biologicznym [21,24,29,63,74,89].

3. KLASYFIKACJA PROTEOGLIKANÓW

Proponowane są różne kryteria klasyfikacji PG [2,21,34]. Najprostszy sposób klasyfikacji, opiera się na strukturze GAG przytwierdzonych do białka rdzennego. Na tej podstawie można sklasyfikować PG na trzy typy główne, mianowicie:

- typ 1 – to proteogalaktozoaminoglikany;
- typ 2 – to proteoglukozoaminoglikany i
- typ 3 – to proteopolilaktozoaminoglikany.

Do proteogalaktozoaminoglikanów należą PG siarczanów chondroityny (CSPG) oraz PG siarczanów dermatanu (DSPG) [6]. Proteoglukozoaminoglikanami są PG siarczanów heparanu (HSPG) oraz heparyna. Natomiast do proteopolilaktozoaminoglikanów należą PG siarczanów keratanu (KSPG). Klasyfikację tę uzupełnia grupa hybrydowych PG, czyli PG z różnymi typami GAG, które przytwierdzone są kowalencyjnie do pojedynczego białka rdzennego.

Klasyfikacja na podstawie topograficznego rozmieszczenia PG pozwala pogrupować je na:

- 1) wewnątrzkomórkowe PG (z ziarnistości wydzielniczych),
- 2) PG związane z powierzchnią błon komórkowych,
- 3) PG substancji międzykomórkowej [2,13,14,24,30,85].

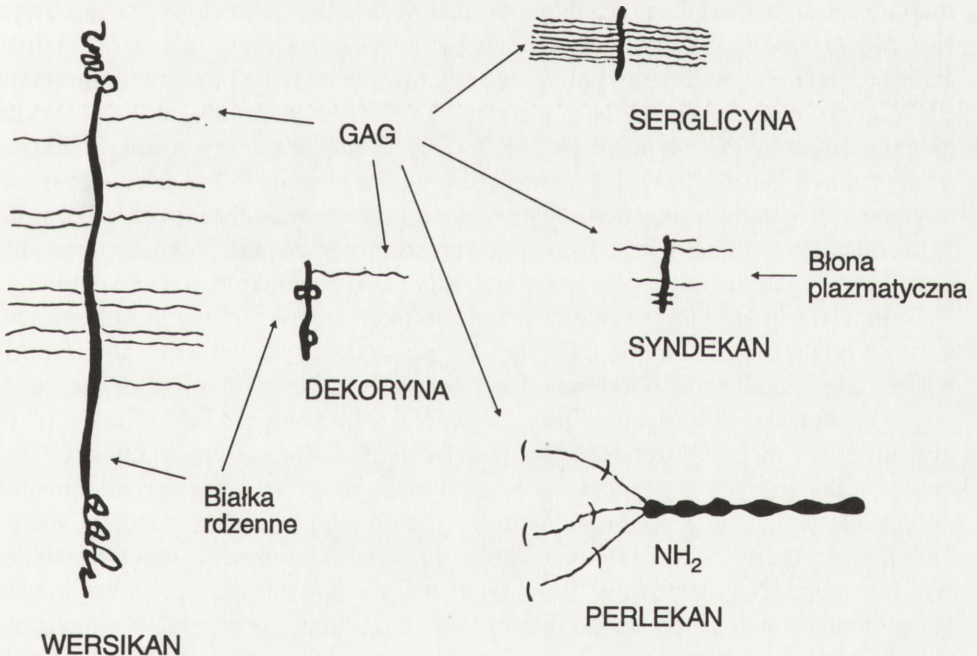
Klasyfikacja PG na podstawie struktury I rzędowej białek rdzennych może być brana pod uwagę, ponieważ sekwencja aminokwasowa niektórych PG jest już poznana. Klasyfikacja zaproponowana przez Kjellena i Lindhala [34] grupuje PG w pięć rodzin. Rysunek 7 przedstawia reprezentantów poszczególnych rodzin PG.

Rodzina 1 – to wielkocząsteczkowe, pozakomórkowe CSPG, które mają zdolność do interakcji z kwasem hialuronowym, mianowicie typu agrekan z chrząstki oraz typu wersikan z fibroblastów [78].

Rodzina 2 – obejmuje małe PG z jednym lub dwoma łańcuchami GAG (CS,DS), typu dekoryny lub biglikanu [46,65,68].

Rodzina 3 – to HSPG z błon podstawnych typu perlekan [31,54].

Rodzina 4 – to PG przezbłonowe powierzchni komórki spokrewnione z hybrydowym proteoglikanem CS i HS, typu syndekan [2,30,85-87]. Należą tu również takie PG jak betaglikan, trombomodulina, receptor naprowadzający limfocytów (*homing receptor*, CD44), receptor dla transferyny, łańcuch niezmienny (*invariant*) antygenów zgodności tkankowej typu II [21,41,44,58,61,82],



Rys. 7. Schematyczne struktury reprezentatywnych proteoglikanów poszczególnych rodzin [wg 63, zmienione]

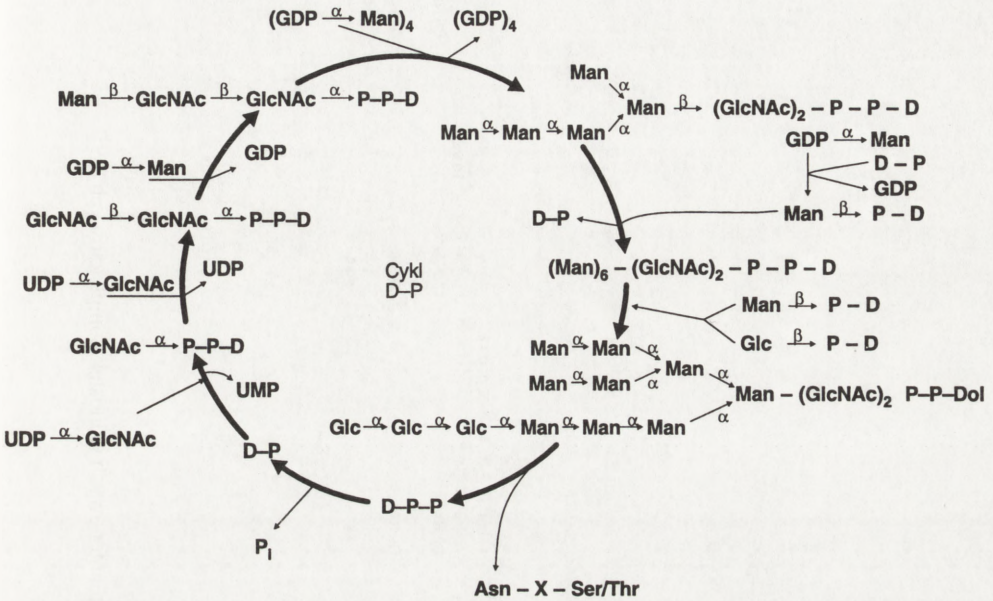
Rodzina 5 – to PG wewnątrzkomórkowe typu serglycyna. Białka rdzenne tych PG zawierają długie sekwencje na przemian występujących reszt Gly i Ser, które glikozylowane są w znacznym stopniu łańcuchami CS i HS [13,21,62,63].

Choć podobieństwa i różnice strukturalne polipeptydów pozwoliły na wstępne usystematyzowanie znanych PG, to jednak dotychczas nie znaleziono wyraźnej wspólnej cechy strukturalnej białka, która pozwoliłaby na jednoznaczne zidentyfikowanie go jako PG i tym samym na odróżnienie samego białka rdzennego PG od innych białek. Dlatego nadal trudno jest zaklasyfikować do PG nowo wykryte białko jedynie na podstawie sekwencji aminokwasowej, natomiast wykazanie obecności w nim kowalencyjnie związanych GAG może to ułatwić.

