

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 22 NR-4'95
(343–430)

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 BILŃSKI (*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 KOROHODA, 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.

© Copyright by Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Wszystkie prawa zastrzeżone. Kopiowanie części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this work covered by the copyrights hereon may be reproduced or copied in any form by any means without permission.

Ark. wyd. 7,5. Ark. druk. 5,5. Oddano do składu w sierpniu 1995 r. Podpisano do druku w październiku 1995 r. Druk ukończono w listopadzie 1995 r.

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- O możliwościach wprowadzania makrocząsteczek do komórek piszą Autorzy na stronie 345.
- Podczas aktywacji płytek krwi związanej z procesem przekazywania sygnału do komórki dochodzi do zmian jej kształtu, sekrecji zmagazynowanych substancji. Opis uczestniczących w tym procesie receptorów powierzchniowych, białek G, i kinaz białkowych tyrozynowych oraz mechanizmu reorganizacji cytoszkieletu znajdzie Czytelnik na stronie 359.
- Jednym z etapów transkrypcji jest elongacja łańcucha RNA. W czasie jej trwania występuje zjawisko pauzowania, tj. zatrzymania polimerazy w określonym miejscu matrycy prowadzące niekiedy do przedwczesnej terminacji. Bliżej na ten temat można przeczytać na stronie 379.
- Genetyczna predyspozycja do zachorowania na cukrzycę insulinozależną ma charakter wielogenowy. Jednym z loci istotnych w cukrzycy jest region kodujący insulinę, a w nim sekwencja minisatelitarna VNTR (*variable number of tandem repeats*). Badania zmierzające do ustalenia roli tej sekwencji minisatelitarnej w regulacji ekspresji genu kodującego insulinę znajdzie Czytelnik na stronie 395.
- Po intensywnym leczeniu białaczki cytostatykami często pozostaje pewna populacja komórek białczkowych, które mają zwiększoną oporność na leki. Rozpoznanie tej tzw. resztkowej choroby białczkowej jest istotne dla oceny skuteczności leczenia. Opis czułych metod używanych do wykrycia tych nielicznych komórek białczkowych znajdzie Czytelnik na stronie 407.
- U podłoża schorzeń nowotworowych leżą zaburzenia ekspresji genów w zmienionych komórkach. Zaburzenia te mogą być spowodowane uszkodzeniem genów hamujących proliferację komórek tzw. antyonkogenów bądź też nadmierną ekspresją genów pobudzających namnażanie komórek tzw. protoonkogenów. Takie rozumowanie stanowi punkt wyjścia molekularnych podstaw terapii antysensowej, która polega na swoistym blokowaniu nieprawidłowej ekspresji protoonkogenów za pomocą odpowiednich oligonukleotydów. Te ostatnie mogą jednak oprócz efektów terapeutycznych wywierać efekty niepożądane, co opisano w artykule na stronie 415.

METODY WPROWADZANIA MAKROcząSTECZEK DO KOMÓREK*

METHODS FOR INTRODUCING MACROMOLECULES INTO CELLS

Urszula DYBOWSKA, Andrzej SOBOTA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie. Możliwość wprowadzania makrocząSTECZEK do komórek pozwala na ingerencję w zachodzące w niej procesy metaboliczne. Opracowano szereg metod, przy pomocy których można chwilowo przerwać ciągłość błony w celu zmiany jej przepuszczalności dla makrocząSTECZEK. Metody te dzieli się na elektryczne, mechaniczne, chemiczne i z zastosowaniem pęcherzyków błonowych i liposomów. W artykule zostały one zebrane i pokrótce scharakteryzowane, z podkreśleniem ich zalet i wad.

Słowa kluczowe: elektroporacja, mikroiniekcja, sonifikacja, detergenty, liposomy, błony biologiczne.

Summary. Possibility of introducing macromolecules into cells enables to interfere with many cellular processes. Several methods of plasma membrane temporary poration have been developed, in order to enhance permeability of membrane to macromolecules. These methods can be divided into electrical, mechanical, chemical, and vehicle-mediated. In the present paper they are reviewed and characterized, and their advantages and disadvantages are pointed out.

Key words: electroporation, microinjection, sonication, detergents, liposomes, biological membranes.

1. WSTĘP

W badaniach mechanizmów rządzących różnymi procesami fizjologicznymi w komórce, od wielu lat wykorzystuje się metody wprowadzania do cytoplazmy komórek specyficznych makrocząSTECZEK: monoklonalnych przeciwciał, oddziałujących swoiście z określonymi białkami, oczyszczonych białek lub ich fragmentów, oligo-

*Praca finansowana w ramach projektu badawczego KBN, PB 0082/P2/94/07 i działalności statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

nukleotydów, kwasów nukleinowych w postaci plazmidów oraz liposomów itp. Metody te pozwalają na ingerencję w procesy metaboliczne oraz lokalizację istotnych fizjologicznie cząsteczek lub struktur w komórce [3,5,7,18,32,37,40,41]. Ważne jest zatem opracowanie stosunkowo łatwych, a jednocześnie nietoksycznych i tanich technik pozwalających na wprowadzanie makrocząsteczek do komórek. Techniki te polegają na krótkotrwałym zniesieniu integralności błony plazmatycznej, czyli wytworzeniu w niej na tyle dużych porów, aby badane cząsteczki mogły wnikać do cytoplazmy, ale na tyle małych, aby możliwe było ich zasklepienie po pewnym czasie, charakterystycznym dla danego typu komórek. Ważne jest przy tym, aby procedura "dziurawienia" błony plazmatycznej jak najmniej uszkadzała komórkę i nie zakłócała podstawowych procesów fizjologicznych. Procesowi wytwarzania porów w błonie zawsze towarzyszą jednak trwałe uszkodzenia i śmierć części komórek. Dlatego istotne jest określenie przeżywalności komórek po zastosowaniu danej procedury. W tym celu stosuje się różne testy określające zmiany przepuszczalności błony komórkowej, np. dla barwników, jak błękit trypanu [27] lub jodek propydydy [25], testy stwierdzające pojawianie się na zewnątrz komórki enzymów cytoplazmatycznych, jak dehydrogenaza mleczanowa [2], oraz testy oceniające zachowanie przez komórki zdolności do adhezji, lokomocji i podziałów [4,10,20,45].

Metody wprowadzania makrocząsteczek do komórek można podzielić na elektryczne, mechaniczne, chemiczne oraz z zastosowaniem liposomów lub pęcherzyków błonowych, pełniących rolę nośników dla różnych związków chemicznych. W dalszej części pracy omówiono podstawowe zasady poszczególnych metod, z podkreśleniem ich zalet i ograniczeń (tab. 1).

2. ELEKTROPORACJA

Działanie na komórki stałym prądem elektrycznym prowadzi, na skutek zmiany ładunku błony plazmatycznej, do powstawania w niej porów o średnicy do kilkunastu nm. Przerwanie ciągłości błony zachodzi, gdy potencjał błonowy w wyniku przyłożonego napięcia przekroczy 0,5–1,0 V. Wartość ta zależy od rodzaju i rozmiarów komórki, natężenia pola elektrycznego, czasu trwania impulsu oraz chemicznego składu roztworu, w którym znajdują się komórki. Urządzenia stosowane do wytwarzania kontrolowanych impulsów elektrycznych umożliwiają regulację napięcia i czasu trwania impulsu. Natężenie pola elektrycznego (E) wytwarzanego przez generator wysokiego napięcia (V) określa się wzorem:

$$E = V/d$$

gdzie d – odległość między elektrodami.

Pole elektryczne uszkadza błonę komórkową, kiedy jego natężenie wyniesie od kilkuset do kilkunastu tysięcy V/cm [48]. Najczęściej stosuje się pojedyncze impulsy

elektryczne [15], choć czasami również wielokrotne [27,51]. Optymalny czas trwania impulsu i natężenie pola wyznaczone są dla każdego typu komórek eksperymentalnie. Elektroporacja jest najczęściej wykorzystywana do wprowadzania do komórek fragmentów DNA [15], różnych białek, np. histonów (m. cz. 20 kDa) [22], owoalbuminy (m. cz. 45 kDa), immunoglobulin G (m. cz. 150 kDa), katalazy (m. cz. 240 kDa), ferrytyny (m. cz. 445 kDa) [48], a także cząstek koloidalnego złota (o średnicy 5–20 nm) i lateksu (o średnicy 0,1 μm) [22,48]. Elektroporacji mogą być poddawane zarówno komórki zwierzęce, jak i roślinne, przylegające do podłoża lub pozostające w roztworze. Możliwe jest też perforowanie komórek wchodzących w skład narządów, np. po elektroporacji wysepek Langerhansa trzustki szczura obserwowano zwiększone wydzielanie insuliny z komórek β [51].

Stan przepuszczalności błon dla makrocząsteczek po elektroporacji może utrzymywać się przez kilka minut do kilkunastu godzin, w zależności od rodzaju komórek, natężenia przyłożonego pola elektrycznego, czasu trwania impulsu, temperatury i składu chemicznego środowiska. W doświadczeniach polegających na wprowadzaniu dekstranu (m. cz. 40 kDa) do cytoplazmy komórek HeLa, P3 X63 Ag8 lub CV-1, po poddaniu komórek pięciu 13-mikrosekundowym impulsom elektrycznym o natężeniu 4 kV/cm, czas zamykania się porów w błonie wyniósł 5 min w temperaturze 37°C [27], podczas gdy w przypadku erytrocytów, do wnętrza których wprowadzano sacharozę, w takich samych warunkach (jedynie czas trwania impulsu był dłuższy, 100 μs) zasklepienie się porów trwało aż 20 godzin [39].

Elektroporację prowadzi się najczęściej w buforowym roztworze soli fizjologicznej (PBS) lub w pożywce stosowanej do hodowli danego typu komórek. Przeżywalność komórek obniża się wraz ze wzrostem natężenia pola elektrycznego i czasu trwania impulsu, zależy też od obecności jonów dwuwartościowych i glukozy [15, 16]. Przed umieszczeniem w generatorze i rozpoczęciem elektroporacji kuwetę wraz z komórkami i makrocząsteczkami doprowadza się do temperatury 0–4°C, aby spowolnić proces zasklepienia się porów. W przypadku komórek charakteryzujących się powolnym zamykaniem porów, elektroporacja może być przeprowadzona w wyższej temperaturze. W trakcie elektroporacji, przez powstające w błonie pory, makrocząsteczki wnikają do wnętrza komórki. Następnie komórki przenosi się na określony czas do pożywki, w celu umożliwienia regeneracji błony i przyczepienia komórek do podłoża (jeśli mają taką właściwość). Martwe komórki i materiał, który nie został wprowadzony do cytoplazmy, zostają następnie usunięte.

3. METODY MECHANICZNE

3.1. Mikroiniekcja

Metoda polega na przebiciu błony unieruchomionej komórki szklaną mikrokapilarą i wprowadzeniu zawartego w niej płynu wraz z cząsteczkami. Podstawowe wyposażenie do mikroiniekcji składa się z mikroigły pozwalającej na wstrzyknięcie roztworu o objętości 10^{-12} ml, mikromanipulatora, strzykawki jako źródła ciśnienia,

TABELA 1. Metody wprowadzania makrocząstek do komórek

METODY	OCENA METODY		ŹRÓDŁO
	WPROWADZA NE CZĄSTKI	WADY	
ELEKTROPO- RACJA	Białka DNA Lateks	Metoda szybka, łatwa Uniwersalna dla komórek przyle- gających do podłoża i zawieszonych w roz- tworze Duża wydajność wprowadzania makrocząste- czek (ok. 10^6 /komórke) przy jednoczesnym "naładowaniu" większości komórek w popu- lacji	[3,15,27]
MIKROINIEK- CJA	Barwniki Białka Kwasy nukleino- we Organelle	Mniejsza niż przy innych metodach objętość (nanolitrowa) roztworu wprowadzanych cząste- czek Łatwość wprowadzania dużych cząstek (orga- nelle) Iniekcja do określonego miejsca w komórce, wysoka dokładność i powtarzalność wszystkich czynności Wysoka przeżywalność komórek (60–90%)	[24,47]
MECHANICZNE > ZA POMOCĄ SZKLANYCH KULEK > ZESKRO- BYWANIA	Cząsteczki o m. cz. 9–150 kDa Dekstran o m.cz. 10–2000 kDa Białka Przeciwciężła Kwasy nukleinowe	Metody łatwe i tanie Można szybko naładować dużą liczbę komórek (10^5 – 10^6) Mała ilość roztworu do wprowadzenia (20–200 μ l na szkiełko nakrywkowe) Wysoka przeżywalność komórek	[24,25,26]

MECHANICZNE					
>PRZECINANIA	Cząsteczki o m. cz. do 150 kDa	Metoda szybka, łatwa	Komórki niejednakowo "naładowane" cząsteczkami		
SONIFIKACJA	Barwniki Białka DNA		Komórki adherentne muszą być zawieszane w roztworze	[14,16]	
Z UŻYCIEM PECHERZYKÓW BŁONOWYCH	Białka Przeciwciiała Kwasy nukleinowe Chromosomy Jądra	Metoda wydajna: możliwość równoczesnego wprowadzania dużej liczby makrocząsteczek (10^6-10^8 /komórkę) do większości komórek w populacji Podobnie jak w przypadku mikroiniekcji możliwość wprowadzenia dużych cząstek (organelle)	Wymaga intensywnych prac przygotowawczych Utrata części materiału na skutek nieszczelności niektórych pęcherzyków Możliwość włączania składników błony pęcherzyka do błony komórkowej Przecherzyk błonowy może ulegać endocytotzie zamiast fuzji	[8, 21, 29, 50]	
CHEMICZNE	Białka Przeciwciiała	Metoda szybka, łatwa	Utrata cytosolowych białek o m. cz. kilkuset kDa	[12,30,40]	

systemu hermetycznego połączenia wymienionych elementów oraz odwróconego mikroskopu optycznego.

Powodzenie iniekcji zależy głównie od konstrukcji mikroigły, jej średnicy i kształtu ostrza [24]. Wciąż jeszcze stosowane są ręcznie obsługiwane mikromanipulatory, chociaż są mniej precyzyjne niż urządzenia nowszej generacji. Po ich użyciu często obserwuje się wzmożoną śmiertelność komórek [47]. Najnowsze typy urządzeń do mikroiniekcji skonstruowano na podstawie nowoczesnych osiągnięć mikroelektroniki, a także precyzyjnej pneumatyki. Posiadają one wiele udoskonaleń technicznych: kompresor z reduktorem ciśnienia, możliwość wymiany różnych typów kapilar, stopniowania i precyzyjnej regulacji wypływu roztworu z mikroigły, automatycznego kończenia mikroiniekcji, a także pracy mikromanipulatora w różnych położeniach. Ponadto wyposażone są w specjalny uchwyt komórek, ograniczający ich boczne przesuwanie się i zapobiegający uszkodzeniom. Urządzenia te charakteryzuje duża szybkość iniekcji (6 mm/s), możliwość zaprogramowania poszczególnych jej etapów oraz wysoka powtarzalność.

Mikroiniekcja najczęściej wykorzystywana jest w doświadczeniach, w których obiektem są duże komórki, jak oocyty *Xenopus laevis*, gdzie bardzo często bada się ekspresję genów [6, 43]. Ostatnio metoda ta stosowana jest również z powodzeniem w przypadku mniejszych komórek, takich jak fibroblasty [18,33,49] lub komórki nerek [23]. Mikroiniekcja jest jedną z niewielu technik, przy pomocy której do komórek można wprowadzać cząsteczki różnej wielkości, fluorochromy, barwniki przyżyciowe, białka (w tym przeciwciała), kwasy nukleinowe, a nawet całe organelle (mitochondria, chloroplasty lub jądra komórkowe) [18,45,47]. Przed pobraniem materiału doświadczalnego, z mikrokapilary i ze strzykawką usuwa się powietrze za pomocą oleju parafinowego. Następnie pobiera się kilka mikrolitrów próbki. Mikroigłę wraz ze strzykawką montuje się w mikromanipulatorze. Kontrolując proces z zastosowaniem mikroskopu doprowadza się do zbliżenia końca mikroigły z błoną komórki, jej przebicia i wstrzyknięcia zawartości mikrokapilary do cytoplazmy. Po kilku sekundach igłę usuwa się z komórki. Opisana procedura pozwala na zastrzyknięcie 2–7 komórek na minutę [6,47].

3.2. Zastosowanie szklanych kulek

W metodzie tej pojedynczą warstwę komórek, przyczepionych do podłoża, wraz ze znajdującymi się w środowisku cząsteczkami, które mają być wprowadzone do cytoplazmy, zasypuje się porcją szklanych kulek o średnicy 50–500 μm [24,26]. Kulki, uderzając o powierzchnię komórek, powodują powstawanie drobnych pęknięć błony plazmatycznej, przez które makrocząsteczki mogą dyfundować do cytoplazmy. Stopień "naładowania" komórek i ich przeżywalność zależą od rozmiaru i liczby kulek (najlepsze wyniki dla komórek pochodzących z różnych linii hodowlanych uzyskano stosując kulki szklane o średnicy 450 μm) [24,26], rozmiaru wprowadzanych makrocząsteczek oraz powierzchniowych właściwości kulek. W tym ostatnim przypadku

właściwości te mają większy wpływ na przeżywalność komórek niż na stopień ich "ładowania" makrocząsteczkami. Przepłukanie kulek 5 M HCl wprawdzie wzmacnia ich przyczepność do błony komórkowej i zwiększa stopień "ładowania" komórek makrocząsteczkami, ale z drugiej strony zmniejsza przeżywalność komórek. Powoduje to również znaczną utratę makrocząsteczek, przez ich adsorbpcję na powierzchni kulek. Przepłukanie kulek 4 M NaOH powoduje natomiast prawie dwukrotny wzrost przeżywalności komórek, zaś kulki wykazują mniejszą tendencję do przylegania do błony komórkowej. Z zastosowaniem opisanej metody wprowadzono cząsteczki dekstranu o m. cz. 90–150 kDa do komórek linii hodowlanych Swiss-3T3, Ptk-2, MDCK, BAE, J744 [24,26].

W skrócie, postępowanie w tej metodzie jest następujące. Pojedynczą warstwę komórek, po przepłukaniu płynem fizjologicznym, inkubuje się na szkiełku podstawowym z makrocząsteczkami, które mają być wprowadzone do ich cytoplazmy. Porcję szklanych kulek, przemytych najpierw 4 M NaOH, a następnie wodą destylowaną, zrzuca się na komórki z odległości 1 do 3 cm. Jeśli jest wymagany wysoki stopień "naładowania" komórek, kulki po zrzuceniu kołysz się 3 do 6 razy na powierzchni szkiełka. Kulki usuwane są przez zanurzenie szkiełka w PBS [24].

3.3. Mechaniczne usuwanie komórek przyczepionych do podłoża

W trakcie mechanicznego odrywania (zeskrobywania) komórek przyczepionych do podłoża szklaną bagietką zakończoną gumową końcówką (ang. *rubber policeman*), dochodzi do uszkodzenia błony plazmatycznej. Przez powstałe pęknięcia o średnicy do 50 nm, do wnętrza komórek mogą dyfundować cząsteczki różnej wielkości [25]. Na stopień "naładowania" komórek, a także ich przeżywalność duży wpływ ma siła, z jaką komórki przylegają do podłoża. Słabiej przyczepione komórki są łatwiej odrywane i w mniejszym stopniu podatne na "dziurawienie", ale oczywiście więcej z nich przeżywa procedurę. "Ładowanie" przez zeskrobywanie (ang. *scrape-loading*) prowadzono z dobrymi wynikami na komórkach linii Swiss-3T3, J774, HeLa i neutrofilach ludzkich [25,45]. Za pomocą tej procedury do komórek wprowadzano dekstrany o m. cz. 10–2 000 kDa, białka (owoalbuminę, aktynę lub przeciwciała) oraz RNA i DNA. Przeżywalność komórek wynosiła zazwyczaj 50–60% [25].

W przypadku tej metody w postępowaniu można wyróżnić następujące etapy. Komórki wyhodowane na szalce o średnicy 35 mm, po przepłukaniu roztworem fizjologicznym, pokrywa się 20–200 μ l roztworu zawierającego makrocząsteczki, które będą wprowadzone do cytoplazmy. Komórki zeskrobywane są gumową końcówką nałożoną na bagietkę. Po 10–20 sekundach usuwa się nadmiar cząsteczek użytych do "ładowania", po czym komórki zawieszają w pożywce i pozostawiają w inkubatorze, aby ponownie przyczepiły się do podłoża [24,25].

3.4. Uszkodzanie komórek przez przecinanie

Stosując tę metodę (ang. *scratch-loading*) wprowadzano do komórek nabłonka wyścielającego wyznakowany fluorescencyjnie dekstran o m. cz. 9 kDa [24], a do

fibroblastów Swiss-3T3 i Ptk-2 dekstrany o m. cz. 40–150 kDa [43]. Komórki osadzone na szkiełkach nakrywkowych przemywa się odpowiednim buforem i nawarstwa na nie roztwór makrocząsteczek, które powinny być wprowadzone do cytoplazmy. Następnie ostrym narzędziem dokonuje się wielu nacięć w warstwie komórek, co prowadzi do uszkodzenia błony plazmatycznej komórek znajdujących się na linii cięcia. Po 30 minutach inkubacji komórki przepłukuje się świeżą pożywką, aby usunąć nadmiar cząsteczek. W komórkach znajdujących się na linii skaleceń wkrótce zaczyna się synteza DNA i dochodzi do podziałów mitotycznych. W związku z tym komórki te mogą stanowić dobry obiekt do obserwacji wymienionych zjawisk [24,45].

3.5. Zastosowanie ultradźwięków

Fale ultradźwiękowe o częstotliwości powyżej 20 kHz, wywołują zmiany w strukturze błony komórkowej, w tym jej zwiększoną przepuszczalność w stosunku do makrocząsteczek, takich jak DNA, białka lub barwniki [14]. Co więcej, komórki te wykazują znaczny stopień przeżywalności, np. po wprowadzeniu do komórek *Dicystostelium discoideum* cząsteczek dekstranu o m. cz. 40 kDa przeżywalność komórek wynosiła prawie 100% [46].

4. WPROWADZANIE MAKROCZĄSTECZEK Z WYKORZYSTANIEM LIPOSOMÓW I PĘCHERZYKÓW BŁON BIOLOGICZNYCH

Wiele, zarówno nisko-, jak i wysokocząsteczkowych substancji o znaczeniu biologicznym można wprowadzić do komórek we wnętrzu pęcherzyków błonowych, np. cieni erytrocytów lub liposomów. Po wywołaniu fuzji takich pęcherzyków z błoną komórkową, ich zawartość zostaje wprowadzona do cytoplazmy. Samorzutna fuzja pęcherzyków z błoną komórkową zachodzi z niską wydajnością. Proces ten można indukować przy pomocy glikolu polietylenowego, jonów wapnia, lizofosfolipidów, a także cząsteczek pochodzenia wirusowego, np. Sendai. Wymienione czynniki wywołują lokalną destabilizację struktury błony i zwiększają wielokrotnie częstość fuzji [8,13,19].

Do przenoszenia makrocząsteczek wykorzystuje się przede wszystkim liposomy, zarówno wielowarstwowe (MLV – ang. *multilamellar vesicles*), jak i jednowarstwowe (LUV – ang. *large unilamellar vesicles*). Średnica tych dwóch rodzajów liposomów wynosi od kilkudziesięciu do kilku tysięcy nm [50]. W trakcie formowania liposomów, do ich wnętrza można wprowadzić makrocząsteczki, przeciwciała, kwasy nukleinowe [8,36], chromosomy [29], a nawet jąderka [21]. Metodę wprowadzania makrocząsteczek z wykorzystaniem pęcherzyków stosuje się w hodowlach komórek

zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych [50]. Ostatnio, w celu wprowadzenia do komórek fragmentów DNA, stosowane są liposomy zbudowane m.in. z fosfatydyloetanolaminy, w której obie reszty acylowe pochodzą z kwasu oleinowego [11]. Liposomy te łatwiej ulegają fuzji z błoną plazmatyczną komórek, w wyniku czego cząsteczki DNA zostają wprowadzone do cytoplazmy [11]. Jeśli w podobnym celu używa się cieni erytrocytów, które wypełnia się makrocząsteczkami, korzystając zazwyczaj z hipotonicznej metody Rechsteinerja [35]. Tak jak w przypadku liposomów, egzogenne cząsteczki zostają uwieszone wewnątrz pęcherzyka wraz z częścią fazy wodnej, podczas ponownego zamykania się błony [50]. Nadmiar cząsteczek w środowisku zewnętrznym usuwa się przez wirowanie, dializę lub sączenie molekularne. Komórki, do których wprowadzono makrocząsteczki w drodze fuzji z liposomami, charakteryzują się przeważnie dobrą przeżywalnością i mogą podlegać wielokrotnym pasażom [8].

5. METODY CHEMICZNE

Błona plazmatyczna komórek pod wpływem detergentów, zastosowanych w stężeniach niesolubilizujących, staje się przepuszczalna dla związków nisko-, jak i wysokocząsteczkowych [17]. Do permeabilizacji błony komórkowej stosowane są przede wszystkim detergenty niejonowe, np. Triton X-100, skutecznie zmieniające oddziaływania lipid-lipid i lipid-białko, a także detergenty obojnacze (ang. *zwitterionic*). Budową przypominają cząsteczki lizofosfolipidów, przez co łatwo zaburzają strukturę dwuwarstwy lipidowej błony, prowadząc do zmian jej przepuszczalności. Aby przezwyciężyć problemy z przeżywalnością komórek, inkubuje się je przed zastosowaniem detergentu w 0,5–1,2 M roztworze glicerolu [30, 40]. W ten sposób wprowadzono do mysich komórek linii neuroblastoma szereg przeciwciał [40].

W celu permeabilizacji błony plazmatycznej komórek bardzo często stosuje się również związki amfifilowe, np. digitoninę i saponinę, zawierające w części hydrofobowej pierścienie aromatyczne i cykliczne. Związki te tworzą kompleksy z cząsteczkami cholesterolu i jego pochodnych, co prowadzi do zmian przepuszczalności błony komórkowej [16, 17]. Działając digitoniną w stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$ na ludzkie komórki HeLa i szczurze NRK, wprowadzono do nich allofikocyjaninę, białko o m. cz. 104 kDa [42]. Permeabilizacja komórek chromochłonnych 10 μM digitoniną pozwoliła na wprowadzenie do ich cytoplazmy przeciwciał przeciw fodyrynie, co przyczyniło się do określenia roli cytoszkieletu podbłonowego w procesie egzocytozy [1,34].

Skuteczność wprowadzania cząsteczek do komórek i stopień przeżywalności komórek w tej metodzie zależy przede wszystkim od stężenia detergentu. Wraz z jego wzrostem wzrasta przepuszczalność błony, ale obniża się przeżywalność komórek [30,31,40]. Komórki, odmyte od pożywki, przyczepione do podłoża lub pozostające

w buforze, inkubowane są z detergentem. Następnie komórki umieszcza się w roztworze zawierającym makrocząsteczki, które dyfundują do komórek [9,34]. W przypadku digitoniny lub saponiny, komórki poddane ich działaniu zachowują przez dłuższy czas zwiększoną przepuszczalność dla makrocząsteczek. W przypadku lizofosfolipidów, komórki najpierw inkubuje się w glicerolu o stężeniu 1,2 M, następnie w obecności fosfolipidu i ostatecznie w PBS, w obecności makrocząsteczek, które powinny być wprowadzone do cytoplazmy [40].

W celu wprowadzania do komórek substancji o znaczeniu biologicznym wykorzystuje się, poza detergentami, szereg innych związków chemicznych, jak ATP, DEAE-dekstran czy fosforan wapnia. DEAE-dekstran i $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ stosuje się powszechnie do wprowadzania do komórek fragmentów DNA [38], zaś związki o m. cz. ≤ 830 Da z dużą wydajnością i w krótkim czasie (1–5 min) można wprowadzić do komórek w obecności 5 mM ATP [44].

6. UWAGI KOŃCOWE

Metody wprowadzania egzogennych makrocząsteczek do komórek są bardzo przydatne w badaniach mechanizmów rządzących różnymi procesami fizjologicznymi. Mikroiniekcja na przykład pozwala na precyzyjne wprowadzenie określonej ilości cząsteczek do wybranej komórki [28], podczas gdy z zastosowaniem innych metod wprowadzenie cząsteczek odbywa się na zasadzie przypadku [26]. W zależności od zastosowanej metody może dochodzić jednak do różnego typu uszkodzenia błony komórkowej, co ma istotne znaczenie w procesie powrotu komórek do właściwego im stanu funkcjonalnego. Ważna jest także ilość materiału, jaką należy użyć, aby wprowadzić określone cząsteczki do komórki. Bardzo często badane związki są dostępne w ograniczonych ilościach i dlatego ich minimalne zużycie jest bardzo pożądane. W tym przypadku lepiej posługiwać się jest metodą, dzięki której w krótkim czasie można “naładować” dużą liczbę komórek. Również koszty urządzeń stosowanych w poszczególnych procedurach “dziurawienia” błony komórkowej i wprowadzania makrocząsteczek do komórek charakteryzuje bardzo duża rozpiętość. Wymienione czynniki oraz efektywność, precyzyjność, praktyczność i preferencje eksperymentatora będą zatem decydować o wyborze metody.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują dr Annie Filipek za uwagi dotyczące manuskryptu pracy.

LITERATURA

- [1] BAKER PF, KNIGHT DE. Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature* 1978; **276**: 620–622.
- [2] BASHFORD CL, ALDER GM, MENESTRINA G, MICKLEM KJ, MURPHY JJ, PASTERNAK CHA. Membrane damage by hemolytic viruses, toxins, complement and other cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9300–9308.

- [3] CALLIS J, FROMM M, WALBOT V. Expression of mRNA electroporated into plant and animal cells. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 5823–5830.
- [4] CHAKRABARTI R, WYLIE DE, SCHUSTER SM. Transfer of monoclonal antibodies into mammalian cells by electroporation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 15494–15500.
- [5] CHU G, HAYAKAWA H, BERG P. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 1311–1325.
- [6] CONTRERAS R, CHEROUTRE H, FIERIS W. A simple apparatus for injection of nanoliter quantities into *Xenopus laevis* oocytes. *Anal Biochem* 1981; **113**: 185–187.
- [7] DOXEY SJ, BRODSKY FM, BLANK GS, HELENIUS A. Inhibition of endocytosis by anti-clathrin antibodies. *Cell* 1987; **50**: 453–463.
- [8] DOXEY SJ, SAMBROOK J, HELENIUS A, WHITE J. An efficient method for introducing macromolecules into living cells. *J Cell Biol* 1985; **101**: 19–27.
- [9] DUNN LA, HOLZ RW. Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenalmedullary chromaffin cells. *J Biol Chem* 1983; **258**: 4989–4993.
- [10] FECHHEIMER M, TAYLOR DL. Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum amoebae* by controlled sonication. *Methods. Cell Biol* 1987; **28**: 179–190.
- [11] FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN W, WENZ M, NORTHROP P, RINGOLD GM, DANIELSEN M. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **21**: 7413–7417.
- [12] FISKUM G, CRAIG SW, DECKER GL, LEHNINGER AL. The cytoskeleton of digitonin-treated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 3430–3434.
- [13] GAJEWSKI W, WĘGLEŃSKI P. Inżynieria genetyczna. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe 1986: 1–327.
- [14] GRĄCZEWSKI J. Leczenie ultradźwiękami. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich 1964: 1–94.
- [15] HAMA-INABA H, TAKAHASHI M, KASAI M, SHIOMI T, ITO A, HANAOKA F, SATO K. Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to mammalian cells in suspension. *Cell Struct Funct* 1987; **12**: 173–180.
- [16] HELENIUS A, McCASLIN DR, FRIES E, TANFORD CH. Properties of detergents. *Methods Enzymol* 1979; **56**, 734–749.
- [17] HELENIUS A, SIMONS K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1974; **415**: 29–79.
- [18] JOCKUSCH BM, FUCHTBAUER A, WIEGAND C, HONER B. Probing the cytoskeleton by microinjection. [w] Shay JW [red.] Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton. New York: Plenum Publishing Corporation 1986: 1–40.
- [19] KAWIAK J, MIRECKA J, OLSZEWSKA M, WARCHOŁ J. Podstawy cytofizjologii. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe 1995: 1–613.
- [20] KNUTSON JC, YEE D. Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. *Anal Biochem* 1987; **164**: 44–52.
- [21] KONDOROSIE, DUDA E. Introduction of foreign genetic material into cultured mammalian cells by liposomes loaded with isolated nuclei. *FEBS Lett* 1980; **120**: 37–40.
- [22] LAMBERT H, PANKOV R, GAUTHIER J, HANCOCK R. Electroporation-mediated uptake of proteins into mammalian cells. *Biochem Cell Biol* 1990; **68**: 729–734.
- [23] LOBL TJ, MITCHELL MA, MAGGIORA LL. SV-40 large T-antigen nuclear signal analogues: successful nuclear targeting with bovine serum albumin but not low molecular weight fluorescent conjugates. *Biopolymers* 1990; **29**: 197–203.
- [24] McNEIL PL. Incorporation of macromolecules into living cells. *Methods Cell Biol* 1989; **29**: 153–173.
- [25] McNEIL PL, MURPHY RF, LANNI F, TAYLOR DL. A method for incorporating macromolecules into adherent cells. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1556–1564.

- [26] McNEIL PL, WARDER E. Glass beads load macromolecules into living cells. *J Cell Sci* 1987; **88**: 669–678.
- [27] MICHEL MR, ELGIZOLI M, KOBLET H, KEMPF CH. Diffusion loading conditions determine recovery of protein synthesis in electroporated P3 X63 Ag8 cells. *Experientia* 1988; **44**: 199–203.
- [28] MINASCHEK G, BEREITER-HAHN J, BERTHOLDT G. Quantitation of the volume of liquid injected into cells by means of pressure. *Exp Cell Res* 1989; **183**: 434–442.
- [29] MUKHERJEE AB, ORLOFF S, BUTLER JD, TRICHE T, LALLEY P, SCHULMAN JD. Entrapment of metaphase chromosomes into phospholipid vesicles (lipochromosomes): carrier potential in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 1361–1365.
- [30] NOMURA S, KAMIYA T, OISHI M. A procedure to introduce protein molecules into living mammalian cells. *Exp Cell Res* 1986; **163**: 434–444.
- [31] PARTEARROYO MA, OSTOLAZA H, GONI FM, BARBERA-GUILLEME. Surfactant-induced cell toxicity and cell lysis. A study using B 16 melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 1990; **40**: 1323–1328.
- [32] PATEL HM, RYMAN BE. α -Mannosidase in zinc-deficient rats: Possibility of liposomal therapy in mannosidosis. *Biochem Soc Trans* 1974; **2**: 1014–1117.
- [33] PAVALKO FM, BURRIDGE K. Disruption of the actin cytoskeleton after microinjection of proteolytic fragments of α -actinin. *J Cell Biol* 1991; **114**: 481–491.
- [34] PERRIN D, LANGLEY OK, AUNIS D. Anti- α -fodrin inhibits secretion from permeabilized chromaffin cells. *Nature* 1987; **326**: 498–501.
- [35] RECHSTEINER M, SCHLEGEL R. Erythrocyte mediated transfer: applications. [w] Celis JE, Graessman A, Loyer A [red.] Microinjection and organelle transplantation techniques: methods and applications. New York: Academic Press Inc 1986: 1–379.
- [36] ROSEMAN M, LITMAN BJ, THOMPSON TE. Transbilayer exchange of phosphatidylethanolamine for phosphatidylcholine and N-acetylphosphatidyl-ethanolamine in single-walled bilayer vesicles. *Biochemistry* 1975; **14**: 4826–4830.
- [37] SATOH T, NAKAMURA S, KAZIRO Y. Induction of neurite formation in PC12 cells by microinjection of protooncogenic Ha-ras protein preincubated with guanosine-5'-0-(3-thiotriphosphate). *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 4553–4556.
- [38] SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular Cloning. Laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; t.3: 16.45–16.46.
- [39] SEPERSU EH, KINOSITA K, YOW TSONG JR T. Reversible and irreversible modification of erythrocyte membrane permeability by electric field. *Biochim Biophys Acta* 1985; **812**: 779–785.
- [40] SHEA TB, BEERMANN ML. A method for phospholipid-mediated delivery of specific antibodies into adherent cultured cells. *Biotechniques* 1991; **10**: 288–294.
- [41] SHII K, ROTH RA. Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosolic protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4147–4151.
- [42] STEPHEN AA, STERNE-MARR R, GERACE L. Nuclear protein import using digitonin-permeabilized cells. *Methods Enzymol* 1992; **219**: 97–110.
- [43] STEPHENS DL, MILLER TJ, SILVER L, ZISPER D, MERTZ JE. Easy-to-use equipment for the accurate microinjection of nanoliter volumes into the nuclei of amphibian oocytes. *Anal Biochem* 1981; **114**: 299–309.
- [44] STEINBERG TH, NEWMAN AS, SWANSON JA, SILVERSTEIN SC. ATP⁴ permeabilizes the plasma membrane of macrophages to fluorescent dyes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8884–8888.
- [45] SWANSON JA, McNEIL PL. Nuclear reassembly excludes large macromolecules. *Science* 1987; **238**: 548–550.
- [46] TAYLOR DL. Introduction of exogenous molecules into the cytoplasm of *Dictyostelium discoideum* amoebae by controlled sonication. *Methods Cell Biol* 1987; **28**: 179–190.

- [47] TIGYI G, PARKER J. Microinjection into *Xenopus* oocytes: a precise semi-automatic instrument and optimal parameters for injection of mRNAs. *J Biochem Biophys Methods* 1991; **22**: 243–252.
- [48] VIENKEN J, JELTSCH E, ZIMMERMANN V. Penetration and entrapment of large particles in erythrocytes by electrical breakdown techniques. *Cytobiologie* 1978; **17**: 182–196.
- [49] WIEGERS W, HÖNER B, TRAUB P. Microinjection of intermediate filament proteins into living cells with and without preexisting intermediate filament network. *Cell Biol Int Rep* 1991; **15**: 287–296.
- [50] ZIĘTKIEWICZ E, SŁOMSKI R. Zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji o znaczeniu biologicznym do komórek. *Post Biochem* 1984; **30**: 149–172.
- [51] YASEEN MA, PEDLEY KC, HOWELL SL. Regulation of insulin secretion from islets of Langerhans rendered permeable by electric discharge. *Biochem J* 1982; **206**: 81–87.

Otrzymano: 14.01.1994 r.

Przyjęto: 20.07.1995 r.

Adres autorów: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

AKTYWACJA PŁYTEK KRWI; MECHANIZM PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW

PLATELET ACTIVATION; SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY

Beata OLAS, Barbara WACHOWICZ

Katedra Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii UŁ, Łódź

Streszczenie: Aktywacja płytek krwi związana z procesem przekazywania sygnału do komórki, polega na zmianie kształtu komórki, sekrecji zmagazynowanych związków i agregacji. Zmiany konformacyjne integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ umożliwiają wiązanie różnych białek adhezywnych m.in. fibrynogenu, który jest niezbędny do tworzenia agregatów płytkowych. Mechanizmowi aktywacji płytek krwi towarzyszy gwałtowny wzrost fosforylacji reszt tyrozynowych wielu białek płytkowych. W procesie tym uczestniczą kinazy rodziny Src, kinaza Syk oraz FAK. W pracy przedstawiono rolę receptorów powierzchniowych, białek G, białkowych kinaz tyrozynowych oraz mechanizm reorganizacji cytoszkieletu w aktywacji krwinek płytkowych.

Słowa kluczowe: aktywacja płytek krwi, przekazywanie sygnału, białka G, białkowe kinazy tyrozynowe

Summary: Activation of platelets is accompanied by multiple intracellular signal transduction pathways that are responsible for the physiological responses of platelets: changes in platelet shape, release of their intracellular granule contents, changes in the conformation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and binding adhesive ligands such as fibrinogen, what leads to platelet aggregation. In activated platelets a dramatic increase in tyrosine phosphorylation of many platelet proteins is observed. Several tyrosine kinases, including Src family kinases, Syk and FAK have been implicated in the process of phosphorylation. Mechanisms of cytoskeletal reorganisation during platelet activation, platelet G protein, a role of several protein tyrosine kinases and molecular interactions that couple these kinases with G protein, receptor-triggered signaling pathways are described.

Key words: platelet activation, signal transduction, G protein, protein tyrosine kinase

Wykaz stosowanych skrótów: ADP – adenozyndifosforan, ATP – adenozyntrifosforan, cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan, CD (ang. *cluster differentiation*) – kompleks różnicowania, cGMP – cykliczny guanozynomonofosforan, DGEA – sekwencja Asp-Gly-Glu-Ala, Fg – fibrynogen, GAP – białko aktywujące GTP-azę, GDP – guanozyndifosforan, GMP140 – selektyna P, Gp – glikoproteina, GTP – guanozyntrifosforan, 12-HETE – kwas 12-hydroksyeikozatetraenowy, 12-HPETE – kwas 12-hydroperoksyekozatetraenowy, 5-HT – serotonina, PAF (ang. *platelet activating factor*) – czynnik

aktywujący płytki krwi, PDGF – czynnik wzrostu z płytek krwi, PF-4 – czynnik płytkowy 4, PGI₂ – prostacyklina, PKC – białkowa kinaza C, PLA₂ – fosfolipaza A₂, PLC – fosfolipaza C, PLC-γ – fosfolipaza C-γ, PLD – fosfolipaza D, PTP – fosfataza białkowa, SH (ang. src homology) – region wykazujący homologię do produktu genu Src, Tsp – trombospondyna, TXA₂ tromboksan A₂, VASP (ang. *the vasodilator-stimulated phosphoprotein*) – fosfoproteina stymulowana wazodilatorem, vWF – czynnik von Willebranda

1. AKTYWACJA PŁYTEK KRWI

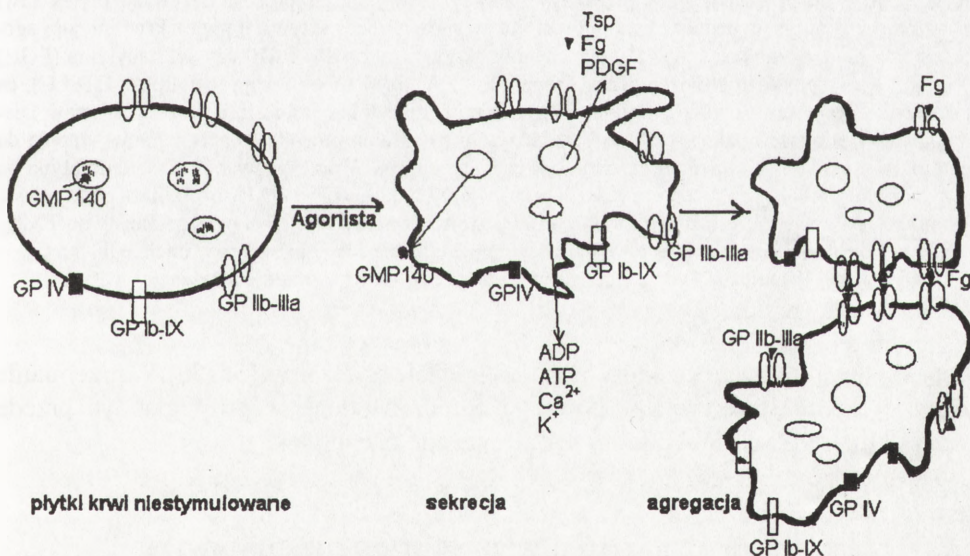
Płytki krwi są bardzo atrakcyjnym modelem badawczym do poznania mechanizmu przekazywania sygnału do komórki. Są bezjądrzastymi, najmniejszymi upostacowanymi elementami morfotycznymi krwi, pochodzącymi z olbrzymich komórek szpiku kostnego-megakariocytów. Charakteryzują się obecnością centralnie zlokalizowanych α-ziarnistości oraz osmofilnych ziarnistości o dużej gęstości elektronowej, w których zmagazynowane są liczne uwalniane w procesie sekrecji związki, m.in.: adenozynodifosforan (ADP), serotonina (5-HT), fibrynogen (Fg), czynnik von Willebranda (vWF), trombospondyna (Tsp), czynnik płytkowy 4 (PF-4), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) oraz selektyna P (GMP140; CD62) eksponowana po uwolnieniu na powierzchni [10, 13, 14, 42].

Rola płytek krwi nie ogranicza się tylko do uczestnictwa w procesie hemostazy. Płytki biorą również udział w tworzeniu zakrzepów, w procesach zapalnych, w procesie metastazy oraz w powstawaniu zmian miażdżycowych w ścianach naczyń będących skutkiem nadmiernej aktywacji krwinek płytkowych [48]. Z płytkami krwi związana jest także aktywność fibrynolityczna [39, 85].