4. Biosynteza proteoglikanów

Różnorodne komórki zwierzęce są zdolne do syntezy siarczanowanych PG [7,15,25,26,32,33,37,47,49-52,57,59,64,66,68,79-84, 88], których struktura może być warunkowana procesami rozwojowymi [12]. Translacja białek rdzennych PG rozpoczyna się w cytoplazmie, podobnie jak innych białek sekrecyjnych i błonowych. Kompleks translacyjny ukierunkowuje się na błony szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (RER) i nowotworzony polipeptyd jest przenoszony do przestrzeni luminalnej RER, gdzie może podlegać N-glikozylacji [89]. Udowodniono, że N-glikozylacji ulegają zarówno PG błonowe [21,44,71-73,82] oraz macierzy pozakomórkowej, między innymi aorty [92-97]. Prekursorowe białka rdzenne PG są początkowo syntetyzowane zgodnie z modelem syntezy zaproponowanym dla innych glikoprotein zawierających N-glikany [89]. Dopiero po przetransportowaniu prekursorowej glikoproteiny do aparatu Golgiego są syntetyzowane GAG charakterystyczne dla PG.

Translacja, glikozylacja enzymatyczna i śródkomórkowy transport glikoprotein z RER do powierzchni komórki odbywają się z udziałem systemu wewnątrzkomórkowych błon i podlegają odrębnym mechanizmom regulacyjnym, których zgodne współdziałanie odpowiedzialne jest za ostateczne pojawienie się “dojrzałych” makrocząsteczek na powierzchni błon plazmatycznych lub w substancji międzykomórkowej. Obecnie nie jest ostatecznie ustalone, jaki jest mechanizm transportu nowosyntetyzowanych PG z rejonów translacji do miejsc O-glikozylacji w aparacie Golgiego i poza komórkę, gdy nie mają N-glikanów w “dojrzałej” makrocząsteczce. Być może brak N-glikanów w “dojrzałych” makrocząsteczkach jest wtórnym następstwem ich usunięcia przez endoglikozydazy po dotarciu PG do miejsc ostatecznego przeznaczenia. Inną możliwością jest również transport PG bez towarzyszącej N-glikozylacji, gdyż mogą zawierać inny sygnał w obrębie łańcucha polipeptydowego odpowiedzialny za ich ukierunkowany transport, wówczas N-glikozylacja nie byłaby konieczna. Obecnie nie można jednoznacznie rozstrzygnąć, która z możliwości jest bardziej typowa dla PG. Choć zebrano wiele danych przemawiających za syntezą PG



Rys. 8. Cykl fosfodolicholowy [89]

w formie prekursorowych glikoprotein, to jednak nadal nie jest ustalone czy model ten jest powszechny dla wszystkich PG. Należy mieć nadzieję, że w niedalekiej przyszłości problem ten zostanie ostatecznie wyjaśniony.

4. 1. KOTRANSLACYJNA N-GLIKOZYLACJA: BIOSYNTETA PREKUSOROWYCH GLIKOPROTEIN

Nowotworzony polipeptyd białka rdzennego PG podlega w przestrzeni luminalnej RER kotranslacyjnej N-glikozylacji przy udziale oligosacharydylotransferazy polipeptydylowej dolichylofosfozależnej, która przenosi w całości oligosacharyd Glc₃Man₉GlcNAc₂- z difosfodolicholowego oligosacharydu prekursorowego na resztę asparaginową łańcucha polipeptydowego (rys. 8).

Inhibitorem pierwszej reakcji cyklu fosfodolicholowego (rys. 8) odpowiedzialnego za syntezę prekursorowego difosfodolicholowego oligosacharydu – głównego donora w N-glikozylacji – jest tunikamycyna. Inhibitor ten hamuje N-glikozylację rdzeni białkowych PG oraz obniża ich ekspresję na powierzchni błon plazmatycznych lub w substancji międzykomórkowej [8,72]. Stopień obniżenia sekrecji PG w obecności tunikamycyny jest skorelowany z wysokością zastosowanej dawki antybiotyku i

przypuszczalnie jest skutkiem wzmożonej wewnątrzkomórkowej degradacji PG. Spiro i wsp. [72] sugerują, że dodanie N-glikanów do rdzeni białkowych jest wymagane do ich przetworzenia w formy PG, gdyż N-glikozylacja ułatwia wewnątrzkomórkowy transport nowosyntetyzowanych białek rdzennych PG do miejsc posttranslacyjnego dodania GAG.

Transportowi prekursorowego białka PG w obrębie przestrzeni luminalnej RER towarzyszy typowa obróbka (ang. *processing*) pierwotnych N-glikanów z udziałem glukozydaz i mannozydaz [72,89], zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 9. "Przycięcie" (ang. *trimming*) pierwotnego oligosacharydu skutkiem działania obojętnych glukozydaz I i II jest wymagane do przekształcenia prekursorowych glikoprotein w PG, gdyż obecność reszt glukozytowych na pierwotnym oligosacharydzie może być sygnałem dla zatrzymania lub oligomeryzacji polipeptydów w RER i spowolnienia transportu [72]. Względna aktywność katalityczna glukozydaz może determinować okres półtrwania prekursorów PG w przestrzeni siateczki śródplazmatycznej. Białka rdzenne niektórych PG mają stosunkowo krótki okres śródkomórkowego półtrwania, mieszczący się w granicach 45–90 min, z czego co najmniej 70% czasu spędzają jednak w przestrzeni RER.

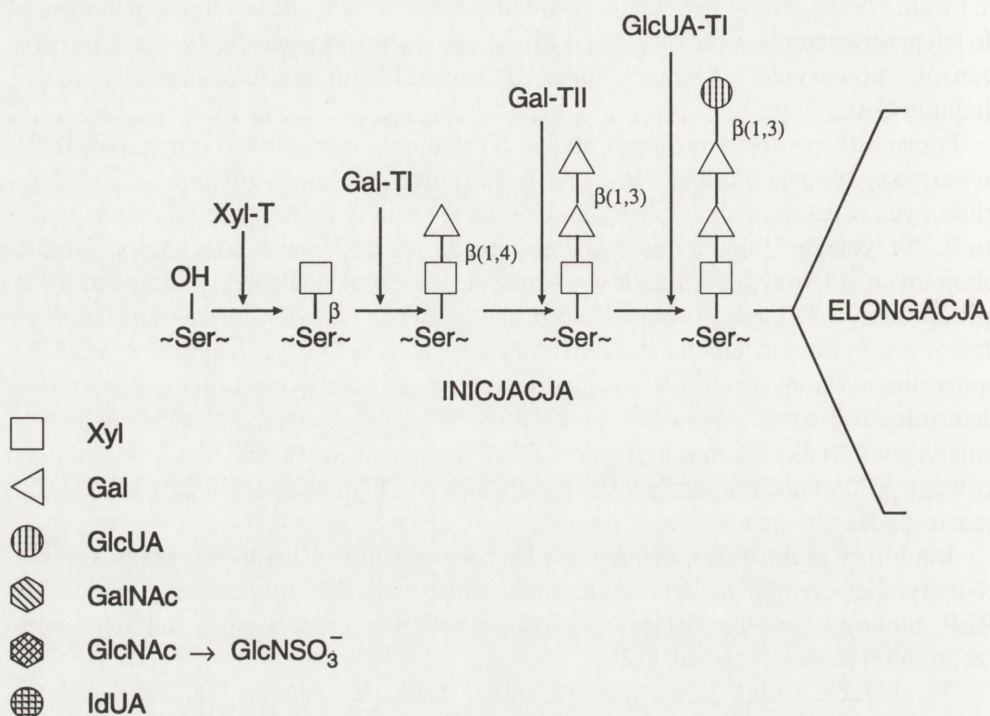
Inhibitory glukozydaz, mianowicie kastanospermina, 1-deoksynojirimycyna lub N-metylodeksynojirimycyna zatrzymują syntetyzowane glikoproteiny w rejonie RER, blokując nie tylko dołączenie GAG, ale również pojawienie się ich na powierzchni błon plazmatycznych [72].