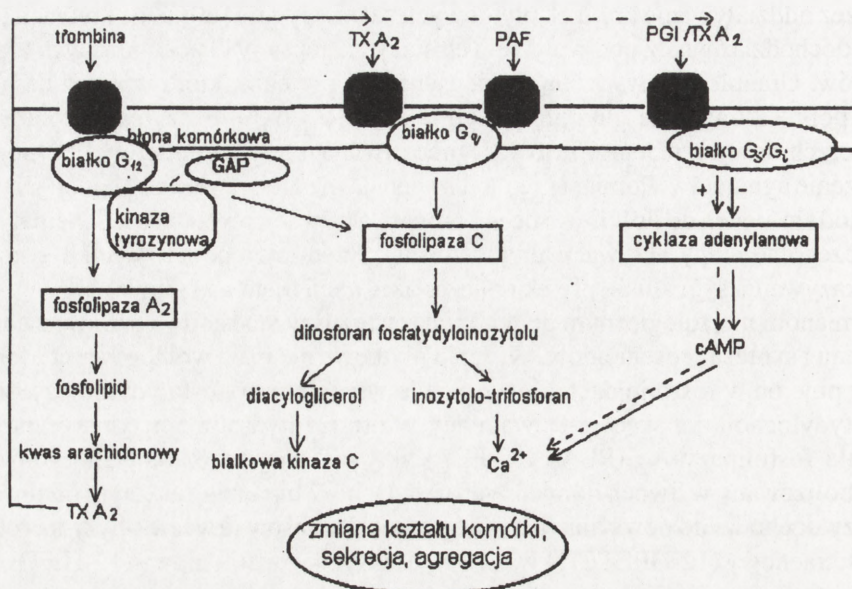
Aktywacja płytek krwi może być wywołana różnymi aktywatorami. Do aktywatorów o istotnym znaczeniu fizjologicznym rozpoznających specyficzne receptory powierzchniowe, inicjujących przy udziale białek G i kinaz tyrozynowych w sposób kaskadowy przesyłanie informacji do komórki należą m.in.: ADP, trombina, PAF, kolagen, tromboksan A₂ i adrenalina. Wywołują one aktywację wielu enzymów w komórce, fosforylację licznych białek, wzrost stężenia jonów Ca²⁺ i reorganizację cytoszkieletu, co w końcowym efekcie doprowadza do fizjologicznej odpowiedzi komórek polegającej na zmianie kształtu, adhezji, sekrecji zmagazynowanych związków i powstawaniu agregatów. Zmianie kształtu komórki ze sferycznej na dyskoidalną, tworzeniu wypustek, przemieszczaniu ziarnistości i uwalnianiu ich zawartości wywołanej działaniem różnych agonistów towarzyszy polimeryzacja aktyny i reorganizacja cytoszkieletu oraz zmiana konformacyjna receptorów α_{IIb}β₃. Po wydostaniu się z płytki uwolnione białka, m.in. fibrynogen, czynnik von Willebranda czy trombospondyna, łączą się z odpowiednimi receptorami powierzchniowymi i odgrywają ważną rolę w procesie adhezji polegającej na przyleganiu krwinek płytkowych do różnych powierzchni “obcych” i tworzeniu agregatów [13, 14, 39]. Uwolniona w procesie sekrecji selektyna P umożliwia udział płytek krwi w procesie zapalnym

poprzez oddziaływanie krwinek płytkowych z leukocytami [60]. Do aktywacji płytek krwi dochodzi również pod wpływem elastazy i katepsyny G pochodzących z granulocytów. Granulocyty wydzielają katepsynę G – proteazę, która wpływa na płytki krwi poprzez trawienie glikoprotein GPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) [76]. Zmiany konformacji powierzchniowych receptorów $\alpha_{IIb}\beta_3$ umożliwiają wiązanie dimerów fibrynogenu i tworzenie agregatów. Pomiar agregacji na podstawie zmian w transmitancji jest jedną z metod służących do ilościowej oceny procesu aktywacji płytek krwi. Schematycznie poszczególne etapy aktywacji płytek zostały przedstawione na rysunku 1, a drogi przekazywania sygnału do płytek podczas aktywacji ujęto na rysunku 2.

Zmianom morfologicznym płytek krwi towarzyszy kaskadowa przemiana arachidonianu i synteza prostanoidów. Krwinki płytkowe nie mają wolnego arachidonianu, występuje on w fosfolipidach błony, przede wszystkim w fosfatydyloinozytolu czy fosfatydylocholinie, skąd jest uwalniany w drodze hydrolizy enzymatycznej przy udziale fosfolipazy A_2 (PLA₂ i C-PLC) aktywowanej przez silnych agonistów i metabolizowany w dwóch odmiennych układach. W układzie zależnym od lipooksygenazy dochodzi do powstania głównie hydroksykwasów (kwas 12-hydroperoksyekoizatetraenowy (12-HPETE) i kwas 12-hydroksyeikoizatetraenowy (12-HETE)) oraz



Rys. 1. Schemat przedstawiający poszczególne fazy aktywacji płytek krwi: zmiana kształtu komórki z wytworzeniem wypustek, uwalnianie zawartości ich ziarnistości (m. in. nukleotydów adeninowych: ATP i ADP, jonów wapnia, potasu, fibrynogenu (Fg), trombospondyny (Tsp), GMP140 i PDGF) oraz powstawanie agregatów płytek. ADP uwolniony z ziarnistości może aktywować krwinki płytkowe, co prowadzi do zmiany powinowactwa receptora integrynowego $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) do cząsteczki fibrynogenu. Fibrynogen łączy ze sobą sąsiadujące płytki tworząc agregaty. GP – glikoproteiny pełnią rolę receptorów dla określonych agonistów



Rys. 2. Schemat przedstawiający przekazywanie sygnałów podczas procesu aktywacji płytek krwi związane ze stymulacją metabolizmu polifosfoinozydów. Proces aktywacji płytek krwi inicjują agonści: trombina, tromboksan A_2 (TXA_2), czynnik aktywujący płytki (PAF) czy prostacyklina (PGI_2) wiążąc się ze specyficznym receptorem. Trombina, TXA_2 czy PAF aktywują fosfolipazę C (PLC), co prowadzi do powstania dwóch wtórnych przekazaźników: diacyloglicerolu i inozytolo-trifosforanu. Diacyloglicerol pobudza białkową kinazę C, a inozytolo-trifosforan powoduje napływ jonów wapnia do cytoplazmy. Powoduje to zmianę kształtu, sekrecję i agregację. W przekazywaniu sygnału do płytki po przyłączeniu trombiny do receptora uczestniczą również białka G (G_{12} i GAP) oraz kinaza tyrozynowa. Trombina aktywuje także fosfolipazę A_2 uwalniając arachidonian, który jest przekształcany do TXA_2 . TXA_2 pełni rolę wtórnego aktywatora. PGI_2 stymuluje cyklazę adenylanową przy udziale białka G i hamuje aktywację; TXA_2 obniża poziom cAMP i stymuluje aktywację

hepoksyliny A_3 – związku, który hamuje agregację płytek krwi [55, 56]. W przemianie zależnej od cyklooksygenazy powstaje oprócz nadtlenków prostaglandyn przede wszystkim tromboksan A_2 , który jest silnym agonistą płytek.

2. BUDOWA I ROLA POWIERZCHNIOWYCH GLIKOPROTEIN

Na powierzchni błony płytkowej występują liczne glikoproteiny pełniące rolę swoistych receptorów dla wielu agonistów stymulujących aktywację płytek krwi [19, 39]. Wśród glikoprotein powierzchniowych istotną rolę w funkcji płytek krwi odgrywają integryny. Są to heterodimery składające się z transbłonowych podjednostek α

i β . Wewnątrzkomórkowa domena podjednostki β zakotwicza heterodimer w komórce przez połączenia z cytoszkieletem. Poznano dotąd co najmniej 15 podjednostek α i 8 podjednostek β tworzących ponad 20 receptorów integrynowych.

Na krwinkach płytkowych stwierdzono obecność 5 różnych receptorów integrynowych: trzy z nich należą do podrodziny β_1 , a dwie do podrodziny β_3 (tzw. rodziny cytoadhezyz) [7, 30, 42]. Integryny płytkowe przedstawiono na rysunku 3.

Najważniejszą, ze względu na dużą ilość na powierzchni płytki krwi oraz funkcje w agregacji tych komórek, jest integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa; CD41/CD61) [7, 12, 34, 77].

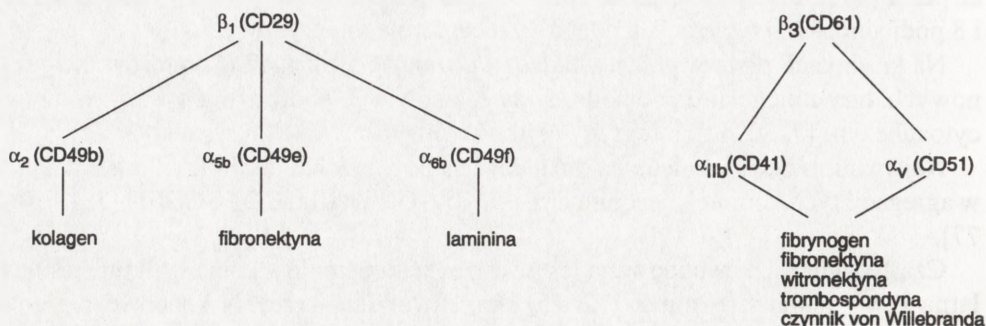
Cząsteczka $\alpha_{IIb}\beta_3$ wbudowana jest w dwuwarstwę lipidową i ma strukturę globularną o wymiarach: 8 nm x (12–15) nm, utworzoną przez N-końcowe regiony skompleksowanych podjednostek α_{IIb} i β_3 . Łańcuch polipeptydowy β_3 (GPIIIa) zawiera 762 reszty aminokwasowe formujące następujące regiony:

- cytoplazmatyczny C-końcowy fragment zbudowany z 41 aminokwasów,
- hydrofobowy fragment transbłonowy,
- centralny fragment obejmujący ok. 25% podjednostek, w którym zlokalizowana jest większość wiązań disiarczkowych,
- N-końcowy region tworzący wielką pętlę dzięki powiązaniu mostkiem disiarczkowym z częścią centralną podjednostki [12].

Podjednostka β_3 syntetyzowana w nadmiarze jest magazynowana, podczas gdy podjednostka α_{IIb} produkowana w formie prekursorowej jest natychmiast przyłączana do β_3 przed proteolitycznym przekształceniem [34]. Podjednostka α_{IIb} utworzona z 1170 aminokwasów powstaje w megakariocytach jako pojedynczy łańcuch, z którego podczas modyfikacji potranslacyjnej wycięty zostaje krótki fragment peptydowy. Tak więc dojrzałą podjednostkę α_{IIb} stanowią dwa łańcuchy związane jednym mostkiem disiarczkowym. Łańcuch ciężki o masie 115 kDa znajduje się w całości na zewnątrz komórki, podczas gdy łańcuch lekki o masie 22 kDa jest zakotwiczony w błonie płytkowej, a jego 21 reszt aminokwasowych zanurzonych jest w cytoplazmie [1, 7, 12, 26, 43, 85].

Podczas aktywacji krwinek płytkowych trombiną, kalagenem czy ADP, nie zmienia się ilość receptorów $\alpha_{IIb}\beta_3$, która wynosi od 40 tys. [52] do 50 tys. [49] kopii na płytkę, ale zmienia się jego stan konformacyjny, poprzez fosforylację białek cytoplazmy i cytoszkieletu. Pozwala to na wiązanie głównie poprzez sekwencję peptydową RGD (Arg-Gly-Asp), fibrynogenu, a także innych białek adhezywnych – trombospondyny, fibronektyny, czynnika von Willebranda oraz witronektyny i umożliwia agregację płytek krwi [12, 24, 26, 31]. Integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$ reaguje również z sekwencją Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) występującą wyłącznie w C-końcu łańcucha γ fibrynogenu [12].

Na powierzchni płytki krwi występuje również w ilości od 800–1800 cząstek integryna $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) (GPIa ~ 160 kDa; IIa~ 130 kDa) [36, 63] pełniąca funkcję receptora dla kolagenu oraz dla trombospondyny [49]. Integryna $\alpha_2\beta_1$ odgrywa ważną



Rys. 3. Receptory integrynowe obecne na powierzchni płytek krwi. W skład heterodimerów wchodzi 3 podjednostki z podrodziny β_1 oraz 2 podjednostki z β_3 , które z podjednostkami α tworzą 5 receptorów integrynowych: $\alpha_2\beta_1$ (receptor kolagenu), $\alpha_{5b}\beta_1$ (receptor fibronektyny), $\alpha_{6b}\beta_1$ (receptor lamininy), $\alpha_{11b}\beta_3$ i $\alpha_V\beta_3$ (receptor fibrynogeny, fibronektyny, witronektyny, trombospondyny i czynnika von Willebranda)

rolę w adhezji płytek [36, 63]. W α_1 łańcuchu kolagenu typu I obecna jest sekwencja Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA) blokująca adhezję krwinek płytkowych. Łańcuch α_1 kolagenu typu III zawiera natomiast sekwencję KPGEPGPK hamującą proces tworzenia agregatów płytkowych [52].

Obok glikoprotein zaliczanych do wielkiej rodziny integryn na płytkach krwi występują glikoproteiny będące receptorami dla różnych białek adhezywnych. Tego rodzaju receptorami są:

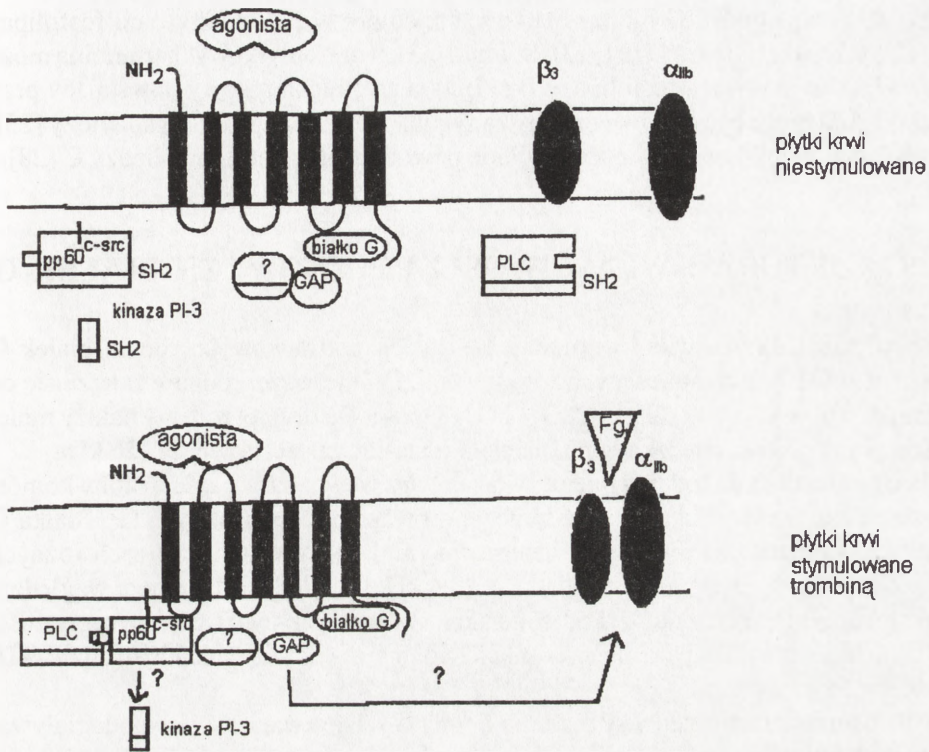
GPIb/IX (CD42b/CD42a) (GPIb α ~ 140 kDa, Ib β ~ 22 kDa, IX ~ 24 kDa) – dla czynnika von Willebranda [19, 22, 58, 63, 65],

GPIV (CD36) – dla kolagenu i trombospondyny [59], GPIV połączona jest z kinazą tyrozynową należącą do rodziny Src [17],

GPVI (62 kDa) – dla kolagenu odgrywając ważną rolę w agregacji płytek krwi [2, 52] oraz

GPV – receptor, którego niedobór jest kojarzony z niedoborem GPIb/IX w chorobie Bernarda-Souliera [10, 19, 42, 67, 78].

Glikoproteiny GPV i GPIb pełnią funkcję receptora dla trombiny [10]. Trombina jest proteazą serynową, która przekształca rozpuszczalny fibrynogen w nierozpuszczalną fibrynę i odgrywa ważną rolę w procesie krzepnięcia krwi oraz jest silnym agonistą płytek krwi (wpływa na serię morfologicznych i biochemicznych zmian, gdzie w końcowym efekcie dochodzi do powstania agregatów płytkowych). Trombina indukuje aktywację płytek krwi m.in. przez unikalny proteolityczny rozpad wiązania pomiędzy Arg41-Ser42 w cząsteczce receptora. Receptor dla trombiny należy do rodziny receptorów składających się z siedmiu transbłonowych domen, gdzie wystę-



Rys. 4. Droga przekazywania sygnału do krwinki płytkowej po stymulacji silnym agonistą. Trombina po przyłączeniu do receptora zawierającego siedem transbłonowych domen, aktywuje fosfolipazę C (PLC) przy udziale kinazy tyrozynowej pp60^{c-src}, białka G₁₂ oraz białka GAP, prowadząc do metabolizowania polifosfoinozytydów, hamowania aktywności cykazy adenylanowej oraz zmian konformacyjnych integryny α_{IIb}β₃ umożliwiając wiązanie fibrynogenu, a tym samym agregację płytek krwi. Kinaza pp60^{c-src} zostaje zakotwiczona w błonie komórkowej i wchodzi w interakcję poprzez domenę SH-2 z PLC oraz prawdopodobnie z kinazą 3-fosfoinozytolu (kinaza PI-3)

pują trzy pętle zewnątrzkomórkowe i trzy wewnątrzkomórkowe (rys. 4). Wewnątrzkomórkowa pętla trzecia w pobliżu C-końca jest w bliskim sąsiedztwie białka G₁₂ [3, 5, 8, 15, 41]. Podobną budowę zaobserwowano w przypadku receptora dla prostacykliny (PGI₂) [75], tromboksanu A₂ (84), czy PAF. Receptor dla TXA₂ występuje w połączeniu z białkami G rodziny G_q lub G₁₁. Przyłączenie trombiny bądź tromboksanu A₂ do swojego receptora prowadzi do zahamowania aktywności cykazy adenylanowej [84] i obniżenie stężenia cAMP w płytce. Na cyklazę adenylanową działa również prostacyklina.

Rola receptorów powierzchniowych ściśle związana jest z rozpoznawaniem specyficznych agonistów i inicjowaniem procesu aktywacji płytek krwi polegającej na adhezji, agregacji oraz sekrecji zmagazynowanych związków. Przyłączenie agonisty do powierzchni receptora inicjuje przesyłanie sygnału do komórki. Towarzyszy temu

także aktywacja białek G i kinaz białkowych, co prowadzi do aktywacji fosfolipaz A_2 , C, a także fosfolipazy D [21, 23]. Stymulacja krwinek płytkowych trombiną może prowadzić do aktywacji fosfolipazy D (PLD), a kwas fosfatydowy powstający przy udziale PLD może być odpowiedzialny za sygnał indukujący proces egzocytozy [23]. Stymulacja płytek krwi z pomocą ADP nie powoduje aktywacji fosfolipazy C [28].

3. STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI PŁYTKOWYCH BIAŁEK G

W płytkach krwi stwierdzono istnienie dwóch podstawowych rodzin białek G wiążących GTP i uczestniczących w aktywacji. Do pierwszej rodziny zalicza się co najmniej 6 białek: G_S , G_i , G_q , G_{12} , G_{13} i G_z [39, 64]. Do drugiej rodziny należy mniej liczna grupa niskocząsteczkowych białek G o masie cząsteczkowej 21–25 kDa.

Białka G należą do rodziny białek związanych z wewnętrzną częścią błony komórkowej, a ich nazwa pochodzi od zdolności do wiązania i hydrolizy GTP. Białka G należące do pierwszej rodziny są heterotrimerami zbudowanymi z trzech różnych podjednostek: α , β i γ . Podjednostki β (36 kDa) i γ (5–8 kDa) pod względem funkcjonalnym tworzą całość. Podjednostka α wykazuje największą heterogenność, ale wydaje się pełnić najważniejszą funkcję, polegającą na wiązaniu i hydrolizie GTP [4, 6, 45, 54].

Mechanizm przenoszenia sygnału do komórki ściśle związany jest z oddziaływaniem podjednostki α z GDP lub GTP. Pozostając w połączeniu z GDP podjednostka ta ma zdolność do przyłączenia się do kompleksu $\beta\gamma$ i interakcji z receptorem, a w przypadku przyłączenia GTP oddysocjowuje ona od pozostałych składników i nabiera powinowactwa do enzymu.

Do tej pory stwierdzono w płytkach krwi istnienie kilku białek G:

Białka G_S mają podjednostkę α_s ; stymulują cyklazę adenylnową.

Białka G_i mogą zawierać podjednostkę α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{01} i α_{02} ; hamują cyklazę adenylnową.

Białka G_q [46] zawierają podjednostkę α_q , α_{11} , α_{15} i α_{16} ; podczas stymulacji krwinek płytkowych podjednostki α należące do tej rodziny białek biorą udział w aktywacji fosfolipazy C, głównie formy β , co prowadzi do powstania wtórnych przekaźników informacji: inozytolo-trifosforanu i diacyloglicerolu.

Białka G_{12} , G_{13} nie są jeszcze dostatecznie poznane [64]. W płytkach krwi stwierdzono obecność znacznej ilości G_{13} . Przypuszcza się, że białka G_{12} i G_{13} mogą być aktywowane przez silnych agonistów płytek krwi: TXA_2 czy trombinę. Nie wyklucza się, że aktywność fosfolipazy A_2 jest regulowana przez podjednostkę α_{12} . W przeciwieństwie do białek G_S i G_i , podjednostki $\alpha - G_q$ i G_{12} są nieczułe na toksyny cholery i krztuśca. Przy udziale białek G wrażliwych na toksynę krztuśca i aktywnej PLA_2 dochodzi do syntezy hepoksyliny A_3 w płytkach [55, 56].

Białka G_z zawierają podjednostkę α_z , która w czasie aktywacji płytek krwi trombiną czy TXA_2 ulega fosforylacji, co sugeruje, że podjednostka ta może być substratem dla białkowej kinazy C [64].

Podjednostki α zakotwiczą się w błonie za pomocą mirystynianu, który tworzy z grupą aminową glicyny na N-końcu wiązanie amidowe. Do zakotwiczenia podjednostki α_s i α_q białka G również może służyć palmitynian. Do podjednostki α białek G obecnych w płytkach może kowalencyjnie być przyłączony arachidonian uwalniany podczas aktywacji płytek [37]. Ten proces może mieć znaczenie w regulowaniu funkcji podjednostki α .