W aparacie Golgiego ma miejsce dalsze działanie mannozydaz oraz GlcNAc-transferazy I, czego skutkiem jest wytworzenie najprostszej jednostki typu kompleksowego (rys. 9). Jednostka taka jest punktem wyjścia dla wszystkich innych bardziej rozbudowanych, wieloantenowych N-glikanów [89]. Podczas syntezy diantenowych kwaśnych N-glikanów po działaniu GlcNAc-transferazy II oraz Gal-transferaz, ostatnią reakcją jest przeniesienie reszt kwasów sjałowych przy udziale specyficznych sjałozylotransferaz [89].

Zahamowanie aktywności mannozydaz przez 1-deoksymannoijirimycynę lub swainsoninę nie ma wpływu na glikozylację prowadzącą do przekształcenia prekursorowej glikoproteiny w formę PG. Ostateczne przekształcenie N-glikanów do typu kompleksowego nie jest wymagane dla zaistnienia biosyntezy GAG oraz dla ekspresji PG na powierzchni komórki [72], choć może mieć miejsce [73].

4.2. POSTTRANSLACYJNA O-GLIKOZYLACJA

Podczas trwania obróbki N-glikanów rozpoczyna się biosynteza siarczanowanych GAG, która przebiega drogą glikozylacji sekwencyjnej [89]. Proces ten można uporządkować w trzy etapy, mianowicie: inicjacja, elongacja i etap reakcji modyfikacyjnych. Glikozylacja sekwencyjna wymaga nukleozydodifosfomonosacharydów jako jedynych, bezpośrednich donorów monosacharydów dla O-glikozylacji, w tym procesie nie są wymagane dolichylofosfomonosacharydy.



Rys. 10. Synteza tetrasacharydowej sekwencji wiążącej glikozoaminoglikany z białkiem [wg 73, zmienione]

4. 2. 1. INICJACJA SYNTEZY SIARCZANOWANYCH GLIKOZOAMINOGLIKANÓW

Na etapie inicjacji jest tworzony tetrasacharydowy region wiążący (*linkage region*) GAG z polipeptydem, którego sekwencja jest identyczna dla wszystkich, z wyjątkiem KS [34].

Inicjującą reakcją jest tworzenie O-glikozydowego wiązania między β -D-ksylozą i grupą hydroksylową reszty seryny lub treoniny (rys. 10). Przeniesienie ksylozy z UDP-ksylozy na grupę hydroksylową seryny jest katalizowane przez ksylozylotransferazę (EC 2.4.2.26). Specyficzność tej reakcji w stosunku do określonych reszt serynowych jest oczywista ponieważ nie wszystkie białka zawierające reszty serynowe mają podstawione GAG oraz nie wszystkie seryny w danym białku rdzennym PG są związane z GAG. Białka rdzenne PG muszą zawierać sygnał, który pozwala rozpoznać specyficzną resztę serynową podlegającą ksylozylacji. Sygnałem rozpoznania dla ksylozylotransferazy są specyficzne homologiczne sekwencje znajdujące się w rejonie polipeptydu o strukturze β , mianowicie -Ser-Gly-X-Gly- (X oznacza

dowolny aminokwas) poprzedzone kwaśnymi aminowasami [4,46]. Ksylozylotransferaza może wykorzystać treoninę obecną zamiast reszty serynowej w homologicznej sekwencji, lecz obecność treoniny sprawia, że glikozylacja nie jest pełna, jedynie około 10% białek podlega glikozylacji, wówczas powstają tzw. "part-time PG" [21,34,46]. Donoszono również o sekwencjach niehomologicznych w których podstawione mogą być GAG [46].

Ksylozylotransferaza jest obecna zarówno w RER jak i w aparacie Golgiego [43,55]. W tym ostatnim przedziale komórkowym jej aktywność jest 50–100 razy wyższa niż w RER. Uważa się, że reakcja ksylozylacji ma miejsce w systemie błon gładkich, w nieopłaszczonych klatryną pęcherzykach transportujących z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego lub w rejonie cis Golgiego. Komórki pozbawione aktywności ksylozylotransferazy, skutkiem mutagenyzy ukierunkowanej, nie wykazują zdolności do syntezy zarówno CSPG, jak i HSPG. Przypuszczalnie pojedyncza ksylozylotransferaza katalizuje przeniesienie reszty ksylozy na białka rdzenne, które ostatecznie staną się różnymi proteoglikanami.

Kolejnym enzymem uczestniczącym w syntezie tetrasacharydu wiążącego jest β -1.4-galaktozylotransferaza I, która przenosi resztę galaktozylową z aktywnego donora UDP-Gal na akceptorową resztę ksylozylową połączoną z łańcuchem polipeptydowym (rys. 10). Enzym ten nie jest identyczny z Gal-transferazą, która uczestniczy w terminalizacji jednostek kompleksowych N-glikanów [77]. Specyficzna aktywność Gal-transferazy I z aparatu Golgiego jest 40–140 razy wyższa od aktywności wykazanej w RER [55]. Dodanie pierwszej reszty galaktozylowej do ksylozy w trakcie syntezy regionu wiążącego CS ma miejsce w rejonie cis aparatu Golgiego [77]. Deficyt tego enzymu w zmutowanych komórkach CHO redukuje drastycznie tworzenie CSPG i HSPG [20]. Przypuszczalnie Gal-transferaza I tworzy kompleks z Xyl-transferazą, który może ułatwiać glikozylację sekwencyjną, jednak indywidualne aktywności enzymów są niezależne jedna od drugiej [20].

Kolejnym enzymem uczestniczącym w tworzeniu tetrasacharydowego regionu wiążącego jest β -1.3-galaktozylotransferaza II (rys. 10). Enzym ten różni się od Gal-transferazy I wyższą specyficznością substratową, preferuje sekwencje Gal β 1.4Xyl β -Ser- jako akceptor dla reszty galaktozylowej, w którym podstawia ją w pozycji przy trzecim węglu terminalnej Gal.

Glukuronozylotransferaza I kończy syntezę regionu wiążącego, tym samym etap inicjacji. Enzym zlokalizowany jest w aparacie Golgiego i różni się znacznie specyficznością substratową od GlcU-transferaz pochodzących z RER katalizujących reakcje detoksykacji np. leków [55], ale również od GlcU-transferazy uczestniczącej w syntezie determinanty antygenowej HNK-1 obecnej w niektórych glikolipidach i glikoproteinach [10,11,56]. Glukuronozylotransferaza I przenosi resztę kwasu glukuronowego z UDP-GlcU na grupę OH- przy trzecim węglu Gal nieredukującego końca sekwencji Gal β 1.3Gal β 1.4Xyl β -O-Ser-polipeptyd, kończąc etap inicjacji syntezy GAGów (rys. 10).