W krwinkach płytkowych stwierdzono obecność również niskocząsteczkowych – „małych” białek G o masie cząsteczkowej 21–25 kDa charakteryzujących się konserwatywną sekwencją. Ze względu na znaczne podobieństwo tych białek do produktu protoonkogenu $p21^{ras}$ białka te określa się jako nadrodzinę białek ras. Do tej grupy należą białka będące produktami genów: ral, rho, rac, rab i rap [45, 81, 89]. W płytkach krwi stwierdzono obecnie co najmniej 15 niskocząsteczkowych białek G. W znacznej ilości występują dwa białka Rap: Rap1B i Rap2B, które wykazują dużą homologię w budowie, ale pewne istotne różnice w działaniu. Kinaza białkowa zależna od cAMP może przeprowadzać fosforylację białka Rap1B, co w następstwie prowadzi do translokacji tego białka z błony komórkowej do cytoplazmy. Białko Rap1B pod wpływem działania trombiny ma zdolność wiązania białka $p21^{ras}$, co umożliwia aktywację fosfolipazy $C\gamma$ [70, 81].

W przeciwieństwie do białka Rap1B, białko Rap2B nie wchodzi w interakcję z białkami $p21^{ras}$. Podczas agregacji płytek krwi ok. 35% białka Rap2B związanych jest z cytoszkieletem płytek krwi. Można przypuszczać, że receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ dla fibrynogeny warunkuje przemieszczenie białka Rap2B do cytoszkieletu [81].

Nie wyklucza się, że białko GAP ($p21^{ras}$) (białko aktywujące GTP-azę) może być połączone z cytoszkieletem błonowym i aktywuje płytkową kinazę tyrozynową pp 60^{c-src} , która uczestniczy w dalszym etapie przekazywania sygnału do komórki [20, 27, 53, 80]. W przekazywaniu informacji w płytkach uczestniczy niskocząsteczkowe białko rho, aktywujące kinazę 3'-fosfatydyloinozytolu (kinaza PI-3) i wpływające na reorganizację cytoszkieletu [89].

4. FOSFORYLACJA BIAŁEK I UDZIAŁ BIAŁKOWYCH KINAZ TYROZYNOWYCH W AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Mechanizm aktywacji płytek krwi związany jest m.in. z procesem fosforylacji i defosforylacji białek, w którym uczestniczą obok białkowej kinazy C, A i G, kinazy lekkiego łańcucha miozyny, białkowe kinazy serynowo-treoninowe, białkowe kinazy tyrozynowe oraz fosfatazy. Odpowiedzi płytek krwi na działanie wielu aktywatorów towarzyszy gwałtowna fosforylacja reszt tyrozynowych w białkach [38, 69, 71, 82],

która występuje w ścisłej korelacji z procesem sekrecji, agregacji i przemianą polifosfoinozydów [61, 68]. Stymulacja płytek krwi wywołana trombiną czy kolagenem powoduje gwałtowną fosforylację reszt tyrozynowych w białkach o m. cz. 50–140 kDa, zidentyfikowanych m.in. jako p21^{ras}, kinaza ogniska adhezji pp125^{FAK} i winkulina [82].

Kinazy tyrozynowe występujące w płytkach krwi należą do klasy kinaz niereceptorowych. Obok cytoplazmatycznej kinazy pp60^{C-src} [24] komórki te zawierają kinazy tyrozynowe będące produktem genu Src, Fyn, Yes, Lyn i Hck: pp54^{lyn}, pp58^{lyn}, pp52^{yes}, pp61^{hck} i pp72^{syk} [13, 14, 61]. Najliczniej reprezentowana jest rodzina białek Src. Stanowi ona 0,2–0,4% całkowitej ilości białka płytkowego. Ostatnie dane [13, 14] donoszą o istnieniu dwóch klas białkowych kinaz tyrozynowych, aktywowanych podczas różnych faz stymulacji. Pierwszą grupę reprezentuje rodzina kinaz Src aktywowana we wczesnej fazie, niezależnej od wiązania fibrynogenu do integraliny $\alpha_{IIb}\beta_3$, natomiast drugą grupę enzymów reprezentuje kinaza pp125^{FAK}, która aktywowana jest w późnej fazie aktywacji zależnej od wiązania fibrynogenu do integraliny $\alpha_{IIb}\beta_3$ [13, 14, 71].

Niereceptorowe kinazy tyrozynowe nie zawierają domeny zewnątrzkomórkowej zdolnej do wiązania ligandu ani domeny transbłonowej. Kinazy te występują w cytoplazmie różnych komórek, w tym także płytek i mogą łączyć się z niektórymi receptorami błonowymi, rozpoznając krótką sekwencję ich domen cytoplazmatycznych. N-końcowy aminokwas kinaz połączony jest wiązaniem amidowym z kwasem mirystynowym, który zwiększa hydrofobowość tego regionu i ułatwia połączenie cząsteczki kinazy z błoną. Wszystkie niereceptorowe białkowe kinazy tyrozynowe zawierają bardzo podobną domenę utworzoną z 250–300 reszt aminokwasowych, odpowiedzialną za aktywność enzymatyczną. Białka kodowane przez geny rodziny Src, które są najlepiej poznanymi kinazami niereceptorowymi płytek, zawierają dwie krótkie domeny o wysokiej homologii nazwane regionami SH-2 i SH-3 (SH ang. *src homology*) oraz domenę katalityczną, która wykazuje aktywność fosfotransferazy (rys. 5) [13, 14]. Regiony SH-2 i SH-3 występują również w niektórych białkach nie wykazujących aktywności kinaz tyrozynowych, np. w fosfolipazie C γ (PLC γ) czy w białku GAP (rys. 4). Region SH-3 występuje z kolei w białkach wiążących aktyne, np. w spektrynie i miozynie. Ponieważ delecja regionu SH-3 eliminuje wiązanie się tych białek z aktyną oraz wywołuje transformację komórek, wydaje się, że region SH-3 odpowiada za połączenie kinaz z białkami cytoszkieletu. Region SH-2 kinazy uczestniczy w represji aktywności kinazowej, a region SH-2 substratu, np. PLC, jest miejscem rozpoznającym fosfotyrozynę w kinazie [13, 14, 50, 66]. Przypuszcza się, że działanie kinazy pp60^{C-src} zależy od domeny SH-2, która wiąże C-końcowy region tej samej cząsteczki enzymu w miejscu występowania ufosforylowanej Tyr-527, co jest charakterystyczne dla kinazy tyrozynowej, jaka występuje w formie nieaktywnej. W kinazie aktywnej defosforylacja Tyr-527 uniemożliwia wytwarzanie wewnętrznych kompleksów; region SH-2 kinazy jest więc uwolniony i może łączyć się z

substratem [13, 14, 50]. W aktywacji kinazy tyrozynowej fyn ważną rolę pełni tyrozyna w pozycji 531 [47].

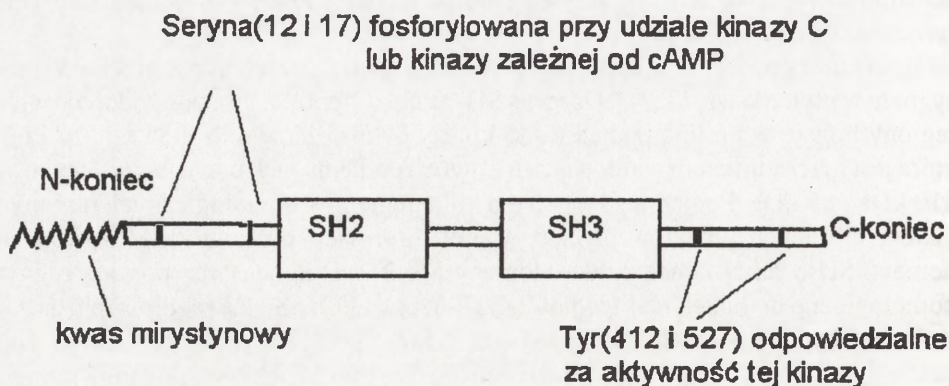
Rola kinazy pp60^{c-src} w aktywacji płytek krwi polega na udziale w przekazywaniu sygnału w płytce krwi [73, 74]. Domena SH-3 kinazy pp60^{c-src} prawdopodobnie wiąże regiony bogate w prolinę podjednostki kinazy 3'-fosfoinozytolu (p85 kinazy PI-3), która jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej 110 kDa i 85 kDa. Podjednostka p85 ma kilka regionów homologicznych do innych białek, biorących udział w przekazywaniu informacji do komórki. Zawiera ona domenę SH-3 na N-końcu i dwie domeny SH-2 w C-końcu oraz posiada regiony homologiczne do białek o aktywności GTP-azowej [79, 88]. Za regulowanie aktywności kinazy PI-3 odpowiedzialne są także kinazy pp60^{c-src} i pp54/58^{lyn}, które mogą przeprowadzać jej fosforylację. Proces ten możliwy jest dzięki powstawaniu kompleksu kinazy tyrozynowej pp60^{c-src} i pp54/58^{lyn} z kinazą 3'-fosfatydyloinozytolu, jaki powstaje podczas działania trombiny na płytki krwi (rys. 4) [33, 79, 87, 89].

Kinaza tyrozynowa pp60^{c-src} bierze udział w aktywacji fosfolipazy C_γ (1 i 2), która powoduje powstanie diacyloglicerolu i inozytolo-trifosforanu [20, 24, 27, 32, 38, 90]. Aktywacja kinaz tyrozynowych kolagenem lub trombiną może prowadzić do aktywacji fosfolipazy A₂ uczestniczącej w uwalnianiu kwasu arachidonowego z fosfolipidów błony płytkowej [38].

W płytkach krwi występuje również kinaza tyrozynowa niereceptorowa pp72^{syk} posiadająca dwie domeny SH-2 w N-końcu. Może ona wchodzić w interakcje z kinazą PI-3, ale mechanizm tego procesu nie jest jeszcze wyjaśniony. Podczas trombinowej aktywacji płytek krwi obserwuje się ponadto przemieszczenie pp72^{syk} z cytoplazmy do błony komórkowej [13, 14, 87]. Aktywacja pp72^{syk} różni się od aktywacji pp60^{c-src} i pp125^{FAK} i jest regulowana bezpośrednio przez wiązanie agonisty do receptora integrynowego [13, 14].

Kinaza tyrozynowa FAK ma budowę unikalną. Zawiera domenę kataliczną otoczoną przez 2 regiony (30–49 kDa) nie wykazujące żadnej homologii ze znanymi białkami. Podczas agregacji FAK jest fosforylowana na Tyr. Białko pp125^{Fak} zawiera domenę kinazową, ale w odróżnieniu od białek kodowanych przez geny src, nie zawiera domen SH-2 i SH-3. Lokalizacja tego białka oraz jego zawartość w płytkach nie jest jeszcze poznana [13, 14], a przyłączenie kolagenu do integryny α₂β₁ powoduje aktywację tej kinazy [38].

Diacyloglicerol odpowiedzialny jest za aktywację białkowej kinazy C (PKC), która fosforyluje m.in. białko cytoszkieletu o masie cząsteczkowej 47 kDa, tzw. plekstrynę. W płytkach krwi występuje kilka typów białkowej kinazy C: α, βI, βII, δ i ζ [44, 83]. Fosforylacja białka (47 kDa) powoduje uwalnianie zawartości różnego typu ziarnistości płytkowych [29, 90]. Dzięki zastosowaniu dwóch inhibitorów PKC: chelerytryny i kalpfastyny stwierdzono zależność pomiędzy defosforylacją białka o masie cząsteczkowej 68 kDa i procesem agregacji [83]. Kinaza C bierze udział również w stymulowaniu fosfolipazy D [11]. ADP uwolniony z ziarnistości gęstych może m.in.



Rys. 5. Schemat budowy płytkowej kinazy tyrozynowej pp60^{c-src}

aktywować płytki krwi. Pochodzące z ziarnistości płytek krwi białka, takie jak: fibrynogen, fibronektyna, czynnik von Willebranda, trombospondyna łączą się z powierzchnią zaktywowanej błony płytkowej i odgrywają ważną rolę w adhezji, czy agregacji krwinek płytkowych.

P-selektyna [60] po wydostaniu się z ziarnistości płytkowych jest prawdopodobnie w bliskim kontakcie z kinazą pp60^{c-src}, która być może odpowiedzialna jest za fosforylację tej selektyny [16].

Podczas stymulacji płytek krwi trombiną obserwuje się fosforylację niskocząsteczkowego białka szoku termicznego – HSP27 i nie wyklucza się roli tego białka w procesie przekazywania sygnałów do płytki [91].

ADP pochodzący z ziarnistości gęstych aktywowanych płytek jest wtórnym agonistą. Ma zdolność modyfikowania powierzchni błony płytkowej, co pozwala cząsteczkom fibrynogenu na przyłączenie się do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) na powierzchni krwinki płytkowej [86]. Cząsteczki fibrynogenu w formie dimerycznego łańcucha łączą ze sobą sąsiadujące płytki krwi tworząc agregaty płytkowe.

Z diacyloglicerolu pod wpływem lipazy PLC γ może być odłączony kwas arachidonowy, który w dalszym etapie jest metabolizowany poprzez nadtlenki prostaglandyn do tromboksanu A₂. Drugi produkt działania fosfolipazy C-inozytolo-trifosforan powoduje uwalnianie jonów Ca²⁺ do cytozolu. Zmiany stężenia jonów Ca²⁺ w cytoplazmie mają istotny wpływ na przebieg fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny – jednego z białek motorycznych komórki.

Szereg białek płytkowych jest substratami dla białkowych kinaz zależnych od cAMP i cGMP. Do grupy tych białek należy m.in.: białko Rap1B, podjednostka β glikoproteiny GPIb, kinaza lekkiego łańcucha miozyny oraz białko VASP (ang. *the vasodilator-stimulated phosphoprotein*) o masie cząsteczkowej 50 kDa. Fosforylacja

białka VASP, głównie seryny w pozycji 157, koreluje z zahamowaniem mobilizowania jonów wapnia w cytozolu oraz procesu aktywacji krwinek płytkowych [35, 57, 62]. PGI_2 i tlenek azotu (NO) uwalniane z komórek śródbłonna indukują proces fosforylacji białka rap1B i fosfoproteiny VASP przy udziale kinaz zależnych od cAMP i cGMP [51, 62].

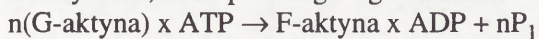
Właściwa regulacja procesów wewnątrzkomórkowych wymaga nie tylko aktywności kinaz. Ważną rolę w płytkach krwi spełniają białkowe fosfatazy (PTPs), które regulują proces fosforylacji na resztach tyrozyny oraz wpływają na kinazy tyrozynowe. W krwinkach płytkowych stwierdzono dwie fosfatazy: PTP1B i SHPTP1. W czasie agregacji płytek krwi indukowanej działaniem różnych agonistów PTP1B występuje w cytozolu, natomiast SH-PTP1 połączona jest z elementami cytoszkieletu [13, 14]. Zahamowania aktywności fosfataz białkowych wanadanem czy molibdenianem towarzyszy wzrost fosforylacji reszt tyrozynowych niektórych białek, stymulowanie procesu sekrecji oraz agregacji [13, 14, 20].

5. REORGANIZACJA CYTOSZKIELETU PŁYTEK KRWI PODCZAS AKTYWACJI

W płytkach krwi występuje miozyna II (konwencjonalna). Jest ona heksamerem zbudowanym z dwóch łańcuchów polipeptydowych, zwanych ciężkimi, o masie ok. 200 kDa, połączonych z parą regulatorowych (20 kDa) i parą istotnych (16–25 kDa) łańcuchów lekkich. Łańcuchy lekkie są niekowalencyjnie związane z globularnymi regionami końca N-łańcuchów ciężkich miozyny tworzącymi główki. Główki miozynowe zawierają domeny motoryczne białka. Na pozostałym odcinku łańcuchy ciężkie mają strukturę α -helikalną i są połączone wiązaniami hydrofobowymi w superhelisę.

Fosforylacja łańcuchów lekkich miozyny spowodowana podwyższonym stężeniem jonów Ca^{2+} w cytozolu powoduje zmianę struktury cząsteczki ze zwiniętej (o stałej sedimentacji 11S) w wyprostowaną (6S). Dzięki temu dochodzi do wytwarzania filamentów (30 cząsteczek miozyny tworzy filament o długości 0,3 μm) oraz oddziaływania z filamentami aktyny, co prowadzi do zmiany kształtu komórki. Do zmiany kształtu krwinki płytkowej dochodzić może także pod wpływem fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny (20 kDa) przy udziale kinazy miozynowej łańcucha lekkiego (40). Proces ten szczególnie widoczny jest podczas stymulacji płytek krwi wywołanej działaniem ADP.

Aktyna, jako jedno z najważniejszych białek kurczliwych komórki w płytkach krwi może występować w dwóch postaciach, jako aktyna globularna (G-aktyna) będąca polipeptydem o masie cząsteczkowej około 43 kDa lub w postaci spolimeryzowanej tworzącej włóknienka, tzw. aktynę fibrylarną (F-aktyna). Każda cząsteczka aktyny G wiąże jeden jon Ca^{2+} i jedną cząsteczkę ATP. W czasie polimeryzacji dochodzi do hydrolizy ATP, która przebiega wg schematu:

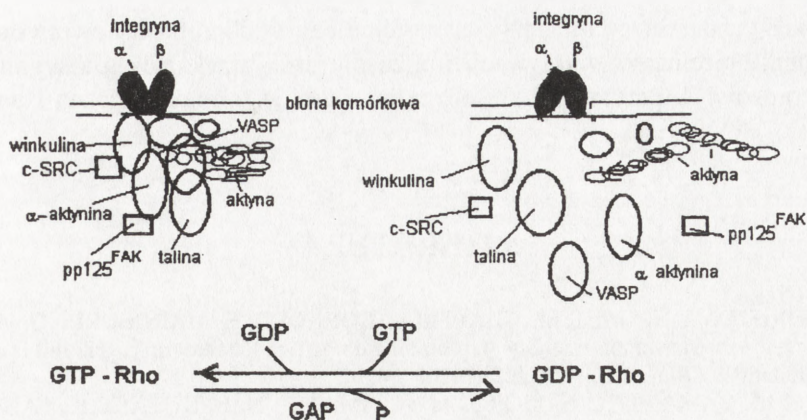


Dzięki temu procesowi aktyna tworzy w cytoplazmie komórkowej mikrofilamenty (7–9,5 nm), które często występują w pęczkach tworzących sieć. Pęczki mikrofilamentów występują wyraźnie tuż pod błoną komórki w stanie spoczynku i są określane jako włókna napięciowe. Te włókna napięciowe są dekorowane podjednostkami S-1 miozyny, co uwidacznia ich charakter podwójnego heliksu.

Regulacja czynności płytkowej aktyny zależy ponadto od wielu wyspecjalizowanych białek. Profilina zapobiega polimeryzacji aktyny G nawet w obecności odpowiednich stężeń magnezu i chlorku potasu. Tworzenie sieci mikrofilamentów aktyny ułatwia filamina, natomiast tropomiozyna ma wpływ na tworzenie pęczków aktywnych włókien napięciowych. α -Aktynina pozwala na przyczepianie mikrofilamentów aktyny do błon podłoża i innych organelli komórkowych oraz prawdopodobnie wchodzi w bezpośrednią interakcję z integrzynami.

Niektóre białka cytoszkieletu płytek krwi, takie jak: talina, winkulina, α -aktynina czy aktyna, występują w tzw. ogniskach adhezji. W cytoszkielecie niestymulowanych płytek krwi winkulina występuje w różnych ilościach: w cytoszkielecie jej ilość wynosi ok. 0,3%, w szkielecie błony komórkowej stanowi 30–35%, a w cytoplazmie 65–70%. Podczas aktywacji płytek krwi trombiną ilość jej w cytoszkielecie znacznie wzrasta i dochodzi do 7% we wczesnej fazie agregacji [9]. W ogniskach adhezji gromadzą się również integryny oraz niektóre kinazy tyrozynowe typu Src i pp125^{FAK}, których aktywność znacznie podwyższa się podczas aktywacji płytek krwi [18]. Molekularne powiązanie białek G należących do nadrodziny ras z aktyną nie jest jeszcze wyjaśnione, jakkolwiek białka te mogą odgrywać ważną rolę w regulowaniu oddziaływań pomiędzy cytoszkieletem a innymi procesami komórkowymi. Sugeruje się również, że “małe” białka G wpływają na elementy cytoszkieletu, głównie na superstrukturę aktyny poprzez metabolizm fosfolipidów błony płytkowej [27]. Uważa się, że układ: talina – winkulina – α -aktynina stanowią łańcuch powiązań białkowych wiodący od receptorów do mikrofilamentów [13, 14, 25, 27].

Kontrola ognisk adhezji odbywa się przy udziale jednego z “małych” białek G – białka Rho, które ma zdolność wiązania GTP. Podczas wiązania GTP następuje stabilizacja ognisk adhezji, natomiast gdy dochodzi do hydrolizy GTP obserwuje się destabilizację prowadzącą m.in. do reorganizacji cytoszkieletu, obejmującego głównie filamenty aktynowe oraz dochodzi do zamykania receptorów integrzynowych. Proces ten jest przedstawiony schematycznie na rysunku 6. Białko Rho, podobnie jak polimeryzująca aktyna, jest regulowane przez białko GAP (o aktywności GTP-azy) [27, 70]. W ogniskach adhezji występują liczne dodatkowe białka (zyksyna, paksylina, radyksyna, ezryna, moezyna), a także białko VASP, które jest w bliskim sąsiedztwie filamentów aktynowych. Fosforylacja tego białka powoduje zahamowanie przyłączania fibrynogenu do integryny $\alpha_{IIb}\beta_3$ [35, 57]. Podobnie jak białko Rap1B, kinaza lekkiego łańcucha miozyny i podjednostka β GPIIb białko VASP jest substratem dla białkowych kinaz zależnych od cAMP i cGMP [35, 72].