4.2.2. ELONGACJA ŁAŃCUCHÓW GLIKOZOAMINOGLIKANOWYCH, SYSTEM GOLGIEGO I INHIBITORY ŚRODKOMÓRKOWEGO TRANSPORTU

Na etapie elongacji ma miejsce rozwidlenie dróg biosyntetycznych prowadzących w kierunku syntezy galaktozaminoglikanów i glukozeaminoglikanów (rys. 11). O rozejściu dróg biosyntetycznych decyduje rodzaj reszty N-acetylohekszoaminowej, mianowicie: GalNAc lub GlcNAc, przyłączonej ostatecznie do oligosacharydu wiążącego. Podczas procesu elongacji łańcuchów CS ma miejsce glikozylacja sekwencyjna, która polega na naprzemiennym działaniu dwóch enzymów, GalNAc-transferazy i GlcU-transferazy II (rys. 11). Natomiast glikozylację sekwencyjną prowadzącą do łańcuchów glukozeaminoglikanowych przeprowadzają dwa inne enzymy działające naprzemiennie, mianowicie GlcNAc-transferaza i GlcU-transferaza II (rys. 11). Dotychczas nie jest ostatecznie wyjaśnione, co decyduje o rodzaju wydłużanego łańcucha GAG oraz czy istnieją jakieś sygnały specyficznie rozpoznawalne jedynie przez GalNAc-transferazę, a inne przez GlcNAc-transferazę. Mechanizmy regulujące ten etap biosyntezy pozostają nieznanne, podobnie jak nadal niejasne jest, w jaki sposób w pojedynczej komórce regulowana może być synteza zarówno CS i HS przytwierdzonych do tego samego białka rdzennego, mianowicie hybrydowych PG.

Inhibitorem elongacji łańcuchów galaktozaminoglikanowych jest brefeldyna A (antybiotyk przeciwwirusowy). Rozprzęga ona syntezę GAG przez rozdzielenie etapu inicjacji od reakcji etapu elongacji i modyfikacji wskutek zmian morfologii i funkcji aparatu Golgiego [73]. W aparacie Golgiego wyróżnia się kilka funkcjonalnie odmiennych rejonów, mianowicie: sieć-cis (*cis-Golgi-network* = CGN), cis-, medial-, trans- i sieć-trans Golgi (*trans-Golgi-network* = TGN) [9,35,48,53,60,67]. TGN to rejon sortujący transportowane makrocząsteczki w obrębie miejsc wyjścia z aparatu. Natomiast najgęstszy, powierzchniowy rejon cis-Golgiego, określane jako sieć-cis Golgi (*cis-Golgi-network* = CGN) jest początkowym celem dla białek na drodze do aparatu Golgiego. Pełni funkcję w nacelowywaniu (*targeting*) i fuzji nieopłaszczonych klatryną pęcherzyków przybywających z siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz w ich sortowaniu i recykulacji. Recykulacja wynika z transportu zarówno do przodu (*anterograde*), czyli z ER przez aparat Golgiego dalej, np. do błony plazmatycznej oraz transportu wstecznego (*retrograde*), mianowicie z aparatu Golgiego do ER.

Brefeldyna A odwracalnie zmienia ustaloną morfologię i funkcję aparatu Golgiego wstrzymując pączkowanie nieopłaszczanych klatryną pęcherzyków odpowiedzialnych za ruch do przodu (*anterograde movement*), mianowicie z ER poprzez cysterny Golgiego do sieci-trans, co w konsekwencji blokuje transport białek z ER do aparatu Golgiego [17]. Ponadto antybiotyk ten wywołuje wsteczną redystrybucję enzymów stale "rezydujących" w obrębie cis-, medial- i trans- aparatu Golgiego do ER wskutek indukcji wstecznego [*retrograde*] mikrotubulo-zależnego systemu ruchu. Pod wpływem brefeldyny A nie następuje wsteczna redystrybucja enzymów obecnych w rejonach: TGN, formowania lizosomów i pęcherzyków endosomalnych [9,42]. Bada-

nia z zastosowaniem brefeldyny pozwoliły na zróżnicowanie aparatu Golgiego na dwa obszary, mianowicie: brefeldyno-wrażliwy, który obejmuje rejony: CGN, cis-, medial- i trans- oraz brefeldyno-oporny obejmujący rejon sieci-trans Golgiego (TGN).

Brefeldyna A skutecznie "rozprzega" syntezę CSPG przez rozdzielenie reakcji etapu inicjacji od reakcji etapu elongacji i modyfikacji [73]. Etapy elongacji i modyfikacji mają miejsce w rejonie sieci-trans aparatu Golgiego (TGN), który jest brefeldyno-opornym podprzedziałem tej struktury komórkowej. Podczas syntezy PG w obecności brefeldyny A białka rdzenne zostają zatrzymane w obrębie ER. Białka te, choć unieruchomione w ER, "nabywają" nie tylko sjałozylowane diantenowe N-glikany kompleksowe, ale również węglowodanową sekwencję wiążącą GAG, ponieważ etap inicjacji syntezy GAG pozostaje nie zmieniony [69,73]. Dowodzi to, że synteza kompleksowych sjałozylowanych N-glikanów oraz etap inicjacji syntezy GAG mają miejsce w tym samym obszarze aparatu Golgiego. Natomiast elongacja i etapy modyfikacji GAG zachodzą w obszarze brefeldyno-opornym.

Zatrzymanie syntezy GAG może nastąpić również pod wpływem różnych innych inhibitorów wewnątrzkomórkowego transportu pęcherzykowego, których mechanizm działania nie jest tak dobrze poznany, jak w przypadku brefeldyny A. Inhibitorami tymi są monenzyna, dietylokarbamazyn, karbonylocyjanek-m-chlorofenylohydrazonu i chlorek amonu [71,75]. Wszystkie one hamują syntezę PG przez uniemożliwienie transportu ich rdzeni białkowych do miejsc, gdzie podlegają O-glikozylacji. Białka te gromadząc się w obrębie ER nie pojawiają się na powierzchni komórki lub w substancji międzykomórkowej.

4. 2. 3. MODYFIKACJE ŁAŃCUCHÓW GLIKOZOAMINOGLIKANOWYCH

Trzeci etap syntezy GAG, mianowicie etap reakcji modyfikacyjnych jest poznany najlepiej na przykładzie syntezy heparyny [39,40]. Powszechną reakcją tego etapu jest sulfonowanie inicjowane jeszcze na etapie elongacji (rys. 11). W przypadku syntezy CS jest to jedyna reakcja mająca miejsce na tym etapie, którą katalizują 4-O- lub 6-O-sulfotransferazy przenoszące grupy siarczanowe z aktywnego donora, jakim jest PAPS, na reszty GalNAc łańcucha CS (rys. 11) [20,71-73,77].

Synteza DS [33], przebiega na dwóch pierwszych etapach identycznie z syntezą CS, jednak na etapie modyfikacji jest odmienna. Poza 4-O-sulfonowaniem reszty GalNAc ma miejsce dodatkowa reakcja, mianowicie C-5-epimeryzacja GlcU do IdU, po której może mieć miejsce terminująca reakcja 2-O-sulfonowania IdU [44].

Etap modyfikacji obfitujący największą różnorodnością reakcji ma miejsce podczas syntezy glukozaaminoglikanów, zwłaszcza heparyny. Podobny zakres reakcji modyfikacyjnych może mieć miejsce podczas syntezy HS, ale reakcje te postępują z niższą wydajnością. Do reakcji tych należą deacetylacja, N-sulfonowanie, C-5-epimeryzacja, 2-O-; 6-O- i 3-O-sulfonowanie (rys. 12).

Modyfikacje inicjuje N-deacetylaza przekształcająca GlcNAc w GlcN, aminocukier który staje się substratem dla N-sulfotransferazy tworzącej GlcNSO_3^- . Deacetylacja jest warunkiem wstępnym dla następczego N-sulfonowania i wykazano, że

oczyszczona N-sulfotransferaza ujawnia również aktywność N-deacetylazową [5]. Natomiast obecność grup N-sulfonowych w substracie jest wymagana dla jego rozpoznania przez niektóre O-sulfotransferazy, jak i C-5-epimerazę GlcU. Aktywność N-deacetylazowa wydaje się mieć kluczowe znaczenie regulacyjne na etapie modyfikacji podczas syntezy glikoaminoglikanów [34].