Rys. 6. Schemat ilustrujący powstawanie i kontrolę ognisk adhezji przy udziale małych białek G (Rho) (wg Furman i wsp. [27]; zmodyfikowano). Ogniska adhezji są białkowym kompleksem połączonym ze strukturą lipidową łączącą macierz zewnątrzkomórkową z wewnątrzkomórkową siecią aktyny płytkowej. W ogniskach adhezji obecne są podjednostki α i β integryny, talina, winkulina, α -aktylina, filamenty aktyny, dwie kinazy tyrozynowe pp125^{FAK} i c-Src oraz białko VASP. Miejsca te są stabilizowane w obecności białka Rho, połączonego z GTP, natomiast do reorganizacji dochodzi w czasie hydrolizy GTP. Proces regulowany jest przez białka GAP

Z powyższych informacji można przypuszczać, że aktywacja płytek krwi, warunkująca ich udział w zachowaniu prawidłowej hemostazy zależy w dużym stopniu od reorganizacji elementów cytoskieletu, a w szczególności od filamentów aktynowych.

5. ZAKOŃCZENIE

Mechanizm aktywacji płytek krwi jest bardzo złożony. Pomimo różnic w strukturze chemicznej, właściwości i wielkości różnych fizjologicznych stymulatorów aktywacji płytek ekspresja aktywności biologicznej, przejawiająca się adhezją, sekrecją oraz agregacją płytek, jest taka sama. Odpowiedź komórek może być nawet wzmacniana poprzez uwalnianie z płytek wtórnych aktywatorów, takich jak ADP czy TXA₂. Ekspresja aktywności biologicznej płytek uzależniona jest od drogi przekazywania informacji i powstania wtórnych przekaźników. Sposób działania większości wtórnych przekaźników (DAG, cAMP, cGMP, Ca²⁺) polega na aktywowaniu odpowiedniej kinazy fosforylującej białka. Inozytolo-trifosforan wpływa pośrednio na proces mobilizacji jonów wapnia w cytozolu.

W stanach patologicznych może dochodzić do zaburzeń procesu aktywacji krwinek płytkowych. Niedobór płytek lub ich defekt czynnościowy, przejawiający się przede wszystkim zahamowaniem procesu adhezji czy agregacji, warunkuje niektóre typy skaz krwotocznych i prowadzi do zaburzeń hemostazy. Nadwrażliwość płytek na czynniki agregujące i wzmożona aktywacja płytek jest obserwowana w wielu stanach

patologicznych, m.in. w miażdżycy, migrenie czy w chorobach nowotworowych. Wyjaśnienie mechanizmu aktywacji i poznanie dróg przekazywania sygnałów do płytki umożliwi w przyszłości skuteczną interwencję farmakologiczną i właściwą terapię.

LITERATURA

- [1] ANDRIEUX A, RABIET M, CHAPEL A, CONCORD E, MARGEURIE G. A highly conserved sequence of the Arg-Gly-Asp-binding domain of the integrin β_3 subunit is sensitive to stimulation. *J Biol Chem* 1991; **22**: 14202–14207.
- [2] ARAI M, YAMAMOTO N, MOROI M, AKAMATSU N, FUKUTAKE K, TANOUE K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol* 1995; **89**: 124–130.
- [3] BAHAU WF, KUTOK JL, WONG A, POTTER CL, COLLIER BS. Identification of a novel thrombin receptor sequence required for activation-dependent responses. *Blood* 1994; **84**: 4195–4202.
- [4] BARAŃSKA J. Białka G – nagroda Nobla 1994. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 479–488.
- [5] BENKA ML, LEE M, WANG GR, BUCKMAN S, BURLACU A, COLE L., DEPINA A, DIAS P, GRANGER A, GRANT B, HAYWARDLESTER A, KARKI S, MANN S, MARCU O, NUSSENZWIEG A, PIEPENHAGEN P, RAJE M., ROEGIERS F, RYBAK S, SALIC A, SMITHHALL J, WATERS J, YAMAMOTO N, YANOWITZ J, YEOW K, BUSA WB, MENDELSON ME. The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha (q) family. *FEBS Letters* 1995; **363**: 49–52.
- [6] BERRIDGE M J. Inositol triphosphate and calcium signaling. 1993; **361**: 315–325.
- [7] BOSMAN FT. Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochemical J* 1993; **25**: 469–477.
- [8] BOUTON MC, JANDROT-PERRUS M, MOOG S, CAZENAVE JP, GULLIN MC, LANZA F. Trombin interaction with a recombinant N-terminal extracellular domain of the thrombin receptor in an acellular system. *Biochem J* 1995; **305**: 635–641.
- [9] BRUIN T, ASIJEI GM, PRINS A, WOUTER TEN CATE J, STRUK A. Subcellular distribution and phosphorylation of vinculin isoforms in human blood platelets. *Thromb Haemost* 1991; **65**: 206–211.
- [10] BYKOWSKA K. Receptory płytek krwi dla adhezywnych białek i ich znaczenie kliniczne. *Post Hig Dośw* 1993; **47**: 33–54.
- [11] CHIANG T M. Activation of phospholipase D in human platelets by collagen and thrombin and its relationship to platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1224**: 147–155.
- [12] CIERNIEWSKI C S. Budowa i funkcja receptorów integrynowych na przykładzie płytkowego receptora fibrynogenu. *Post Biochem* 1994; **40**: 45–54.
- [13] CLARK EA, SHATTIL SJ, BRUGGE JS. Regulation of protein tyrosine kinases in platelets. *TIBS* 1994; **19**: 464–469.
- [14] CLARK EA, SHATTIL SJ, GINSBERG MH, BOLEN J, BRUGGE JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72^{syk} by platelet agonists and the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem* 1994; **269**: 28859–28864.
- [15] CONNOLLY TM, CONDRA C, FENG DM, COOK JJ, STRAINERI MT, REILLY CF, NUTT RF, GOULD RJ. Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 627–633.

- [16] CROVELLO CS, FURIE BC, FURIE B. Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14590–14593.
- [17] DANIEL IL, DANGELMAIER R, SMITH JB. Collagen induces normal signal transduction in platelets deficient in CD36 (platelet glycoprotein IV). *Thromb Haemost* 1994; **71**: 353–356.
- [18] DASH D, AEPFELBACHER M, SIESS W. The association of pp125(FAK), pp60(SRC), CDC42Hs and Rap1B with the cytoskeleton of aggregated platelets is a reversible process regulated by calcium. *FEBS Lett* 1995; **363**: 232–234.
- [19] De GROOT PG, SIXMA JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; **75**: 308–312.
- [20] DHAR A, SHUKLA SD. Tyrosine kinases in platelet signalling. *Br J Haematol* 1993; **84**: 1–7.
- [21] DHAR A, SHUKLA SD. Electrotransfection of pp60^{v-src} monoclonal antibody inhibits activation of phospholipase C in platelets. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9123–9127.
- [22] DONG J, LI CQ, LOPEZ JA. Tyrosin sulfation of the glycoprotein Ib-IX complex: identification of sulfated residues and effect on ligand binding. *Biochem* 1994; **33**: 13946–13953.
- [23] FAN XT, SHERWOOD JL, HASLAM R J. Stimulation of phospholipase D in rabbit platelet membranes by nucleoside triphosphates and by phosphocreatine: roles of membrane-bound GDP, nucleoside diphosphate kinase and creatine kinase. *Biochem J* 1994; **299**: 701–709.
- [24] FINDIK D, REUTER C, PRESEK P. Platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa are substrates of purified pp60^{c-src} protein tyrosine kinase. *FEBS Lett* 1990; **262**: 1–4.
- [25] FOX JEB, LIPFERT L, CLARK EA, REYNOLDS CC, AUSTIN CD, BRUGGE JS. On the role of platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. *J Biol Chem* 1993; **268**: 25973–25984.
- [26] FRACHET P, DUPERAY A, DELACHANEL E, MARGUERIE G. Role of the transmembrane and cytoplasmic domains in the assembly and surface exposure of the platelet integrin GPIIb/IIIa. *Biochem* 1991; **31**: 2408–2415.
- [27] FURMAN MI, GARDNER TM, GOLDSCHMIDT-CLERMONT PJ. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 229–232.
- [28] GACHET CH, CAZENAVE JP, OHLMANN P, HILF G, WIELAND T, JAKOBS KH. ADP receptor-induced activation of guanine-nucleotide-binding proteins in human platelet membranes. *Eur J Biochem* 1992; **207**: 259–263.
- [29] GERRARD JM, NENICOL A, SAXENA SP. Protein kinase C, membrane fusion and platelet granule secretion. *Biochem Soc Trans* 1993; **21**: 289–293.
- [30] GINSBERG MH, XIAOPING D, O'TOOLE T, LOFTUS JC, PLOW EF. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 87–93.
- [31] GINSBERG MH, LOFTUS JC, PLOW EF. Common and ligand-specific integrin recognition mechanisms. *Chem Immunol* 1991; **50**: 75–88.
- [32] GRONDIN P, PLANTAVID M, SULTAN C, BRETON M, MAUCO G, CHAP H. Interaction of pp60^{c-src}, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1991; **266**: 15705–15709.
- [33] GUINEBAULT C, PARYRASTRE B, RACAUDSULTAN C, MAZARGUIL H, BRETON M, MAUCO G, PLANTAVID M, CHAP H. Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involved specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1995; **129**: 831–842.
- [34] GULINO D, MARTINEZ P, DELACHANEL E, CONCORDE E, DUPERRAY A, ALEMANY M, MARGUERIE G. Expression and purification of soluble functional form of the platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. *Eur J Biochem* 1995; **227**: 108–115.
- [35] HAFFNER C, JARCHAU T, REINHARD M, HOPPE J, LOHMANN SM, WALTER U. Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *EMBO* 1995; **14**: 19–27.
- [36] HAIMOVICH B, LIPFERT L, BRUGGE JS, SHATTIL J. Tyrosine phosphorylation and cytoskeleton reorganization in platelets are triggered by interaction of integrin receptors with their immobilized ligands. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15868–15877.

- [37] HALLAK H, MUSZBEK L, LAPOSATA M, BELMOTE E, BRASS LF, MANNING DR. Covalent binding of arachidonate to G protein α subunits of human platelets. *J Biol Chem* 1994; **268**: 4713–4716.
- [38] HARGREAVES P G, LICKING EF, SARGEANT P, SAGE SO, BARNES MJ, FARNDAL R W. The tyrosine kinase inhibitors, genistein and methyl 2,5-dihydroxycinnamate, inhibit the release of (3 H) arachidonate by thrombin or collagen. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 634–642.
- [39] HASLAM R J. Signal transduction in platelet activation. *Thromb Haemost* 1987; **8**: 147–174.
- [40] HASHIMOTO Y, SASAKI H, TOGO M, TSYKAMOTO K, HORIE Y, FUKATA H, WATANABE T, KUROKAWA K. Roles of myosin light-chain kinase in platelet shape change and aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1223**: 163–169.
- [41] HAYES KL, LEONG L, HENRIKSEN R A, BOURCHARD BA, OUELLETTE L. α -Thrombin-induced human platelet activation results solely from formation of a specific enzyme-substrate complex. *J Biol Chem* 1994; **269**: 28606–28612.
- [42] HOON KV, DEAN G, TANG MD, CHEN YQ. Platelets and cancer metastasis: more than an epiphenomenon. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1992; **4**: 392–415.
- [43] HUMPHRIES M J. Peptide recognition motifs involved in the binding of integrins to their ligands. *Kidney International* 1992; **41**: 645–649.
- [44] KHAN WA, BLOBE GC, RICHARDS AL, HANNUN YA. Identification, partial purification, and characterization of a novel phospholipid-dependent and fatty acid-activated protein kinase from human platelets. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9729–9735.
- [45] KLINZ F J. GTP-blot analysis of small GTP-binding proteins. The C-terminus is involved in renaturation of blotted proteins. *Eur J Biochem* 1994; **225**: 99–105.
- [46] KNEZEVIC I, BORG C, Le BRETON GC. Identification of G_q as one of the G-proteins which copurify with human platelet thromboxane A_2 /prostaglandin H_2 receptors. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26011–26017.
- [47] KOEGL M, KYPTA R M, BERGMAN M, ALITALO K, COURTNEIDGE SA. Rapid and efficient purification of Src homology 2 domain-containing proteins: Fyn, Csk and phosphatidylinositol 3-kinase p85. *Biochem J* 1994; **302**: 737–744.
- [48] KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E, TAMOWSKI R, GRABOWSKA-BOCHENEK R. Trombocyty a miażdżycyca. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 43–52.
- [49] KOWALSKA MA, TUSZYŃSKI GP. Interaction of thrombospondin with platelet glycoproteins GPIa-IIa and GPIIb-IIIa. *Biochem J* 1993; **295**: 725–730.
- [50] KRALISZ U. Funkcja białkowych kinaz tyrozynowych podczas aktywacji płytek krwi. *Post Biochem* 1994; **40**: 40–44.
- [51] KRUSE HJ, GRUNBERG B, SIESS W, WEBER PC. Formation of biologically active autacoids is regulated by calcium influx in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1994; **14**: 1821–1828.
- [52] KUNICKI TJ, ORCHEKOWSKI R, ANNIS D, HONDA Y. Variability of integrin $\alpha_2\beta_1$ activity on human platelets. *Blood* 1993; **82**: 2693–2703.
- [53] LIEBENHOFF U, BROCKMEIER D, PRESEK P. Substrate affinity of the protein tyrosine kinase pp60^{c-src} is increased on thrombin stimulation of human platelets. *Biochem J* 1993; **295**: 41–48.
- [54] LINDER ME, GILMAN AG, Białka G. *Świat Nauki* 1992; **IX**: 42–50.
- [55] MARGALIT A, LIVNE AA, FUNDER J, GRANOT Y. Initiation of RVD response in human platelets: mechanical-biochemical transduction involves pertussis-toxin-sensitive G protein and phospholipase A_2 . *J Membrane Biol* 1993; **136**: 303–311.
- [56] MARGALIT A, GRANOT Y. Endogenous heparin A_3 , produced under short duration on high shear-stress, inhibits thrombin-induced aggregation in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1190**: 173–176.

- [57] MEINECKE M, GEIGER J, BUTT E, SANDBERG M, JAHNSEN T, CHAKROBORTY T, WALTER U, JARCHAU T, LOHMANN SM. Human cyclic GMP-dependent protein kinase I β overexpression increases phosphorylation of an endogenous focal contact-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein without altering the thrombin-evoked calcium response. *Mol Pharmacol* 1994; **46**: 283–290.
- [58] MARCHESI P, MURATA M, MAZZUCATO M, PRADELLA P, DEMARCO L, WARE J, RUGGERI ZM. Identification of three tyrosine residues of glycoprotein Ib alpha with distinct roles in von Willebrand factor and alpha-thrombin binding. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9571–9578.
- [59] MICHELSON AD, WENCEL-DRAKE JD, KESTIN AS, BARNARD MR. Platelet activation results in a redistribution of glycoprotein IV (CD36). *Arterioscler Thromb* 1994; **14**: 1193–1201.
- [60] MODDERMAN PW, Von Dem BORNE AEGK, SONNENBERG. Tyrosine phosphorylation of P-selectin in intact platelets and in a disulphide-linked complex with immunoprecipitated pp60^{c-src}. *Biochem J* 1994; **299**: 613–621.
- [61] MURPHY CT, KELLIE S, WESTWICK J. Tyrosine-kinase activity in rabbit platelets stimulated with platelet-activating factor. *Eur J Biochem* 1993; **216**: 639–651.
- [62] NOLTE C, EIGENTHALER M, HORSTRUP K, HONONG-LIEDL P, WALTER U. Synergistic phosphorylation of the focal adhesion-associated vasodilator-stimulated phosphoprotein in intact human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating platelet inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1994; **48**: 1569–1575.
- [63] NURDEN P, BIHOUR C, COMBRIE R, GRALNICK H, NURDEN AT. Glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) and glycoprotein Ib-IX complexes are processed independently during thrombin-induced platelet activation. *J Lab Clin Med* 1994; **124**: 579–588.
- [64] OFFERMANS S, SCHULTZ G. What are the functions of the pertussis toxininsensitive G proteins G₁₂, G₁₃ and G_z? *Mol Cell Endocrinol* 1994; **100**: 71–74.
- [65] OZAKI Y, SATOH K, YATOMI Y, MIURA S, FUJIMURA Y, KUME S. Protein tyrosine phosphorylation in human platelets induced by interaction between glycoprotein Ib and Willebrand factor. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1243**: 482–488.
- [66] PAWSON T, SCHLESSINGE J. SH2 and SH3 domains. *Current Biology* 1993; **3**: 434–442.
- [67] PEERSCHKE EIB. Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Clin Pathol* 1992; **98**: 455–463.
- [68] POLANOWSKA-GRABOWSKA R, GEANACOPULOS M, GEAR ARL. Platelet adhesion to collagen via the $\alpha_2\beta_1$ integrin under arterial flow conditions causes rapid tyrosine phosphorylation of pp125^{fak}. *Biochem J* 1993; **296**: 543–547.
- [69] PUMIGLIA KM, FEINSTEIN MB. Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce tyrosine phosphorylation and tyrosine kinases in the platelet cytoskeleton. *Biochem J* 1993; **294**: 253–260.
- [70] RAMASCHI G, BALDUINI C, TORTI M, SINIGAGLIA F. Effect of cAMP on the associated of small GTP-binding proteins with the cytoskeleton of human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1199**: 20–26.
- [71] RAZDAN K, HELLUMS JD, KROLL MH. Shear-stress-induced von Willebrand factor to platelets causes the activation of tyrosine kinase (s). *Biochem J* 1994; **302**: 681–686.
- [72] REINHARD M, GIEHL K, ABEL K, HAFFNER C, JARCHAU T, HOPPE V, JOCKUSCH BM, WALTER U. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* 1995; **14**: 1583–1589.
- [73] REUTER C, FINDIK D, PRESEK P. Characterization of purified pp60^{c-src} protein tyrosine kinase from human platelets. *Eur J Biochem* 1990; **190**: 343–350.
- [74] SARGEANT P, FARNDALES RW, SAGE SO. ADP- and thapsigargin-evoked Ca²⁺ entry and protein-tyrosine phosphorylation are inhibited by the tyrosine kinase inhibitors genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate in fura-2-loaded human platelets. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18151–18156.

- [75] SCHNEIDER MR, TANG DG, SCHIRNER M, HONN KV. Prostacyclin and analogues: antimetastatic effects and mechanisms of actin. *Cancer and Metastasis Reviews* 1994; **13**: 349–364.
- [76] SELAK MA. Cathepsin G and thrombin: evidence for two different platelet receptors. *Biochem J* 1994; **297**: 269–275.
- [77] SIEDLAR M. Integryny. *Immunol Pol* 1992; **XVII**: 3–18.
- [78] SMYTH SS, JONECKIS CC, PARISE LV. Regular of vascular integrins. *Blood* 1993; **11**: 2827–2843.
- [79] THOMSON PA, JAMES SR, CASEY PJ, DOWNES CP. A G-protein $\beta\gamma$ -subunit-responsive phosphoinositide 3-kinase activity in human platelet cytosol. *J Biol Chem* 1994; **269**: 16525–16528.
- [80] TOMASKA L, RESNICK R J. Involvement of a phosphotyrosine protein phosphatase in the suppression of platelet-derived growth factor receptor autophosphorylation in ras-transformed cells. *Biochem J* 1993; **293**: 215–221.
- [81] TORTI M, RAMASCHI G, SINIGAGLIA F, LAPETINA EG, BALDUINI C. Glikoprotein IIb-IIIa and the translocation of Rap2B to the platelet cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 4239–4243.
- [82] TORTI M, RAMASCHI G, SINIGAGLIA F, BALDUNI C. Dual mechanism of protein-tyrosine phosphorylation in concanavalin A-stimulated platelets. *J Cell Biochem* 1995; **57**: 30–38.
- [83] TURINI ME, GAUDETTE DC, HOLUB BJ, KIRKLAND JB. Corelation between platelet aggregation and dephosphorylation of a 68 kDa protein revealed through the use of putative PKC inhibitors. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 648–653.
- [84] USHIKUBI F, NAKAMURA KI, NARUMIJA S. Functional reconstitution of platelet thromboxane A₂ receptors with G_q and G₁₂ in phospholipid vesicles. *Mol Pharmacol* 1994; **46**: 808–816.
- [85] WACHOWICZ B, OLAS B. Rola płytek krwi w metastazie (w). Białka komórek prawidłowych i patologicznych (red.) Z. Kilańska, W. Krajewska, A. Lipińska. ŁTN 1994; 199–209.
- [86] VICKERS JD. ADP-stimulation fibrinogen binding is necessary for some of the inositol phospholipid changes found in ADP-stimulated platelets. *Eur J Biochem* 1993; **216**: 231–237.
- [87] YANAGI S, SADA K, TOHYAMA Y, TSUBOKOWA M, NAGAI K, YONEZAWA K, YAMAMURA H. Translocation, activation and association of protein-tyrosine kinase (p72^{syk}) with phosphatidylinositol 3-kinase are early events during platelet activation. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 329–333.
- [88] ZHANG J, FRY MJ, WATERFIELD MD, JAKEN S, LIAO L, FOX JEB, RITTENHOUSE SE. Activation phosphoinositide 3-kinase associated with membrane skeleton in thrombin-exposed platelets. *J Biol Chem* 1992; **269**: 4686–4692.
- [89] ZHANG J, KING WG, DILLON S, HALL A, FEIG L, RITTENHOUSE SE. Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22251–22254.
- [90] ZHOU G, WOOTEN MW, COLEMAN ES. Regulation of atypical ξ -protein kinase C in cellular signaling. *Exp Cell Res* 1994; **214**: 1–11.
- [91] ZHU Y, TASSI L, LANE W, MENDELSON ME. Specific binding of the transglutaminase, platelet factor XIII, to HSP27. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22379–22384.

Otrzymano: 13.06.1995 r.

Ptzyjęto: 15.07.1995 r.

Adres autora: Łódź, ul. Banacha 12/16

PRZEDWCZESNA TERMINACJA TRANSKRYPCJI GENÓW KLASY II I JEJ ZAPOBIEGANIE

PREMATURE TERMINATION OF THE CLASS II GENES TRANSCRIPTION AND ITS PREVENTION

Piotr DULLIN, Zenon SCHNEIDER, Witold WALERYCH

Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

Streszczenie. Jednym z etapów transkrypcji jest elongacja łańcucha RNA. W czasie jej trwania występuje zjawisko pauzowania (zatrzymania polimerazy w określonym miejscu matrycy) prowadzące niekiedy do przedwczesnej terminacji. Zjawisko to może wystąpić blisko sekwencji TATA i wtedy mamy do czynienia z pauzowaniem okołopromotorowym. Transkrypcja może zostać zatrzymana także w innych miejscach, w których występuje zawada przestrzenna uniemożliwiająca kontuację syntezy RNA. Przejście takiej przeszkody ułatwia odpowiedni czynnik białkowy – TF IIS. Polimeraza II w kompleksie z tym faktorem wykazuje aktywność nukleolityczną. Pauzowanie okołopromotorowe i przedwczesne terminacja związana jest albo z brakiem odpowiednich czynników inicjacyjnych (jak np. HSF w przypadku genów szoku cieplnego – HSP 70), albo z wystąpieniem odpowiedniej struktury II-rzędowej produktu transkrypcji (sekwencja TAR podczas transkrypcji genu LTR wirusa HIV). Wydaje się, że pauzowanie okołopromotorowe związane jest z genami odpowiedzialnymi za szybką reakcję organizmu na czynniki środowiskowe. Natomiast występowanie tego zjawiska w innych miejscach spowodowane jest niekorzystną konformacją matrycy lub obecnością na niej białek uniemożliwiających kontynuację transkrypcji.