N-sulfonowany disacharyd-GlcUA β 1.4GlcNSO $_3^-$ α 1- może być substratem dla co najmniej trzech enzymów (rys. 12), mianowicie:

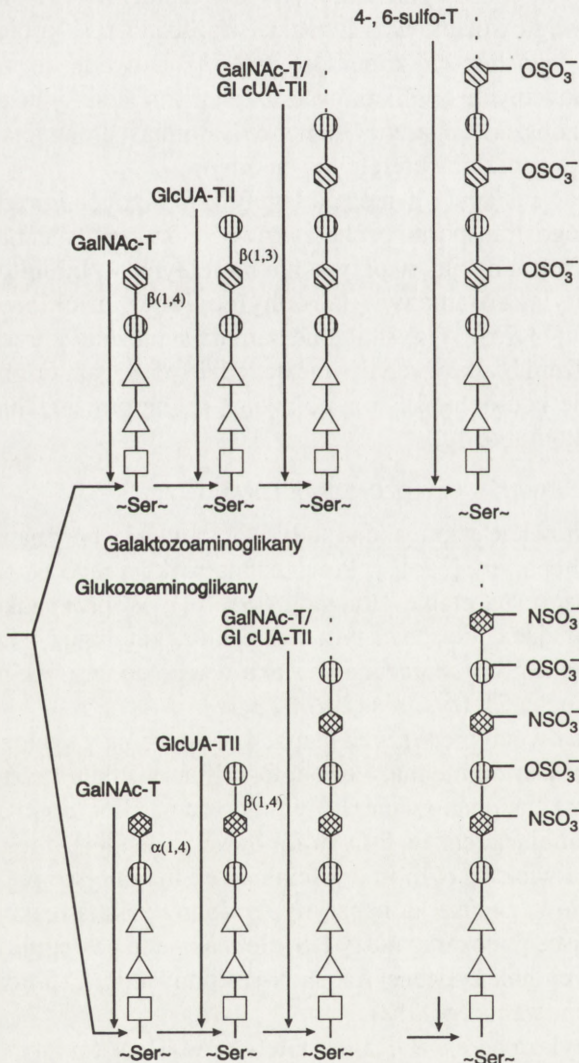
1) dla 6-O-sulfotransferazy, która przekształca resztę GlcNSO $_3^-$ tego disacharydu do disulfoglikoaminy;

2) dla 2-O-sulfotransferazy kwasu glukuronowego [39], która przenosi grupę siarczanową w pozycję przy drugim węglu GlcU disacharydu;

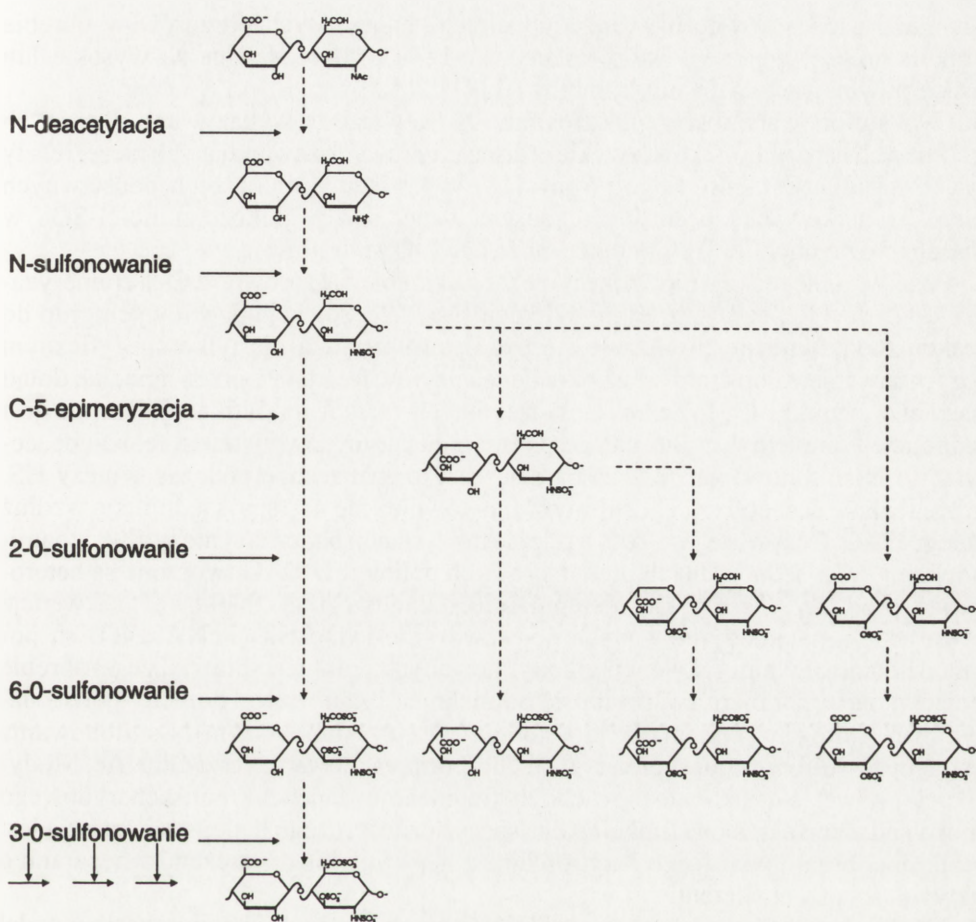
3) dla C-5-epimerazy kwasu glukuronowego, enzymu specyficznego rozpoznającego grupy N-sulfonowane w swym substracie disacharydowym [28].

Enzym ten przekształca GlcU do IdU, modyfikując disacharyd, który wskutek tego jest dobrym substratem, zarówno dla 2-O-sulfotransferazy kwasu iduronowego, jak i dla 6-O-sulfotransferazy N-sulfoglikoaminy.

Konkurowanie przynajmniej trzech enzymów o wspólny substrat dowodzi, że epimeryzacja nie jest konieczną konsekwencją N-siarczanowania. Jednostki, które uniknęły epimeryzacji -GlcUA β 1.4GlcNSO $_3^-$ (6-O-SO $_3^-$) mogą być substratem dla 3-O-sulfotransferazy katalizującej przeniesienie reszty siarczanowej w pozycję przy trzecim C-disulfoglikoaminy (GlcNSO $_4$ C6-O-SO $_3^-$), prze-



Rys. 11. Elongacja łańcuchów glikoaminoglikanowych związanych z białkiem [wg 73, zmienione]



Rys. 12. Modyfikacje glukozaaminoglikanów na przykładzie heparyny [wg 39, zmienione]

kształcając ją w trisulfoglukozaaminę. Tak zmodyfikowana reszta stanowi istotny element pentasacharydowej sekwencji markerowej dla wiązania antytrombiny przez heparynę i ujawnienia heparynowej aktywności przeciwkrzepliwiej [40,41]. Heparyna może wykazywać zarówno niską, jak i wysoką aktywność przeciwkrzepliwą. Pojedynczy polimer heparyny może zawierać sekwencje zarówno wykazujące wysoką aktywność przeciwkrzepliwą, jak i o niskiej aktywności przeciwkrzepliwiej. Przypuszczalnie jest to konsekwencją przerwania lub niedokonania się reakcji modyfikacyjnych lub skierowania ich na inny tor kolejnych reakcji. Do niedawna sądzono, że działająca na ostatnim etapie syntezy heparyny 3-O-sulfotransferaza jest głównie odpowiedzialna za tworzenie miejsc specyficznie wiążących antytrombinę i tym samym za ujawnienie wysokiej aktywności przeciwkrzepliwiej przez ten polimer. Ostatnie badania jednak dowodzą, że wcześniejsze reakcje etapu modyfikacji mają

również znaczenie w formowaniu lub umiejscawianiu tych obszarów w obrębie prekursorowego polimeru, które ostatecznie będą odpowiedzialne za wysokie lub niskie powinowactwo do antytrombiny III [41].