Słowa kluczowe: transkrypcja, geny klasy II, pauzowanie, przedwczesna terminacja.

Summary. One of the stages of transcription is the elongation of the RNA chain. Sometimes, in the course of its duration, a phenomenon of pausing may occur leading, from time to time, to the premature termination. This phenomenon may take place close to the TATA sequence and then pausing in the neighbourhood of promotor occurs. Transcription can also be interrupted in other places in which some kind of obstacles occurs making the continuation of the RNA synthesis impossible. Such hindrances may be by-passed with the help of an appropriate protein factor – TF IIS. Polymerase II, in the complex with this factor, exhibits nucleolytic activity. Pausing in the vicinity of the promotor and premature termination are connected either with the lack of proper initiation factors (for example, HSF in the case of thermal shock genes – HSP 70) or with the occurrence of an appropriate second order structure of the transcription product (TAR sequence during the transcription of the LTR virus gene). It appears that

pausing in the vicinity of the promotor is connected with genes responsible for a rapid response of the organism to environmental factors. The occurrence of the phenomenon in other places is caused either by unfavourable matrix conformation or by the presence on DNA of proteins rendering the continuation of the transcription impossible.

Key words: transcription, class II genes, pausing, premature termination.

WSTĘP

Pierwszym etapem ekspresji genu u organizmów eukariotycznych jest synteza RNA na matrycy DNA, czyli transkrypcja. Związany jest z nią wybór sekwencji DNA, która będzie przepisana na mRNA, co decyduje o rodzaju białka mogącego powstać w procesie translacji i w konsekwencji o ujawnieniu się określonych cech fenotypowych (regulacja pozytywna). Na tym etapie następuje również negatywna regulacja ekspresji genu, czyli zaprzestanie transkrypcji pewnych sekwencji DNA. Inną możliwością negatywnej regulacji jest brak transkrypcji określonych genów mimo ich występowania w genomie. Pierwsze dwie możliwości związane są z utworzeniem lub rozpadem określonych trzeciorzędowych kompleksów transkrypcyjnych zawierających oprócz kwasów nukleinowych odpowiednie czynniki białkowe. O transkrypcji danej sekwencji DNA decydują właściwie dwa miejsca – miejsce (odcinek DNA) inicjacji i miejsce (odcinek DNA) terminacji. Za inicjację transkrypcji uważa się szereg powiązanych ze sobą przemian prowadzących do syntezy pierwszego wiązania fosfodiestrowego pomiędzy pierwszym a drugim nukleotydem łańcucha RNA. Natomiast terminacja transkrypcji u eukariontów jest trudniejsza do jednoznacznego zdefiniowania. Funkcjonalnie za terminację transkrypcji można uznać odłączenie się nowosyntetyzowanego RNA od kompleksu transkrypcyjnego. Elongacja jest to synteza kolejnych wiązań fosfodiestrowych pomiędzy nukleotydami, czyli wydłużanie łańcucha RNA. Enzymem katalizującym tę reakcję jest polimeraza RNA zależna od DNA (E. C. 2.7.7.6).

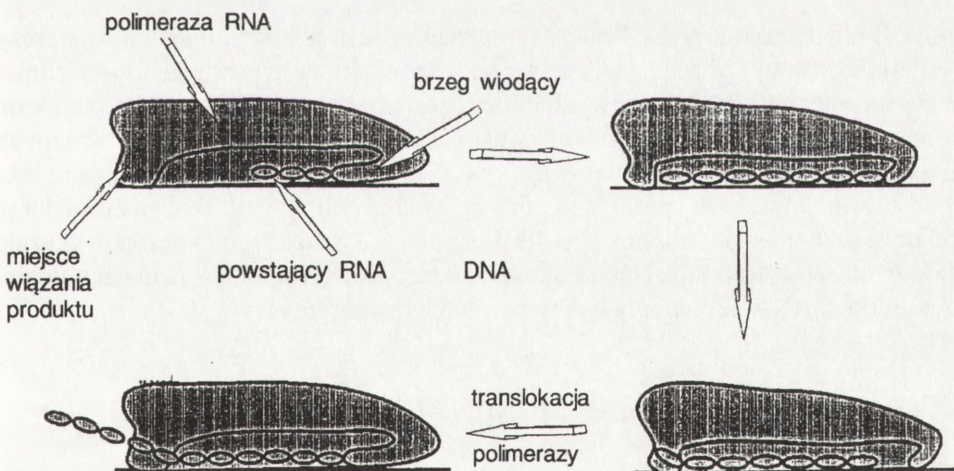
Podział procesu transkrypcji na te trzy stadia jest w zasadzie sztuczny dlatego, że inicjacja transkrypcji i jej przebieg w wielu przypadkach bardzo silnie wpływa na elongację [36, 43, 48, 66, 86]. Natomiast terminacja transkrypcji jest często rozpatrywana z punktu widzenia kinetycznego łącznie z elongacją [29]. Jeżeli stosunek stałej kinetycznej dobudowy następnego nukleotydu, a więc elongacji (K_{forward}), jest mniejszy od stałej dysocjacji RNA od kompleksu transkrypcyjnego (K_{release}), to następuje terminacja. Jeżeli natomiast $K_{\text{forward}} \gg K_{\text{release}}$, to mamy do czynienia z elongacją. Kompleks elongacyjny u eukariontów musi być bardzo trwały, ponieważ istnieją geny, których pierwotny transkrypt ma długość 10×10^5 zasad. Czas przepisywania takiego genu wynosi ponad 30 min. Jednocześnie elongacja musi zostać zakończona w odpowiednim miejscu, tak żeby transkrypcji nie podlegały sąsiednie geny. Wynika z tego, że terminacja transkrypcji musi być, podobnie jak inicjacja, precyzyjnie kontrolowanym elementem ekspresji genu.

PERYSTALTYCZNY MODEL ELONGACJI

Jednym z ostatnich modeli elongacji transkrypcji jest tzw. *“inchworm model”* – perystaltyczny model elongacji. Opiera się on na dwóch obserwacjach:

- (i) długość chronionego przez polimerazę RNA przed trawieniem RNazą odcinka nowopowstałego transkryptu waha się w granicach 2–12 nukleotydów [35, 74, 75],
- (ii) skracanie nowopowstałego RNA o kilka nukleotydów przez polimerazę RNA nie wymaga jej translokacji na matrycowym DNA [28].

Model ten (rys. 1) zakłada przynajmniej dwa miejsca wiązania RNA przez enzym [10]. Jedno wiodące produkt *“wypełniające się”* podczas każdego cyklu wydłużania łańcucha RNA (ok. 10 nukleotydów). Drugie miejsce wiążące powstały produkt. Między tymi miejscami występuje hybryd DNA-RNA. Translokacja polimerazy następuje wtedy, gdy miejsce wiodące jest wypełnione nowopowstałym RNA. Przemieszczenie polimerazy na DNA uwalnia to miejsce, co umożliwi następną cykl wydłużania. Stabilność kompleksu elongacyjnego związana jest z niejonowymi bardzo specyficznymi oddziaływaniami RNA z miejscem wiązania produktu. Model ten wyjaśnia okresowość translokacji polimerazy na matrycowym DNA. Niepełne dane doświadczalne sugerują, że brzeg wiodący polimerazy wydaje się nieruchomy w czasie każdego cyklu [45]. Tylna część kompleksu wiążąca RNA stopniowo się



Rys. 1. Model perystaltyczny transkrypcji. Na rysunku zaznaczone są: brzeg wiodący razem z nowopowstałym RNA, miejsce wiązania produktu z tyłu polimerazy oraz syntetyzowany łańcuch RNA połączony z brzegiem wiodącym i po odpowiednim wydłużeniu z miejscem wiązania produktu w polimerazie. Zaznaczona jest także translokacja polimerazy na DNA i związana z tym zmiana liczby zasad RNA znajdujących się w hybrydzie z DNA

przesuwa. Badania grupy Goldfarba [8, 50] dotyczące centrum katalitycznego polimerazy RNA są w zasadzie zgodne z ideą cyklicznej translokacji tego miejsca.

Perystaltyczny model elongacji tłumaczy również zjawisko tzw. poronionej (ang. *abortive*) inicjacji, polegające na transkrypcji do 10 nukleotydów, zanim polimeraza rozpocznie normalną elongację [16, 27, 50]. W początkowej fazie transkrypcji słabe oddziaływania RNA wyłącznie z miejscem wiodącym mogą prowadzić do jego dysocjacji od kompleksu transkrypcyjnego. Zmusza to polimerazę RNA do ponownej inicjacji i elongacji. Ten niestabilny kompleks przechodzi w trwały, gdy transkrypt zaczyna oddziaływać również z miejscem produktu na enzymie. Powstanie trwałego kompleksu elongacyjnego może być też tłumaczone osiągnięciem odpowiednich wymiarów przez jednoniciowy fragment DNA czy też utraceniem bezpośredniego kontaktu polimerazy z promotorem [45, 97].

Perystaltyczny model elongacji powstał na podstawie danych eksperymentalnych związanych z terminacją transkrypcji i niezgodnych z modelem termodynamicznym Yagera i von Hippela [97]. Model ten zakłada, że trwały kompleks elongacyjny może powstać tylko wtedy, gdy występuje 12 pz hybryd matrycowego DNA z RNA. Wystąpienie krótkich odcinków palindromowych i zaraz po nich odcinków bogatych w A na matrycowym łańcuchu DNA prowadzi wg tego modelu do terminacji transkrypcji. Sekwencja palindromowa po przepisaniu na RNA tworzy pętlę "wyrwijącą" tworzące ją nukleotydy z hybrydu DNA:RNA. Zmniejszenie się wielkości hybrydu prowadzi do zmniejszenia trwałości kompleksu elongacyjnego i w konsekwencji do pauzowania polimerazy lub terminacji (odłączenia RNA od kompleksu transkrypcyjnego). Doświadczenia grupy Rica [74] wykazały, że do trwałej elongacji wystarczy 2–3-nukleotydowy hybryd DNA-RNA pod warunkiem występowania odpowiedniego stężenia substratów i właściwych oddziaływań polimerazy RNA z transkryptem. Jednak różnice w stabilności trzeciorzędowego kompleksu elongacyjnego w różnych miejscach matrycy pozostają niewyjaśnione. Nie jest wykluczone, że różnice te leżą u podstaw przedwczesnej terminacji lub pauzowania polimerazy. Te dwa zjawiska są dość powszechne, skoro analiza populacji pre-RNA u chińskiego chomika wykazała [65], że ok. 40% RNA ma tylko kilkaset nukleotydów. Sugeruje to znaczny udział zbytu krótkich RNA, aby mogły być to normalne transkrypty.

PRZEDWCZESNA TERMINACJA TRANSKRYPCJI

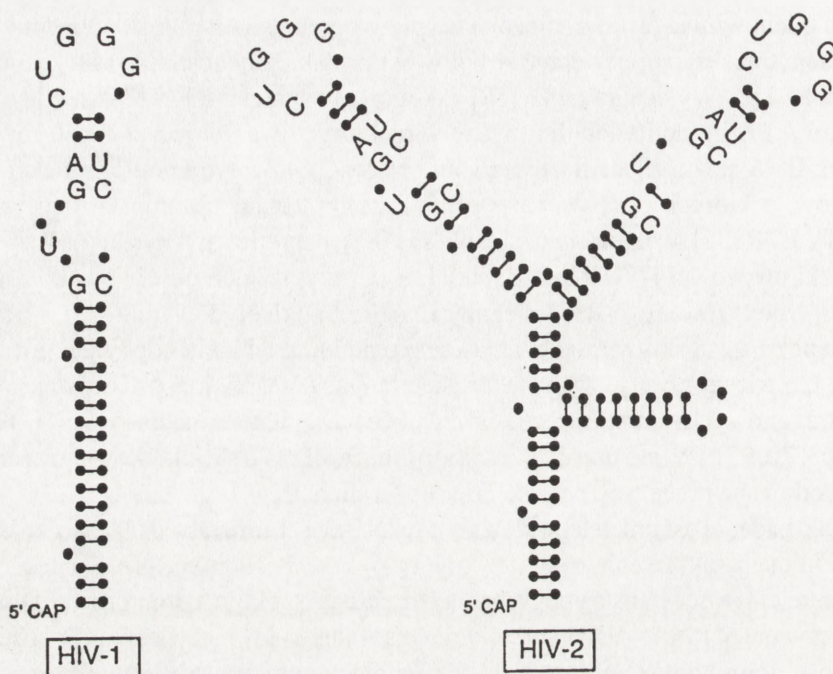
Przedwczesna terminacja transkrypcji jest jednym z bardzo istotnych elementów procesu regulacji aktywności policistronowych genów prokariotycznych, zwanego atenuacją. Synteza ustawionych kolejno genów może być bezpośrednio regulowana poprzez zróżnicowane wykorzystanie odpowiednich miejsc terminacji. Wiele eukariotycznych genów, mimo że są one monocistronowe, może produkować różne białka poprzez zróżnicowanie dojrzewania albo poprzez alternatywne użycie sygnałów poliadenylacji. Ziff [96] wykazał, że produkcja mRNA we wczesnych stadiach

rozwoju adenowirusa jest ograniczona do pierwszych dwóch miejsc poliadenylacji. Terminacja transkrypcji następuje w połowie normalnej jednostki transkrypcyjnej o długości 25 kpz. Wykazano także [57] zakończenie syntezy mRNA pomiędzy ν i σ eksonami ν i σ immunoglobulin myszy w niektórych wczesnych stadiach rozwoju komórek B. W późnych stadiach rozwoju obydwie polipeptydy podlegają ekspresji. Do genów, u których obserwowano przedwczesną terminację transkrypcji, należą geny HIV LTR [37], wczesne i późne polioma [82], beta-globiny mysiej [65] czy HSP 70 muszki owocowej [77]. We wszystkich tych przypadkach obserwowano różnicę długości syntetyzowanego RNA sięgającą kilkuset nukleotydów, pomiędzy podstawowym poziomem aktywności genu a stanem po indukcji genu odpowiednim czynnikiem. Co więcej obserwowano w czasie elongacji genów klasy II występowanie wewnątrzgenowych odcinków, w których może nastąpić terminacja [5, 9, 19, 39, 54, 58, 60, 63, 70, 93]. Często przedwczesną terminację określa się jako wewnątrzgenową lub powodowaną przez wewnętrzne miejsca terminacji [40].

Jednak badania ostatnich lat wykazały pauzowanie polimerazy RNA bardzo blisko miejsca inicjacji tak, że enzym syntetyzuje tylko krótkie odcinki RNA. Dlatego takie przerwanie ciągłości transkrypcji można określić jako okołopromotorowe. Długość syntetyzowanego RNA wskazuje, że kompleks elongacyjny może jeszcze pozostawać w bezpośrednim kontakcie z kompleksem inicjacyjnym powodującym pauzowanie (HSP 70). Mechanizm tego typu pauzowania jest stosunkowo najlepiej poznany dla transkrypcji genów szoku cieplnego HSP 70 u muszki owocowej i dla późnych genów LTR wirusa HIV. W każdym z tych przypadków mechanizm przerwania ciągłości transkrypcji jest inny. Dla HSP 70 odpowiedzialna za pauzowanie polimerazy RNA II jest występująca przed TATA box sekwencja GAGA [49] wiążąca podlegający konstytutywnej ekspresji [7, 26, 64] 66 kDa czynnik białkowy.

Przedwczesna terminacja genu LTR wirusa HIV spowodowana jest wystąpieniem zdegenerowanej struktury "szpilki do włosów" w RNA powstałym po przepisaniu tzw. sekwencji TAR (rys. 2). Sekwencja ta obejmuje nukleotydy od +1 do +62. Mechanizm przerwania transkrypcji nie jest do końca poznany, jednak sugeruje się, że bierze on udział w formowaniu kompleksów transkrypcyjnych niezdolnych do efektywnej transkrypcji [66].

Drugą dużą grupą elementów mogących spowodować pauzowanie lub przedwczesną terminację transkrypcji są różnego rodzaju zawady przestrzenne, nie będące integralnymi sygnałami terminacji, na jakie może w czasie transkrypcji natrafić polimeraza. Najlepiej poznana jest struktura występująca w genie histonowym H3.3. Występuje w niej fragment bogaty w T [40]. Istotne, aczkolwiek nie zawsze spełnione, jest fazowe (tzn. o jeden skręt heliksu) ustawienie odcinków bogatych w T. Powodują one zagięcie (*bending*) heliksu DNA [31]. Pojawiają się także sugestie odpowiedzialności białek, związanych z transkrybowaną sekwencją, za pauzowanie polimerazy II [72].



Rys. 2. Sekwencja TAR wirusa HIV. Na rysunku zaznaczone są zasady tworzące pętlę odgrywającą istotną rolę w łączeniu się z RNA białka Tat oraz białka komórkowego współdziałającego z Tat. HIV-1 TAR zawiera nukleotydy od +1 do +59, ale wystarczający i konieczny do oddziaływania z Tat jest region od +19 do +42. Trzeciorzędowa struktura sekwencji TAR u wirusa HIV-2 zawiera podwójną strukturę szpilki do włosów. Obydwie te struktury są aktywne z Tat-1 [34]

Należy zaznaczyć, że pauzowanie lub przedwczesna terminacja transkrypcji w każdym z tych miejsc nie jest 100-procentowa. Część polimeraz przechodzi przez takie miejsca i kontynuuje transkrypcję [28, 56].

FUNKCJA PAUZOWANIA I PRZEDWCZESNEJ TERMINACJI

Zjawisko pauzowania lub przedwczesnej terminacji obserwowane jest w przypadku wielu genów. Występuje ono u wielu wirusów, jak np. HIV [47, 48, 80, 94], adenowirusa [41], SV 40 [42], „minute” wirusa myszy [44], wirusa polioma [82]. Związane jest ono z ekspresją protoonkogenów c-myc [6, 19, 59, 73, 87, 93], c-myb [2, 67] czy c-fos [13]. Zjawisko to moduluje także poziom deaminazy adozynowej [11, 12, 46]. Wykazano także [57] zakończenie syntezy mRNA pomiędzy ν i σ eksonami ν i σ immunoglobulin myszy w niektórych wczesnych stadiach rozwoju komórek B. W późnych stadiach rozwoju obydwie polipeptydy podlegają ekspresji. Podobne zjawisko występuje w większym β -globinowym genie myszy podlegającym ekspresji w linii komórkowej erytroleukemii Friend po indukcji za pomocą DMSO.

Indukcja ta powoduje zanik przedwczesnej terminacji transkrypcji w pierwszym intronie tego genu [65]. Zatrzymanie transkrypcji genów szoku cieplnego jest nie tylko regulatorem ekspresji HSP 70 [77, 78], ale także umożliwia natychmiastową syntezę tego mRNA w momencie wystąpienia szoku.

Powyższy przegląd wykazuje, jak częste jest występowanie zarówno pauzowania, jak i przedwczesnej terminacji transkrypcji. W niektórych wypadkach wykazano także jego fizjologiczną funkcję. Wydaje się jednak, że najczęściej zjawisko to występuje u eukariontów, gdy niezbędna jest szybka odpowiedź aparatu genetycznego na zewnętrzne sygnały. Pauzowanie transkrypcji może być też związane z ekspresją genów konstytucyjnych w określonych fazach cyklu komórkowego, jak np. genu histonu H3.

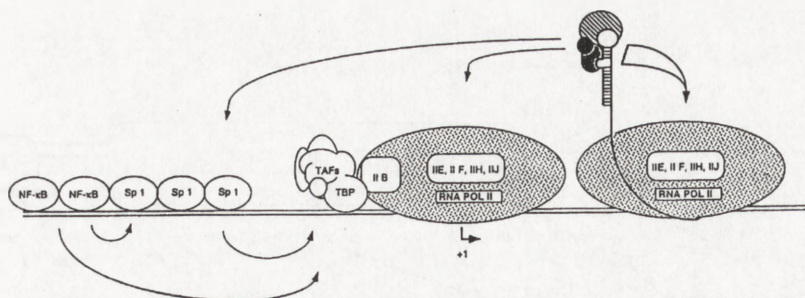
CZYNNIKI ZAPOBIEGAJĄCE PAUZOWANIU I PRZEDWCZESNEJ TERMINACJI

Wśród czynników zapobiegających przedwczesnej terminacji i pauzowaniu wyróżnić można zaliczane do faktorów elongacyjnych, białka o działaniu genowo niespecyficznym. Do tej grupy należą TF IIX, TF IIS, TF IIF [3, 4]. Ten ostatni wymagany jest zarówno podczas inicjacji, jak i elongacji i zwiększa procesywność (zdolność polimerazy do syntezy dłuższych łańcuchów RNA) transkrypcji. TF IIX dodatkowo stymuluje aktywność TF IIF [4, 33]. Najlepiej poznany jest TF IIS. Został on wyizolowany z szeregu tkanek zarówno zwierzęcych [30, 52, 68, 83, 84, 85], jak i roślinnej [20]. Białko to ma masę cząsteczkową 30–40 kDa [20, 62, 85]. Tworzy ono kompleks z polimerazą RNA [18, 30, 68]. Mechanizm jego działania został bliżej poznany w ciągu ostatnich lat. TF IIS podwyższa powinowactwo polimerazy RNA do DNA [18]. Nowe metody analizy i izolacji pauzujących kompleksów transkrypcyjnych wykazały aktywność nukleolityczną enzymu w kompleksie z TF IIS [33, 69]. Czynniki te ułatwiają polimerazie transkrypcję fragmentów DNA, których konformacja lub występowanie na nich białek uniemożliwia normalny przebieg transkrypcji [72]. W takich miejscach następuje pauzowanie i ujawnia się aktywność nukleolityczna. Enzym odcina 3'-OH końcowy fragment RNA. Jeżeli odcinek RNA jest krótszy od 7–9 nukleotydów, to polimeraza nie ulega translokacji [28]. Dalsza hydroliza RNA powoduje cofanie się enzymu na matrycy [28]. Dostępne metody badawcze nie doprowadziły do jednoznacznego ustalenia produktu hydrolizy. Jedni autorzy sugerują egzokleolityczną hydrolizę pojedynczych nukleotydów [90]. Inni uważają, że występuje pojedyncza endonukleolityczna hydroliza, której produktem jest oligonukleotyd [28]. Po skróceniu łańcucha polimeraza podejmuje dalszą dobudowę monofosforanów do istniejącego końca RNA i tym samym następuje ponowna próba przejścia tego fragmentu matrycy. Wydaje się, że sama polimeraza lub polimeraza w kompleksie z TF IIS nie jest zdolna do usunięcia przeszkody [72]. Istniejąca zawada jest strukturą dynamiczną i gdy zostanie ona usunięta, polimeraza syntetyzuje dalszy fragment RNA (jak np. zagięcie heliksu (*bending*) i w momencie, gdy następuje

rozprostowanie heliksu, to polimeraza może kontynuować dalszą transkrypcję [40], podobnie w przypadku kompleksów białka z DNA. Dysocjacja białka od DNA otwiera drogę polimerazie [72]. Zdolność hydrolizy RNA przez polimerazę RNA w kompleksie z TF II S bez cofnięcia się enzymu na matrycy może sugerować udział kompleksu w rearanzacji istniejącej zawady [29]. Utrzymanie polimerazy RNA w trwałym kompleksie elongacyjnym w pobliżu przeszkody może być stabilizowane przez zwiększone powinowactwo enzymu do DNA w kompleksie z TF II S [18]. Część cząsteczek polimerazy RNA nie tworzących kompleksu z TF II S może kontynuować transkrypcję przez takie odcinki, ponieważ w danym momencie nie występuje na nich zawada przestrzenna. Badania Reinesa [71] wykazały, że 40–50% cząsteczek samej polimerazy transkrybuje bez przeszkód miejsce pauzowania Ia genu histonu H3. Wynika z tego, że po kilku hydrolizach i resyntezach ponad 99% populacji polimerazy będzie kontynuować dalszą transkrypcję [28].

Przedstawiony model działania TF II S połączony z hydrolizą w miejscach pauzowania 3' OH końca rosnącego transkrypty jest jednym z pośrednich dowodów wspierających perystaltyczny model elongacji transkrypcji. Występowanie tego typu niespecyficznych czynników elongacyjnych, mających działanie antyterminatora ułatwia całkowitą transkrypcję olbrzymich genów eukariotycznych.

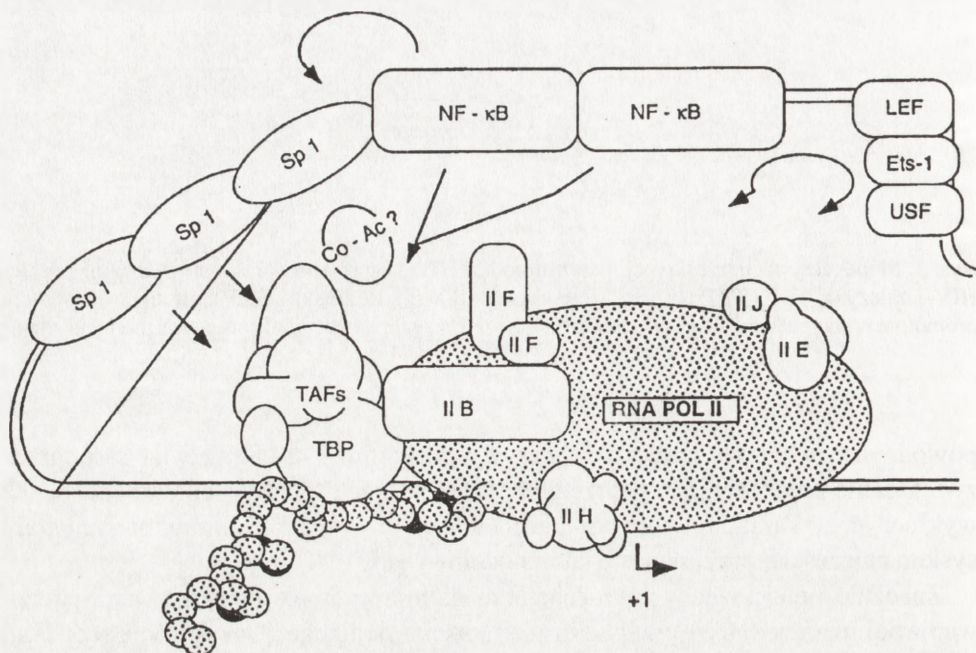
Odmienne jest natomiast, obecnie postulowany, sposób działania okolo-promotorowych elementów zapobiegających pauzowaniu i terminacji transkrypcji. Najlepiej poznanym sposobem działania jest wpływ antyterminatora syntetyzowanego przez wirus HIV określanego jako Tat. Stwierdzono, że niezablokowanie przez białko Tat sekwencji TAR obniża procesywność transkrypcji [56]. Oznacza to, że w przypadku braku Tat znacznie częściej następuje przedwczesna terminacja transkrypcji. Wynika z tego, że Tat powoduje formowanie kompleksów elongacyjnych "lepiej" przepisywających matrycę. Czynnikiem ten kompleksuje z RNA powstałym w wyniku transkrypcji sekwencji TAR [76, 95]. Pierwsze 62 zasady tego RNA tworzą fragment helikalny z dwoma pętlami. Mniejsza pętla oddziałuje z Tat i powstaje kompleks TAR-Tat [17, 79, 91]. Wykazano także obecność białek komórkowych stabilizujących wiązanie TAR-Tat albo modulujących aktywność tego kompleksu [24, 25, 55]. Zasadnicze pytanie dotyczy powstawania wobec braku Tat mniej procesywnych kompleksów elongacyjnych mimo obecności wymaganych białek inicjujących: NFAT [81], NF- κ B [61], SP-1 [34] czy oddziałujących z TATA box [23]. Istniejące doświadczenia sugerują stymulację przez Tat wiązania TF II F do polimerazy [38]. Obserwowano także synergizm działania Tat i TF II S [68] na procesywność transkrypcji. Postęp badań nad sposobem działania Tat nie daje jeszcze jednoznacznej odpowiedzi, ale sugeruje on, że efektywność elongacji może być uzależniona od prędkości inicjacji. Wykazano, że aktywacja elongacji przez Tat jest bardziej efektywna przy wysokim poziomie podstawowej transkrypcji [36, 43, 48, 66, 86]. Wydaje się możliwym, że [21] wolne tworzenie kompleksu elongacyjnego w stosunku do inicjacyjnego może prowadzić do powstania mniej procesywnego kompleksu elongacyjnego. Tat może



Rys. 3. Model aktywacji transkrypcji przez promotor HIV-1 wraz z asocjowanymi białkami. Inicjacja HIV-1 zależy od TBP i TAF oraz Sp-1, NF-kappaB. Białka LEF, Ets-1 i USF są istotne w aktywności promotora w przypadku zintegrowanego wirusa. Sp-1 pomagają w tworzeniu kompleksu preinicjacyjnego [34]

powodować tworzenie bardziej procesywnego kompleksu elongacyjnego poprzez zwiększenie prędkości jego tworzenia podczas inicjacji transkrypcji. Nie można też wykluczyć, że Tat modyfikuje kompleks elongacyjny po zakończeniu inicjacji i taki system najczęściej przyjmuje się jako modelowy [15, 21].

Znacznie mniej poznany jest mechanizm okołopromotorowego przerwania pauzowania polimerazy RNA w przypadku genów szoku cieplnego. Transkrypcja genu HSP 70 wzrasta kilkaset razy przy wzroście temperatury o 12°C [53]. Czynnikiem powodującym lawinowe uruchomienie transkrypcji tego genu jest HSF (czynnik szoku cieplnego) wiążący się do odcinka DNA określanego HSE w regionie promotorowym 100–200 pz od miejsca zapoczątkowania transkrypcji [64]. W sekwencji promotora genu HSP 70 stwierdzono miejsca wiązania czynników SP-1 i CTF BF [92, 95]. Wykazano [1], że intensywna transkrypcja tego genu uzależniona jest od obecności HSF i że spadkiem stężenia HSF obserwuje się spadek prędkości transkrypcji. Przypuszcza się [51], że czynnik białkowy wiążący się z sekwencją GAGA może albo usuwać z odcinka promotorowego nukleosomy udostępniając go dla innych czynników [14], albo może współdziałać bezpośrednio z białkami wiążącymi się do sekwencji TATA [49]. Ta ostatnia sugestia stworzenia olbrzymiego kompleksu zawierającego białko wiążące się z GAGA, TF II D razem z pauzującą polimerazą wydaje się bardzo atrakcyjna, albowiem formuje się w ten sposób duży nadwrażliwy region, do którego może przyłączyć się HSF. Jest to szczególnie istotne, ponieważ HSF nie wiąże się do HSE zasocjowanym z histonami w nukleosom [88, 89]. Wykazano [22], że *footprint* TF II D sięga aż do +35 pz, wykazując w przypadku HSP 70 interakcje z sekwencjami inicjatorowymi zlokalizowanymi około -30 do 0 w stosunku do miejsca startu transkrypcji. Zasięg TF II D pokrywa się z miejscem pauzowania polimerazy (+25) [77]. Dołączenie HSF do takiego kompleksu zawierającego białko wiążące się z GAGA, TF II D i pauzującą polimerazę może powodować przerwanie kontaktu enzymu z promotorem i przejście w bardzo aktywny kompleks



Rys. 4. Możliwy schemat pełnego kompleksu inicjującego transkrypcję genów LTR wirusa HIV uwzględniający transaktywację przez Tat. Rybonukleoproteinowy kompleks Tat-TAR modyfikuje nieprocesywną transkrypcję pauzującego kompleksu elongacyjnego w TAR. Te transkrypcyjne kompleksy zawierają obok polimeraz RNA II zestaw ogólnych czynników transkrypcyjnych. Tat albo koaktywator mogą aktywować preinicjacyjny kompleks przez umożliwienie oddziaływań między Sp-1 i TBP:TAF albo jakkolwiek ogólny czynnik inicjacyjny obecny na inicjującej polimerazie. Podwójna funkcja podczas inicjacji, jak i elongacji może występować u silnych aktywatorów transkrypcji. Strzałki wskazują możliwe oddziaływania, ich szerokość wyraża względny efekt różnych interakcji [34]

elongacyjny. Rozpoczęcie elongacji może powodować zapotrzebowanie na nową cząsteczkę enzymu jako, że miejsce pauzowania enzymu jest zajęte także, gdy gen jest nieindukowany.

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat ujawniły, że proces regulacji ekspresji genu jest bardzo skomplikowany, wielopoziomowy i wieloetapowy. Nawet tylko na poziomie transkrypcji powinien być on rozpatrywany kompleksowo, ponieważ każdy etap transkrypcji jest ściśle uzależniony od innego. Przedstawione powyżej wyniki doświadczeń

wskazują jednoznacznie na bardzo złożony charakter elongacji, na jej nieciągłość i związaną z nią regulację syntezy mRNA. Elongacja okazała się etapem limitującym ekspresję niektórych genów. Synteza mRNA tych genów jest ograniczona obecnością określonych czynników lub aktywności, które kontrolują ten etap transkrypcji. Użyte wyniki dotyczące atenuacji transkrypcji wydają się też być związane z genami odpowiedzialnymi za szybką odpowiedź na poziomie genetycznym na zmienne warunki środowiska.

LITERATURA

- [1] ABRAYAYA K, PHILLIPS B, MORIMOTO RI. Attenuation of the heat shock response in HeLa cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and modulated by changes in growth and heat shock temperatures. *Genes Dev* 1991; **5**: 2117–2127.
- [2] BENDER TP, THOMPSON CB, KUEHL WM. Differential expression of c- myb mRNA in murine B lymphomas by a block of transcription elongation. *Science* 1987; **237**: 1473–1476.
- [3] BENGAL E, GOLDRING A, ALONI Y. Transcriptional complexes synthesizing attenuated RNA can serve as a model system for analysis elongation factors. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18926–18932.
- [4] BENGAL E, FLORES O, KRAUSKOPF A, REINBERG D, ALONI Y. Role of mammalian transcription factors TF IIF, IIS and IIX during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 1991; **11**: 1195–1203.
- [5] BENTLEY DL, GROUDINE M. A block of elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL 60 cells. *Nature* 1986; **53**: 702–706.
- [6] BENTLEY DL, GROUDINE M. Sequence requirement for premature termination of transcription in the human c-myc gene. *Cell* 1988; **53**: 245–256.
- [7] BIGGIN MD, TJAN R. Transcription factor that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* 1988; **53**: 699–711.
- [8] BORUKHOV S, LEE J, GOLDFARB A. Mapping of the contact for the RNA 3' terminus in the largest subunit of RNA polymerase. *J Biol Chem* 1991; **266**: 23932–23939.
- [9] CESARMAN E, DALLA-FAVERA R, BENTLEY DL, GROUDINE M. Mutation in the first exon are associated with altered transcript of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* 1987; **238**: 1272–1275.
- [10] CHAMBERLIN MJ. Harvey Lect. 1993. in press za Das A.
- [11] CHEN Z, HARLESS ML, WRIGHT DA, KELLEMS RE. Identification and characterization of transcriptional arrest sites in exon I of the human adenosine deaminase gene. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 4555–4564.
- [12] CHINSKY JM, MAC M-C, RAMAMUTRY V, KELLEMS RE. Adenosine deaminase gene expression. Tissue-dependent regulation of transcription elongation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14561–14565.
- [13] COLLART MA, TOURKINE N, BEKU D, VASSALIP, JEANTEUR P, BLANCHARD J-M. c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by calcium-dependent block of elongation in intron 1. *Mol Biol* 1991; **11**: 2826–2831.
- [14] CROWNSTON CE, KERRIGAN LA, LIRO LM, MARSHAL DE, KADONAGA JT. Sequence specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase transcription. *Science* 1991; **251**: 643–649.
- [15] DAS A. Control of transcription termination by RNA binding proteins. *Ann Rev Biochem* 1993; **82**: 893–930.

- [16] DEUSCHLE W, KRAMMERER W, GENTZ R, BUJARD H. Promoters of *Escherichia coli*: hierarchy of *in vivo* strength indicate alternate structure. *EMBO J* 1986; **5**: 2987–2994.
- [17] DINGWALL C, ERNBERG J, GAIT MJ, GREEN SM, HEEPHY S, KORN J, LOWE AD, SINGH H, SKIMNER MA. HIV-1 Tat protein stimulates transcription by binding to U rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J* 1990; **9**: 4145–4153.
- [18] DULLIN P, GALBAS M, CHODYNICKA-KORDUS G, FABISZ-KIJOWSKA A, WALERYCH W. Transcriptional activity of a complex of wheat RNA polymerase II and nonhistone chromosomal protein (NHCP). *Acta Biochim Polon* 1989; **36**: 263–274.
- [19] EICK D, BORKMANN GW. Transcription arrest in the first exon is the last control mechanism in a c-myc gene expression. *Nucl Acid Res* 1986; **14**: 8331–8346.
- [20] FABISZ-KIJOWSKA A, DULLIN P, CZAPARA R, WALERYCH W, SZURMAK B, BUCHOWICZ J. Preferential stimulation of RNA polymerase IIB by chromosomal protein from wheat germ. *Phytochem* 1983; **22**: 1707–1711.
- [21] FRANKAL AD. Activation of HIV transcription. *Current Opinion in Gen Dev* 1992; **1**: 283–298.
- [22] FURWELL BA, EMANUEL PA, GILMOUR DS. TF IID sequence recognition of the initiator and sequence further downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev* 1994; **8**: 830–842.
- [23] GARCIA JA, WU FK, MITSUYASU R, GAYNOR RB. Interactions of the cellular proteins in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J* 1987; **6**: 3761–3770.
- [24] GATINOL A A, KUMOR A, RUBRON A, JEANG KT. Identification of the cellular protein that bind to the human immunodeficiency virus type 1 transactivation response TAR element RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7828–7832.
- [25] GAYNOR R, SAULTANALUS E, KUWUBARA M, GARCIA J, SIGMNO DS. Specific binding of HeLa cells nuclear protein to RNA sequences in the human immunodeficiency virus transactivating region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4858–4862.
- [26] GILMOUR DS, THOMAS GH, ELGIN SC. *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science* 1988; **245**: 3984–3989.
- [27] GOURSE RL. Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*. *Nucl Acid Res*. 1988; **16**: 9783–9787.
- [28] GU W, POWELL W, MOTE J jr, REINES D. Nascent RNA cleavage by arrested RNA polymerase II does not require upstream translocation of the elongation complex on DNA. *J Biol Chem* 1993; **268**: 25604–25616.
- [29] HIPPEL von PH, YAGER TD. Transcription elongation and termination are competitive processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2307–2311.
- [30] HORIKOSHI M, SEKIMUZU K, NATORI S. Analysis of the stimulatory factor of RNA polymerase II in the initiation and elongation complex. *J Biol Chem* 1984; **259**: 608–611.
- [31] HISIEH CH, GRIFFITH JD. The terminus of SV 40 DNA replication and transcription contains a sharp sequence directed curve. *Cell* 1988; **52**: 535–544.
- [32] IZBAN MG, LUSE DS. Factor stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA, but very poorly on chromatin templates. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13647–13654.
- [33] IZBAN MG, LUSE DS. The RNA polymerase II ternary complexes cleaves the nascent transcript in 3'–5' direction in the presence elongation factor IIS. *Genes* 1992; **6**: 1342–1356.
- [34] JONES KA, KADONAGA JF, LUCIW PA, TJAN R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by cellular transcription factor SP1. *Science* 1986; **232**: 755–759.
- [35] KAINZ M, ROBERTS J. Structure of transcription elongation complexes *in vivo*. *Science* 1992; **255**: 838–840.
- [36] KAMINE J, SUBRAMANIAN T, CHINADURAI G. SP1-dependent activation of synthetic promoter by HIV-1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8510–8514.

- [37] KAO S-Y, CALMAN AF, LUCIW PA, PETERLIN BM. Antitermination of transcription within a long terminal repeat of HIV-1 by Tat gene product. *Nature* 1987; **330**: 489–493.
- [38] KATO H, SUMIMOTO H, POGNANAC P, CHEN C-H, ROSEN CA, ROEDER RG. HIV-1 Tat acts as a processivity factor *in vitro* in conjunction with cellular elongation proteins. *Genes Dev* 1992; **6**: 655–666.
- [39] KERPPOLA TK, KANE CM. Intrinsic sites of transcription termination and pausing of c-myc gene. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 4389–4394.
- [40] KERPPOLA TK, KANE CM. Analysis of the signal for transcription termination by purified RNA polymerase II. *Biochemistry* 1990; **29**: 269–278.
- [41] KESSLER M, ALONI Y. A block of transcription elongation of the SV 40 attenuation site is decreased *in vitro* by oligomers complementary to segment of attenuator RNA. *Gene* 1989; **84**: 65–72.
- [42] KESSLER M, ALONI Y. Elements modulating the block of transcription elongation at the adenovirus 2 attenuation site. *J Biol Chem* 1989; **264**: 9785–9790.
- [43] KESSLER M, MATHEWS MB. Tat transactivation of HIV-1 promoter is influenced by basal promoter activity and SV 40 origin of replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 10018–10022.
- [44] KRAUSKOPF A, RASNEKAR O, ALONI Y. A cis-downstream element participates in regulation of *in vitro* transcription initiation from P38 promoter of minute virus of mice. *J Virol* 1990; **64**: 354–360.
- [45] KRUMMEL B, CHAMBERLIN MJ. Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes. *J Mol Biol* 1992; **225**: 339–250.
- [46] LATIER DL, STATES JC, HUTTON JJ, WIGINTON D A. Cell-type- specific transcriptional regulation of the human adenosine deaminase gene. *Nucl Acid Res* 1989; **17**: 1061–1076.
- [47] LASPIA MF, RICE AP, MATHEWS MB. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* 1989; **59**: 283–292.
- [48] LASPIA MF, RICE AP, MATHEWS MB. Synergy between HIV 1 Tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes Dev* 1990; **4**: 2397–2408.
- [49] LEE H-S, KRAUSS KW, WOLFNER MF, LIS JT. DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of HSP 70. *Genes Dev* 1992; **6**: 284–295.
- [50] LEE JY, GOLDFARB A. Lac repressor acts by modifying the initial transcribing complex so that it cannot leave the promoter. *Cell* 1991; **66**: 793–798.
- [51] LEE JY, KASHEV M, BORUKHOV S, GOLDFARB A. A beta subunit mutation disrupting the catalytic function of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6018–6022.
- [52] LEGRAVEREND M, GLAZER RI. Characterization of a non-histone chromosomal protein which stimulate RNA polymerase. *Bichim Biophys Acta* 1980; **607**: 92–101.
- [53] LUNDQUIST S. The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 1986; **55**: 1151–1191.
- [54] MADERIOUS A, CHEN-KIANG S. Pausing and premature termination of the human RNA polymerase II during transcription of adenovirus *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 5931–5935.
- [55] MARCINIAK RA, GARCIA-BLANKO MA, SHARP PA. Identification and characterization of HeLa nuclear protein that specifically binds to the trans-activation-response (TAR) element of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3624–3628.
- [56] MARCINIAK RA, SHARP PA. HIV-1 Tat protein promote formation of more processive elongation complexes. *EMBO J* 1991; **10**: 4189–4196.
- [57] MATHER EL, NELSON KJ, HAIMOVICH J, PERRY RP. Mode of regulation of immunoglobulin ni i delta chain expression varies during B-lymphocyte maturation. *Cell* 1984; **36**: 329–338.