3-O-sulfonowane reszty glukozaamino-N-SO₃⁻ często wykazywano w różnych polimerach heparyny ssaków, zwykle w disacharydowych zawierających raczej reszty GlcU niż IdU. Ostatnio, Edge i Spiro [18] wykryli w HSPG z błon podstawnych kłębków nerkowych obecność 3-O-sulfonowanej reszty glukozaamino-N-SO₃ w disacharydzie obok IdU, który także może być 2-O-sulfonowany.

Poszczególne reakcje modyfikacyjne mogą przebiegać zarówno z C-5-epimeryzacją GlcU do IdU, bądź bez tej modyfikacji (rys. 12). Selekcja docelowych grup do reakcji modyfikacyjnych okazuje się być determinowana nie tylko specyficznym rozpoznawaniem substratu przez określone enzymy, lecz także przez inne, jak dotąd nieznanne czynniki [39]. Zakres poszczególnych reakcji modyfikacyjnych nie jest jednolicie kompletny wzdłuż całego polimeru heparyny, z wyjątkiem reakcji deacetylacji i N-sulfonowania. Jeszcze bardziej jest to zaznaczone podczas syntezy HS, gdzie reakcje deacetylacji i N-sulfonowania również nie następują jednolicie wzdłuż całego GAG. Oczywiście jest, że to na etapie modyfikacji podczas syntezy glukozaaminoglikanów z jednorodnych prekursorowych polimerów GAG tworzone są heterogenne produkty. Te zwykle nieregularnie rozmieszczone "blokowe" sekwencje utworzone z niezmodyfikowanych podstawowych jednostek GlcNAcGlcU są poprzedzielane blokami sekwencji zmodyfikowanych. Fakt ten sprawia, że w obrębie pojedynczego polimeru pojawiają się odmiennie obszary tzw. "domeny polisacharydowe", które są wynikiem różnic w stopniu (wyższym lub niższym) N-sulfonowania i pozycji O-sulfonowania, epimeryzacji GlcU oraz zachowania reszt GlcNAc. Modyfikacje, nawet stosunkowo niewielkich fragmentów łańcucha polisacharydowego mogą nadać mu określoną funkcjonalną specyficzność, czego najlepszą ilustracją jest struktura obszaru wiążącego antytrombinę z heparyny lub z siarczanów heparanu o aktywności przeciwwkrzepliwej.

Mechanizmy regulujące biosyntezę GAG na etapie modyfikacji pozostają nadal niewyjaśnione. Rozwikłanie ich podstaw mogłoby mieć szerokie znaczenie poznawcze, tym bardziej iż przyjmuje się, że różnorodność i jednocześnie niejednorodność postępowania reakcji modyfikacyjnych wzdłuż całego łańcucha polisacharydowego jest jedną z najistotniejszych przyczyn dużej heterogenności strukturalnej glukozaaminoglikanów, która przypuszczalnie odpowiedzialna jest za ujawnianie różnorodnych aktywności biologicznych przez te makrocząsteczki.

PIŚMIENICTWO

- [1] BARON M, NORMAN DG, CAMPBELL ID. Protein modules. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**:13–17.
- [2] BERNFIELD M, KOKENYESI R, KATO M, HINKES MT, SPRING J, GALLO RL, LOSE EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 1992; **8**: 365–393.

- [3] BORK P. The modular architecture of vertebrate collagens. *FEBS-Lett* 1992; **307**: 49–54.
- [4] BOURDON MA, KRUSIUS T, CAMPBELL S, SCHWARTZ NB, RUOSLAHTI E. Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**:3194–3198.
- [5] BRANDAN E, HIRSCHBERG CB. Purification of rat liver N- heparan-sulfate sulfotransferase. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2417–2422.
- [6] BREUER B, QUENTIN E, CULLY Z, GOTTE M, KRESSE H. A novel large dermatan sulfate proteoglycan from human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13224–13232.
- [7] BUTZ H, STUHLSTADT HW, MAIER G, SCHWARTZ-ALBIEZ R. Secreted and cellular proteochondroitin sulfates of a human B lymphoblastoid cell line contain different protein cores. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3402–3408.
- [8] CAREY DJ. Biological functions of proteoglycans: use of specific inhibitors of proteoglycan synthesis. *Mol Cell Biochem* 1991; **104**:21–28.
- [9] CHEGE NW, PFEFFER SR. Compartmentation of the Golgi complex: Brefeldin-A distinguishes trans-Golgi cisternae from the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 1990; **111**: 893–899.
- [10] CURENTON T, EKBORG G, RODEN L. Glucuronosyl transfer to galactose residues in the biosynthesis of HNK-1 antigens and xylose-containing glycosaminoglycans: one or two transferases ? *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 416–422.
- [11] DAS KK, BASU M, BASU S, CHOU DKH, JUNGALWALA FB. Bio- synthesis *in vitro* of GlcA beta 1-3nLcOse4Cer by a novel glucuronyltransferase (GlcAT-1) from embryonic chicken brain. *J Biol Chem* 1991; **266**: 5238–5243.
- [12] DAVID G, BAI XM, VAN DER SCHUEREN B, CASSIMAN JJ, VAN DEN BERGHE H. Developmental changes in heparan sulfate expression: *In situ* detection with mAbs. *J Cell Biol* 1992;**119**:961–975.
- [13] DAVID G. Structural and functional diversity of the heparan sulfate proteoglycans. *Adv Exp Med Biol* 1992;**313**:69–78.
- [14] DAVID G. Biology and pathology of the pericellular heparan sulfate proteoglycans. *Biochem Soc Trans* 1991;**19**:816–820.
- [15] DAVIES H, THOMAS GJ, SHEWRING LD, MASON RM. Mesengial cell proteoglycans: synthesis and metabolism. *J Am Soc Nephrol* 1992; **2**:588–594.
- [16] DOERING TL, MASTERSON WJ, HART GW, ENGLUND PT. Biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. *J Biol Chem* 1990; **265**: 611–614.
- [17] DONALDSON JG, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, BLOOM GS, KREIS TE, KLAUSNER RD. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J Cell Biol* 1990;**111**:2295–2306.
- [18] EDGE ASB, SPIRO RG. Characterization of novel sequences containing 3-O-sulfated glucosamine in glomerular basement membrane heparan sulfate and localization of sulfated disaccharides to a peripheral domain. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15874–15881.
- [19] ENGEL J. Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 1992; **31**: 10643–10651.
- [20] ESCO JD, WEINKE JL, TAYLOR WH, EKBORG G, RODEN L. Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *J Biol Chem* 1987; **262**:12189–12195.
- [21] FRANSSON LA. Structure and function of cell-associated proteoglycans. *Trends Biochem Sci* 1987; **12**: 406–411.
- [22] FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, MANN MM, CONRAD GW. Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta. *J Biol Chem* 1991; **266**: 24773–24777.
- [23] FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, BROWN SJ, VERGNES JP, HASSELL JR, MANN MM, CONRAD GW. Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 11874–11880.

- [24] GALLAGHER JT, TURNBULL JE, LYON M. Heparan sulphate proteoglycans: molecular organisation of membrane-associated species and an approach to polysaccharide sequence analysis. *Adv Exp Med Biol* 1992; **313**: 49–57.
- [25] GRUMET M, FLACCUS A, MARGOLIS RU. Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: Interactions with neurons and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1993; **120**: 815–824.
- [26] HASSELL JR, SCHRECENGOST PK, RADA JA, SUNDARRAJ N, SOSSI G, THOFT RA. Biosynthesis of stromal matrix proteoglycans and basement membrane components by human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 547–557.
- [27] HAYASHI K, MADRI JA, YURCHENCO PD. (1992) Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through 1 and 3 integrins: An adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol* 1992; **119**: 945–959.
- [28] HYNES RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11–25.
- [29] HYNES RO, LANDER AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell* 1992; **68**: 303–322.
- [30] JALKANEN M, ELENIUS K, SALMIVIRTA M. Syndecan – a cell surface proteoglycan that selectively binds extracellular effector molecules. *Adv Exp Med Biol* 1992; **313**: 79–85.
- [31] KALLUNKIP, TRYGGVASON K. Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 1992; **116**: 559–571.
- [32] KASHIHARA N, WATANABE Y, MAKINO H, WALLNER EI, KANWAR YS. Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6309–6313.
- [33] KINSELLA MG, WIGHT TN. Formation of high molecular weight dermatan sulfate proteoglycan in bovine aortic endothelial cell cultures. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17891–17898.
- [34] KJELLEN L, LINDAHL U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 443–475.
- [35] KLAUSNER RD, DONALDSON JG, LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 1992; **116**: 1071–1080.
- [36] KOBATA A. Structures and function of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 483–501.
- [37] KOH E, MORIMOTO S, NABATA T, TAKAMOTO S, KITANO S, OGIHARA T. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the syntheses of DNA and glycosaminoglycans by rat aortic smooth muscle cells *in vitro*. *Life Sci* 1990; **46**: 1545–1551.
- [38] KOŹMA EM, OLCZYK K. Proteoglikany heparanosiarczanowe i ich rola w organizmie. *Post Biochem* 1994; **40**: 106–112.
- [39] KUSCHE M, LINDAHL U. Biosynthesis of heparin. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15403–15409.
- [40] KUSCHE M, BACKSTROM G, RIESENFELD J, PETITOU M, CHOAY J, LINDAHL U. Biosynthesis of heparin. O-sulfation of the antithrombin-binding region. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15474–15484.
- [41] LINHARDT RJ, WANG H, LOGANATHAN D, BAE J. Search for the heparin antithrombin III-binding site precursor. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2380–2387.
- [42] LIPPINCOTT-SCHWARTZ J, DONALDSON JG, SCHWEIZER A, BERGER EG, HAURI HP, YUAN LC, KLAUSNER RD. Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* 1990; **60**: 821–836.
- [43] LOHMANDER LS, SHINOMURA T, HASCALL VC, KIMURA JH. Xylosyl transfer to the core protein precursor of the rat chondrosarcoma proteoglycan. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18775–18780.

- [44] LOPEZ-CASILLAS F, CHEIFETZ S, DOODY J, ANDRES JL, LANE WS, MASSAGUE J. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-receptor system. *Cell* 1991; **67**: 785–795.
- [45] MAIMONE MM, TOLLEFSEN DM. Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. *J Biol Chem* 1990; **265**: 18263–18271.
- [46] MANN DM, YAMAGUCHI Y, BOURDON MA, RUOSLAHTI E. Analysis of glycosaminoglycan substitution in decorin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5317–5323.
- [47] MASON RM, LANCASTER CA. Effects of cyclofenil diphenol, an agent which disrupts Golgi structure, on proteoglycan synthesis in chondrocytes. *Biochem J* 1992; **281**: 525–531.
- [48] MELLMAN I, SIMONS K. The Golgi complex: *in vitro veritas*?. *Cell* 1992; **68**: 829–840.
- [49] MERRILEES MJ, CAMPBELL JH, SPANIDIS E, CAMPBELL GR. Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis* 1990; **81**: 245–254.
- [50] MERRILEES MJ, SCOTT L. Endothelial cell stimulation of smooth muscle glycosaminoglycan synthesis can be accounted for by transforming growth factor beta activity. *Atherosclerosis* 1990; **81**: 255–265.
- [51] MEYER D, ZIMMERMANN T, MULLER D, FRANKE H, DARGEL H, GRESSNER AM. The synthesis of glycosaminoglycans in isolated hepatocytes during experimental liver fibrogenesis. *Liver* 1990; **10**: 94–105.
- [52] MORRIS AJ, TURNBULL JE, RILEY GP, GORDON MY, GALLAGHER JT. Production of heparan sulphate proteoglycans by human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 1991; **99**: 149–156.
- [53] NILSSON T, PYPAERT M, HOE MH, SLUSAREWICZ P, BERGER EG, WARREN G. Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *J Cell Biol* 1993; **120**: 5–13.
- [54] NOONAN DM, FULLE A, VALENTE P, CAI S, HORIZAN E, SASAKI M, YAMADA Y, HASSELL JR. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 1991; **266**: 22939–22947.
- [55] NUWAYHID N, GLASER JH, JOHNSON JC, CONRAD HE, HAUSER SC, HIRSSCHBERG CB. Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12936–12941.
- [56] OKA S, TERAYAMA K, KAWASHIMA CH, KAWASAKI T. A novel glucuronyltransferase in nervous system presumably associated with the biosynthesis of HNK-1 carbohydrate epitope on glycoproteins. *J Biol Chem* 1992; **267**: 22711–22714.
- [57] OWENS RT, WAGNER WB. Chondroitin sulfate proteoglycan and heparan sulfate proteoglycan production by cultured pigeon peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 1992; **51**: 626–633.
- [58] PARKINSON JF, KOYAMA T, BANG NU, PREISSNER KT. Thrombomodulin: An anticoagulant cell surface proteoglycan with physiologically relevant glycosaminoglycan moiety. [w] Lane DA i wsp. [red] Heparin and related polysaccharides. New York, Plenum Press 1992: 177–188.
- [59] PLAAS AH, WONG-PALMS S. Biosynthetic mechanisms for the addition of poly lactosamine to chondrocyte fibromodulin. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26634–26644.
- [60] PLUTNER H, DAVIDSON HW, SARASTE J, BALCH WE. Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: Role of the P58 containing compartment. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1097–1116.
- [61] PREISSNER KT, KOYAMA T, MULLER D, TSCHOPP J, MULLER-BER-GHAUS G. Domain structure of the endothelial cell receptor thrombomodulin as deduced from modulation of its anticoagulant function. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4915–4922.

- [62] RUOSLAHTI E, YAMAGUCHI Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; **64**: 867–869.
- [63] RUOSLAHTI E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 13369–13372.
- [64] SCHICK BP, SENKOWSKI-RICHARDSON S. Proteoglycan synthesis in human erythroleukaemia (HEL) cells. *Biochem J* 1992; **282**: 651–658.
- [65] SCOTT PG, DODD CM, PRINGLE GA. Mapping the locations of the epitopes of five monoclonal antibodies to the core protein of dermatan sulfate proteoglycan II (Decorin). *J Biol Chem* 1993; **268**: 11558–11564.
- [66] SCHMIDT A, BUDDUCKE E. Bovine arterial smooth muscle cells synthesize two functionally different proteoglycan sulfate species. *Exp Cell Res* 1990; **189**: 269–275.
- [67] SCHWANINGER R, PLUTNER H, BOKOCH GM, BALCH WE. Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1077–1096.
- [68] SCHWARZ K, BREUER B, KRESSE H. Biosynthesis and properties of a further member of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family. *J Biol Chem* 1990; **265**: 22023–22028.
- [69] SHITE S, SEGUCHI T, MIZOGUCHI H, ONO M, KUWANO M. Differential effects of brefeldin A on sialylation of N- and O-linked oligosaccharides in low density lipoprotein receptor and epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17385–17388.
- [70] SKOP B, DRÓZDŹ M, ŻAK I. Proteoglikany: struktura i funkcja w tkance łącznej. *Post Hig Med Dośw* 1989; **43**: 329–347.
- [71] SPIRO RC, PARSONS WG, PERRY SK, CAULFIELD JP, HEIN A, REISFELD RA, HARPER JR, AUSTEN KF, STEVENS RL. Inhibition of post-translational modification and surface expression of a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan by diethylcarbamazine or ammonium chloride. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5121–5129.
- [72] SPIRO RC, CASTEEL HE, LAUFER DM, REISFELD RA, HARPER JR. Post-translational addition of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. Role of N-linked oligosaccharide addition, trimming, and processing. *J Biol Chem* 1989; **264**: 1779–1786.
- [73] SPIRO RC, FREEZE HH, SAMPATH D, GARCIA JA. (1991) Uncoupling of chondroitin sulfate glycosaminoglycan synthesis by brefeldin A. *J Cell Biol* 1991; **115**: 1463–1473.
- [74] STADRK, BUURMAN WA. Current views on structure and function of endothelial adhesion molecules. *Cell Adhesion Commun* 1994; **2**: 261–268.
- [75] STEVENS RL, PARSONS WG, AUSTEN KF, HEIN A, CAULFIELD JP. Novel inhibition of proteoglycan synthesis and exocytosis by diethylcarbamazine in the swarm rat chondrocyte. *J Biol Chem* 1985; **260**: 5777–5786.
- [76] STREULI CH, SCHMIDHAUSER CH, KOBRIN M, BISSELL MJ, DERYNCK R. Extracellular matrix regulates expression of the TGF-1 gene. *J Cell Biol* 1993; **120**: 253–260.
- [77] SUGUMARAN G, SILBERT J. Subfractionation of chick embryo epiphyseal cartilage Golgi. Localization of enzymes involved in the synthesis of the polysaccharide portion of proteochondroitin sulfate. *J Biol Chem* 1991; **266**: 9565–9569.
- [78] UPHOLT WB, CHANDRASEKARAN L, TANZER ML. Molecular cloning and analysis of the protein modules of aggrecans. *EXS* 1994; **70**: 37–52.
- [79] VAN DER KRAAN PM, VITTELS EL, DE VRIES BJ, VAN DEN BERG WB. High susceptibility of human articular cartilage glycosaminoglycan synthesis to changes in inorganic sulfate availability. *J Orthop Res* 1990; **8**: 565–571.
- [80] VIJAYAGOPAL P, CIOLINO HP, RADHAKRISHNAMURTHY B, BERENSON GS. Heparin stimulates proteoglycan synthesis by vascular smooth muscle cells while suppressing cellular proliferation. *Atherosclerosis* 1992; **94**: 135–146.
- [81] VIJAYAGOPAL P, CIOLINO HP, BERENSON GS. Endothelial cell-conditioned medium modulates the synthesis and structure of proteoglycans in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1135**: 129–140.

- [82] WANG XF, LIN HY, NG-EATON E, DOWNWARD J, LODISH HF, WEINBERG RA. Expression cloning and characterization of the TGF-type III receptor. *Cell* 1991; **67**:797–805.
- [83] YAMADA Y, HORTON W, MIYASHITA T, SAVAGNER P, HASSELL J, DOEGE K. Expression and structure of cartilage proteins. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1991; **11**: 350–356.
- [84] YAN WQ, NAKASHIMA K, IWAMOTO M, KATO Y. Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J Biol Chem* 1990; **265**: 10125–10131.
- [85] YANAGISHITA M, HASCALL VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9451–9454.
- [86] YANAGISHITA M. Metabolic labeling of glycosylphosphatidylinositol-anchor of heparan sulfate proteoglycans in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9499–9504.
- [87] YANAGISHITA M. Metabolism of plasma membrane-associated heparan sulfate proteoglycans. *Adv Exp Med Biol* 1992; **313**: 113–120.
- [88] YEO TK, MACFARLANE S, WIGHT TN. Characterization of a chondroitin sulfate proteoglycan synthesized by monkey arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Connect Tissue Res* 1992; **27**: 265–277.
- [89] ŻAK I. Glikoproteiny ssaków. Jeżewska M [red. serii] Monografie Biochemiczne nr 35. Warszawa, PWN 1990: 1–113.
- [90] ŻAK I. Białka mozaikowe. *Post Biochem* 1995; **41**:(2).
- [91] ŻAK I, DRÓZDŹ M. Struktura, biosynteza i funkcja oligosacharydów glikohormonów. *Post Biochem* 1994; **40**: 113–120.
- [92] ŻAK I, DRÓZDŹ M, SKOP B. Synthesis of proteoglycans by rabbit aortic explants in culture after the experimentally induced atherosclerosis. Part I: Distribution of ³H- and ³⁵S- activity incorporated into protein fractions from aortic explants. *Appl Biol Commun* 1993; **3**: 35–46.
- [93] ŻAK I. Synthesis of proteoglycans by rabbit aortic explants in culture after the experimentally induced atherosclerosis. Part II: Composition of glycosaminoglycan derived from [³⁵S]-sulphate-labelled proteoglycans. *Appl Biol Commun* 1993; **3**:95–104.
- [94] ŻAK I, SKOP B. Synthesis of proteoglycans in tissue explants derived from aortas of rabbits with experimentally induced atherosclerosis. *Acta Biochim Polon* 1993; **40**: 167–170.
- [95] ŻAK I. Comparison of glycoprotein synthesis by aortic explants from control and cholesterol-fed rabbits. *Glycoconjugate J* 1993; **10**: 256.
- [96] ŻAK I. Wpływ hipercholesterolemicznej surowicy na syntezę proteoglikanów w hodowli eksplantów intima-media aorty, *in vitro*. [w] Streszczenia. XXX Zjazd Pol Tow Biochem, Szczecin: Wydawnictwo Pomorska Akademia Medyczna 1994; 325;
- [97] ŻAK I. Biosynteza proteoglikanów ściany tętniczej królików z doświadczalną hipercholesterolemią, *in vitro*. *Silesiensis Annales Academiae Medicae* : Katowice 1994: 1–233.

Otrzymano: 11.04.1995 r.

Przyjęto: 27.06.1995 r.

Adres autora:40-752 Katowice, Medyków 18,

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, poprawione po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. 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 tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. 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, typy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być aktualnymi współpracownikami ani pracownikami instytucji, w której pracuje autor. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,
tabel i rycin.

tak Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została
nie wysłana do innej redakcji. **tak** **nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak** **nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy
plik i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak** **nie**

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-
kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak** **nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak** **nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępach Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-
kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki	207
RATAJCZAK M.Z., MARLICZ W., RATAJCZAK J., SKÓRSKI T.: Charakterystyka, metody izolacji oraz praktyczne wykorzystanie wczesnych ludzkich komórek krwiotwórczych w medycynie klinicznej – Aspekty transplantologiczne	209
FERTAŁA J.: Topoizomerazy DNA – Rola biologiczna i możliwość wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej	235
RADZISZEWSKA E.: Fizjologiczna rola apoptozy	247
KOŁADKIEWICZ I., STROSZNAJDER J.: Reakcje ADP-rybozylacji białek i ich znaczenie biologiczne w komórkach eukariotycznych	265
LIBIĆ M., PRZYWARA L.: Izolowanie gametofitów i gamet żeńskich u roślin okrytonasiennych (<i>Angiospermae</i>)	277
WÓJCIK C.: Proteasomy i szlak degradacji białek zależny od ubikwityny	295
ŻAK I.: Proteoglikany: struktura i biosynteza	317

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1996

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1996 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, 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. 2 suplementy) na rok 1996:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 40 zł,
a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI on year 1996 is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

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

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705