- [58] McDEVIT MA, IMPERIALE MJ, ALI H, NEVINS JR. Multiple factors are required for poly A addition to a mRNA 3' end. *Genes Dev* 1988; **2**: 993-999.
- [59] MILLER H, ASSELIN C, DUFORT D, YENG JQ, GUPTA K, MARCU KB, NEPVU A. A cis-acting element in the promotor region of the murine c-myc gene is necessary for transcriptional block. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 5340-5349.
- [60] MOK M, MADERIOUS A, CHEN-KIANG S. Premature termination by human RNA polymerase II occurs temporally in adenovirus major late transcription unit. *Mol Cel Biol* 1984; **46**: 173-187.
- [61] NABEL G, BALTIMORE D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T-cells. *Nature* 1987; **326**: 711-713.
- [62] NATORI S. Stimulatory proteins of RNA polymerase II from Erlich ascites cells. *Mol Cell Biol* 1982; **46**: 173-187.
- [63] NEPVU A, MARKU KB. Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc gene. *EMBO J* 1986; **5**: 2859-2865.
- [64] PARKER ES, TOPOL J. A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor bind to the regulatory site of an HSP 70 gene. *Cell* 1984; **37**: 273-283.
- [65] PROUDFOOT NJ, WHITELAW E. Frontiers in molecular biology. 1988, str. 97-129. IRL Press
- [66] RATNASABAPATHY R, SHELDON M, JOHAL L, HERNANDEZ N. The HIV 1 long terminal repeat contains an unusual element that induces the synthesis of short RNAs from various mRNA and snRNA promoters. *Genes Dev* 1990; **4**: 2061-2074.
- [67] REDDY CD, REDDY EP. Differential binding of nuclear factor to the intron 1 sequences containing the transcriptional pause site correlates with c-myc expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7326-7330.
- [68] REINBERG D, ROEDER RG. Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3331-3337.
- [69] REINES D. Elongation factor dependent transcript shortening by template engaged RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3795-3804.
- [70] REINES D, CHAMBERLIN MJ, KANE CM. Transcription elongation factor SII enables RNA polymerase II to elongate through a block of transcription a human gene *in vitro*. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10799-10809.
- [71] REINES D, GHANOUMI P, LI Q, MOTE J jr. The polymerase II elongation factor-dependent involves nascent RNA cleavage. *J Biol Chem* 1992; **267**: 15516-15524.
- [72] REINES D, MOTE J jr. Elongation factor SII-dependent transcription by RNA polymerase II a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 1917-1921.
- [73] RENAN MJ. Does NF-kappaB relieve the transcription block in c-myc. *Cancer Lett* 1989; **47**: 1-9.
- [74] RICE GA, KANE CM, CHAMBERLIN MJ. Footprinting analysis of mammalian RNA polymerase II along its transcript an alternative view on transcription elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7983-7987.
- [75] RICHARDSON JP. Attachment of nascent RNA molecules to superhelical DNA. *J Mol Biol* 1975; **98**: 565-575.
- [76] ROSEN C A, SODROSKI JG, HASELTIME WA. Location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV) long terminal repeat. *Cell* 1985; **41**: 813-823.
- [77] ROUQUIE AE, LIS JT. The RNA polymerase molecule at the 5' end of the uninduced HSP 70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 1988; **19**: 69-78.
- [78] ROUQUIE AE, LIS JT. Postinitiation transcriptional control in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 6041-6045.

- [79] ROY S, DELLING V, CHEN CH, ROSEN CA, SONNENBERG N. A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated Trans-activation. *Genes Dev* 1990; **4**: 1365–1373.
- [80] SELBY MJ, BAIN ES, LUCIW PA, PETERLIN B M. Structure, sequence and position of the stem-loop in TAR determine transcriptional elongation by Tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev* 1989; **3**: 547–558.
- [81] SIEKIEVITZ M, JOSEPH SF, DUKOVITZ M, PEFFER N, WONG-STAAAL F, GREENE W. Activation of the HIV-1 LTR by T-cell mitogens and transactivation protein of HTLV-1. *Science* 1987; **238**: 1575–1578.
- [82] SKARNES WC, TESSIER DC, ACHESON NH. RNA polymerase stall and/or prematurely terminate nearby both early and late promoters of poliomyelitis DNA. *J Mol Biol* 1988; **203**: 489–493.
- [83] SLUDER AE, PRICE DH, GREELEAF AL. Elongation by *Drosophila* RNA polymerase. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9917–9925.
- [84] SLUDER AE, GREELEAF AL, PRICE DH. Properties of *Drosophila* RNA polymerase elongation factors. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8963–8969.
- [85] SOPTA M, CARTHEW RW, GREENBLAT J. Isolation of three proteins that bind to mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1985; **260**: 1353–1360.
- [86] SOUTHGATE CD, GREEN MR. The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site. Implications for Tat function. *Genes Dev* 1991; **5**: 2496–2507.
- [87] SPENCER CA, GROUDINE M. Molecular analysis of the c-myc transcription elongation block: implications for the generation of Burkitt Lymphoma. *Ann NY Acad Sci* 1990; **599**: 12–28.
- [88] STRANEY SB, CROTHERS DM. Lac repressor is a transient gene-activating protein. *Cell* 1987; **51**: 699–707.
- [89] TAYLOR ICA, WORKMAN JL, SCHUETZ TJ, KINGSTON RE. Facilitated binding of GAL 4 and heat shock factor to nucleosomal templates; differential function of DNA-binding domains. *Genes Dev* 1991; **5**: 1285–1298.
- [90] WANG D, HAWLEY DK. Identification of a 3'–5' exonuclease activity associated with human RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 843–847.
- [91] WEEKS KM, CROTHERS DM. Recognition by Tat-derived peptides: Interaction in the major groove. *Cell* 1991; **66**: 577–588.
- [92] WILLIAMS GT, MORIMOTO RI. Maximal stress induced transcription from human HSP 70 promoter requires interaction with the basal promoter elements independent rotational alignment. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 3125–3136.
- [93] WRIGHT S, BISHOP J H. DNA sequence that mediate attenuation of transcription from mouse protooncogene myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 505–509.
- [94] WU F, GARCIA J, SIGMAN D, GAYNOR R. Tat regulates binding of the human immunodeficiency virus trans-activating region RNA loop-binding protein TRP-185. *Genes Dev* 1991; **5**: 2128–2140.
- [95] WU B, HUNT C, MORIMOTO RI. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP 70. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 330–341.
- [96] ZIFF EB. Splicing of adenovirus and other animal viruses. *Int Rev Cytol* 1985; **90**: 327–358.
- [97] YAGER TD, von HIPPEL PH. *E. coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. (ed.) FC Neidhardt 1987; 1241–1275, Washington DC.

Otrzymano: 12.05.1995 r.

Przyjęto: 14.09.1995 r.

Adres autorów: Katedra Biochemii i Biotechnologii AR
60-637 Poznań, ul. Wołyńska 35

LOCUS MINISATELITARNY PRZY GENIE INSULINY A PODATNOŚĆ NA CUKRZYCĘ INSULINOZALEŻNĄ*

A MINISATELLITE LOCUS NEIGHBOURING THE INSULIN GENE AND PREDISPOSITION TO INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS

Małgorzata JUNGERMAN

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: Cukrzyca insulinozależna jest chorobą autoimmunologiczną uwarunkowaną wieloczynnikowo. Genetyczna predyspozycja do zachorowania ma charakter wielogenowy. Jednym z loci istotnych w cukrzycy jest region kodujący insulinę, a w nim, jak dowodzą najnowsze badania, sekwencja minisatelitarna VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*). W niniejszej pracy omówiono szczegółowo analizę haplotypów obejmującą miejsca polimorficzne w regionie insulinowym, dzięki której udowodniono, że podatność na cukrzycę insulinozależną jest determinowana w tym locus przez VNTR; a także badania zmierzające do ustalenia roli tej sekwencji minisatelitarnej w regulacji ekspresji genu kodującego insulinę. Obserwacje dotyczące VNTR przy genie insuliny są ważne dla wyjaśnienia roli wielu innych sekwencji minisatelitarnych w genomie człowieka.

Słowa kluczowe: cukrzyca insulinozależna, locus minisatelitarny, polimorfizm, gen insuliny, haplotyp, asocjacja, sprzężenie

Summary: Insulin-dependent diabetes mellitus is a multifactorial autoimmune disorder. Genetic predisposition to develop diabetes is polygenic. One of the loci important for the disease is the insulin coding region, in which, according to the most recent results, a minisatellite VNTR sequence (variable number of tandem repeats) plays a crucial role. In this paper haplotype analysis involving insulin region polymorphisms is described in details. This analysis has proven that susceptibility to develop diabetes maps in this region to VNTR. Studies aimed at characterization of a role played by this minisatellite for regulation of insulin gene expression are also described here. Observations of insulin region VNTR are important for revealing a role of many other minisatellites in human genome.

Key words: insulin-dependent diabetes mellitus, minisatellite locus, polymorphism, insulin gene, haplotype, association, linkage

*Praca napisana w ramach realizacji programu badawczego KBN nr 4 S405 002 05

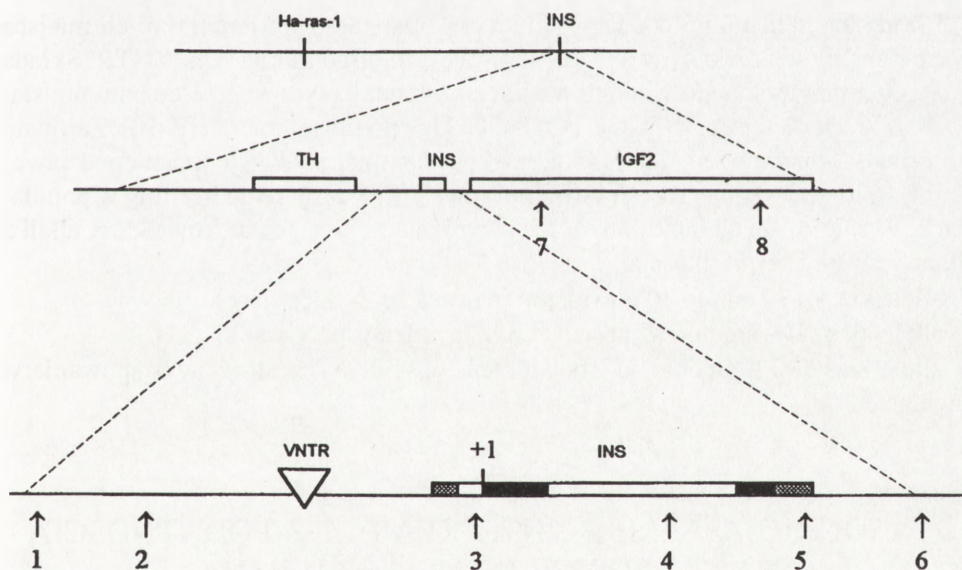
<http://rcin.org.pl>

Wykaz skrótów: IDDM (ang. *insulin-dependent diabetes mellitus*) – cukrzyca insulinozależna; VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) – tandemowe sekwencje nukleotydów w DNA o zmiennej liczbie powtórzeń; HLA (ang. *human leucocyte antigens*) – antygeny zgodności tkankowej; HLA-DQ, HLA-DR – subregiony w obrębie kompleksu genów HLA; INS – gen insuliny; TH – gen hydroksylazy tyrozyny; IGF-2 (ang. *insulin-like growth factor 2*) – gen insulinopodobnego czynnika wzrostu 2; Ha-ras-1 – nazwa protoonkogenu; HIT – linie komórek beta trzustki chomików; PrILuc – plazmid zawierający promotor genu prolaktyny i gen lucyferazy; Pur-1 – białkowy aktywator transkrypcji; IAPP (ang. *human islet amyloid polypeptide*) – wyspowy polipeptyd amyloidowy; DraIII, Fnu4HI, FokI, HphI, MspI, PstI – nazwy enzymów restrykcyjnych; A – adenina; C – cytozyna; G – guanina; T – tymina; IBD (ang. *identity by descent*) – zjawisko występowania u rodzeństwa takiego samego z dwóch możliwych haplotypów danego rodzica; PH (ang. *protective haplotype*) – haplotyp o działaniu ochronnym; VPH (ang. *very protective haplotype*) – haplotyp o działaniu ochronnym silniejszym niż PH.

1. WPROWADZENIE

Cukrzyca typu 1 (insulinozależna; IDDM – ang. *insulin-dependent diabetes mellitus*) jest chorobą autoimmunologiczną, której podłoże stanowi zniszczenie produkujących insulinę komórek beta wysp Langerhansa w trzustce. Etiologia cukrzycy jest złożona i obejmuje zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Genetycznie uwarunkowana podatność ma charakter wielogenowy i jest niezbędnym, lecz nie wystarczającym warunkiem zachorowania. Prowadzone od wielu lat badania nad dziedziczeniem podatności na cukrzycę insulinozależną ujawniły znaczenie kilku różnych loci w genomie, jednak mechanizm ich wspólnego działania na drodze doprowadzającej do zachorowania nie jest jak dotąd poznany wystarczająco precyzyjnie. Wiadomo, iż głównym locus dziedziczonej podatności na cukrzycę typu 1 jest region kodujący antygeny HLA (chromosom 6p21), określane jako *IDDM1*. Drugim co do znaczenia jest region INS kodujący insulinę (*IDDM2* – chromosom 11p15.5); mniej istotne dla zachorowania loci zidentyfikowano w chromosomach: 15q (*IDDM3*), 11q (*IDDM4*), 6q (*IDDM5*) oraz 2q (*IDDM7*); nie wyklucza się udziału jeszcze kilku innych loci [5, 7, 9, 11]. W obrębie *IDDM1* decydującą rolę odgrywa polimorfizm wiążących peptydy domen cząsteczek klasy II (HLA-DQ i -DR) [19, 20], natomiast w przypadku większości pozostałych loci nie określono jak dotąd precyzyjnie mutacji czy miejsc polimorficznych przyczyniających się do zachorowania na cukrzycę. Poznanie takich mutacji i miejsc polimorficznych byłoby niezmiernie ważne dla wyjaśnienia etiologii cukrzycy i mogłoby stworzyć w przyszłości możliwość identyfikowania osób podatnych i zapobiegania rozwojowi choroby. Biorąc pod uwagę liczbę chorych na cukrzycę (choruje 2–5% populacji; 25% ogółu przypadków stanowią chorzy na omawianą tu cukrzycę typu 1) zrozumiałym jest, dlaczego w wielu ośrodkach całego świata prowadzi się badania nad dziedziczeniem podatności na tę chorobę. W ostatnim czasie wielu badaczy skupiło swoją uwagę na roli, jaką odgrywa w cukrzycy region INS (locus *IDDM2*). Niniejsza praca stanowi przegląd najważniejszych badań, dzięki którym udokumentowano, iż w regionie tym dziedziczona podat-

ność na cukrzycę typu 1 jest determinowana przez sekwencję VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) bezpośrednio sąsiadującą z genem insuliny. Mianem sekwencji VNTR określa się loci w genomie złożone z wielu tandemowych powtórzeń podstawowego elementu zbudowanego z kilku bądź kilkunastu nukleotydów o specyficznej dla danego locus VNTR sekwencji. Przedstawione tu najnowsze dane dotyczące struktury i funkcji sekwencji VNTR przy genie insuliny mogą mieć znaczenie dla bardziej ogólnego wyjaśnienia roli minisatelitów typu VNTR, których liczbę w genomie człowieka szacuje się na ok. 2000 [18]. Do badań locus *IDDM2* zastosowano podstawowe metody genetyki człowieka: analizowano poszczególne miejsca polimorficzne u osób chorych i w populacjach kontrolnych osób zdrowych (analiza asocjacji) oraz testowano w rodzinach przekazywanie potomstwu poszczególnych alleli danego miejsca polimorficznego łącznie z przekazywaniem podatności na zachorowanie (analiza sprzężeń). Analizowano dziedziczenie alleli w każdym z miejsc polimorficznych oddzielnie, następnie całe haplotypy, aby w końcu przejść do badań roli sekwencji VNTR w regulacji ekspresji genu insuliny. Omówiony w niniejszej pracy ciąg eksperymentów dotyczących regionu *INS* ukazuje złożoność problemów, jakie napotykają na swojej drodze genetycy próbujący dociec przyczyn chorób uwarunkowanych wielogenowo.



Rys. 1. Mapa regionu kodującego insulinę [12]: w genie insuliny (*INS*) prostokąty czarne symbolizują sekwencje kodujące, białe – introny, a szare – sekwencje nie ulegające translacji; symbol "+1" oznacza położenie pierwszej zasady kodonu ATG inicjującego translację; na schemacie zaznaczono położenie sekwencji VNTR oraz następujących wybranych miejsc polimorficznych: 1. – 2,733A/C, 2. – 2,221/MspI, 3. – 23/HphI, 4. +805/DraIII, 5. +1,127/PstI, 6. +1,428/FokI, 7. +2,883A/G, 8. +4,701C/T

2. BUDOWA REGIONU KODUJĄCEGO INSULINĘ

Gen kodujący insulinę zlokalizowany jest u człowieka w krótkim ramieniu chromosomu 11 (11p15.5). W regionie tym sąsiadują ze sobą następujące geny: protoonkogen Ha-ras-1, gen hydroksylazy tyrozyny TH, gen insuliny INS oraz gen insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF2 (ang. *insulin-like growth factor 2*) (rys. 1). Sekwencja i struktura genu insuliny została dokładnie poznana [3]. Koduje on mRNA złożony z 1430 nukleotydów, zawierający dwa introny o długości 179 i 789 nukleotydów. Pierwszy z nich jest zlokalizowany w pobliżu końca 5' genu insuliny w regionie nie ulegającym translacji, a drugi w obrębie sekwencji kodującej łańcuch C proinsuliny. Introny te są usuwane z pierwotnego transkryptu w trakcie dojrzewania.

Przed genem insuliny, w odległości kilkuset par zasad w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji zlokalizowana jest sekwencja minisatelitarna typu VNTR. Składa się ona z powtórzonego wielokrotnie czternastonukleotydowego elementu podstawowego o sekwencji ACAGGGGTGTGGGG lub podobnej (tab. 1) [2, 13]. Zarówno zmienna ilość powtórzeń, jak i różnice sekwencji nukleotydów jednostki podstawowej są źródłem wysokiego polimorfizmu locus VNTR przy genie insuliny w populacjach. W zależności od liczby powtórzeń wyróżnia się trzy podstawowe klasy alleli o charakterystycznej wielkości:

- allele klasy I – średnio 40 powtórzeń (najczęściej występujące),
- allele klasy II – średnio 85 powtórzeń (najbardziej spotykane) i
- allele klasy III – średnio 157 powtórzeń (pośrednia częstość występowania w populacjach).

3. ASOCJACJA ALLELI VNTR KLASY I Z PODATNOŚCIĄ NA CUKRZYCĘ INSULINOZALEŻNĄ

Ze względu na położenie VNTR w bezpośrednim sąsiedztwie genu insuliny już w momencie odkrycia tej sekwencji sugerowano możliwość jej udziału w regulacji ekspresji genu, a także w dziedzicznej podatności na cukrzycę insulinozależną. Porównując genotypy chorych na cukrzycę typu 1 i osób zdrowych stwierdzono

TABELA 1. Sekwencja nukleotydów jednostek elementarnych wchodzących w skład VNTR przy genie insuliny [13]

Symbol	Sekwencja nukleotydów (5' → 3')
a	ACAGGGGTGTGGGG
b	ACAGGGGTCTGGGG
c	ACAGGGGTCTGGGG
d	ACAGGGGTCCGGGG
e	ATAGGGGTGTGGGG
f	ACAGGGGTCCCGGG
g	ACAGGGGTCTGAGG
h	ACAGGGGTGTGGGC
i	ACAGGGTCTGGGG
j	ACAGGGGTGTGAGG
k	ATAGGGGTGTGTGG

zwiększoną częstość alleli VNTR klasy I u pacjentów, a zatem asocjację (ang. *association*) alleli klasy I z predyspozycją na zachorowanie [1, 16]. Z kolei badanie rodzin typu simplex (jedno dziecko chore), multiplex (co najmniej dwoje dzieci chorych) oraz multiplex, w których również jedno z rodziców choruje na cukrzycę wykazało zwiększoną częstość homozygot I/I wśród wszystkich członków badanych rodzin (rodzice, chore i zdrowe dzieci) w porównaniu z częstością w populacji kontrolnej. Zjawisko to, znane jako agregacja alleli klasy I w rodzinach z cukrzycą [17] było przyczyną, dla której mimo wielu prób przez długi czas nie potwierdzono sprzężenia (ang. *linkage*) alleli locus VNTR z przekazywaniem podatności na cukrzycę w rodzinach [6, 8, 10]. Wykazanie takiego sprzężenia jest w zasadzie konieczne dla udokumentowania rzeczywistego udziału danego locus w dziedziczonej predyspozycji na zachorowanie, lecz wśród przeważających w rodzinach z cukrzycą identycznych homozygot I/I nie udaje się prześledzić dziedziczenia poszczególnych alleli. Agregacja alleli klasy I w rodzinach z cukrzycą stanowi jednak bardziej znaczący dowód na udział locus VNTR w zachorowaniu na cukrzycę niż sama tylko asocjacja wydedukowana przez porównanie częstości alleli u pacjentów i zdrowych osób kontrolnych.

4. BADANIE POLIMORFIZMU REGIONU INS

Szereg grup badaczy przeprowadziło szczegółową analizę dziedziczenia wielu sąsiadujących ze sobą miejsc polimorficznych w regionie INS w celu udokumentowania, iż to rzeczywiście VNTR jest w tym locus sekwencją odpowiedzialną za podatność na cukrzycę insulinozależną. Wszystkie te miejsca polimorficzne, z wyjątkiem VNTR, są pojedynczymi substytucjami nukleotydowymi. Ich położenie w locus INS definiuje odległość od pierwszej zasady (+1) kodonu ATG inicjującego translację. Część z nich występuje w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, np. -23/HphI. Inne, położone poza takimi sekwencjami, oznacza się podając ich położenie oraz nukleotydy występujące w poszczególnych wariantach, np. +1,140A/C. Julier i współpracownicy badali łącznie osiem miejsc polimorficznych w genie insuliny i jego bezpośrednim sąsiedztwie (rys. 1): 5'VNTR, -23/HphI, +805/DraIII, +1,127/PstI, +1,140A/C, +1,355C/T, +1,404/Fnu4HI, +1,428/FokI (liczby określają położenie miejsca polimorficznego względem pierwszej zasady kodonu ATG inicjującego translację; przecinki, zgodnie z nomenklaturą anglojęzyczną, oddzielają cyfrę tysięcy od cyfry setek), z czego wcześniej znane były tylko dwa (VNTR oraz +1,127/PstI) [12]. Żadne z nich nie powoduje zmiany sekwencji aminokwasów w cząsteczce insuliny. Wykazali asocjację z cukrzycą nie tylko sekwencji VNTR, ale wszystkich wymienionych ośmiu miejsc polimorficznych. Równocześnie stwierdzili brak takiej asocjacji w przypadku markerów w genach sąsiadujących z genem insuliny (rys. 1) i zdefiniowali wielkość regionu asocjacji jako 19 tysięcy par

zasad. W takiej odległości od siebie występowały bowiem najbliższe badane markery nie zasocjowane z chorobą flankujące region INS od strony 3' i 5'. Miejsca polimorficzne zasocjowane z cukrzycą są położone bardzo blisko siebie i w związku z tym silnie ze sobą sprzężone (zjawisko "linkage disequilibrium"), co znacznie utrudnia zidentyfikowanie, który z nich jest rzeczywiście związany z predyspozycją do zachorowania. W populacji ogromną większość stanowią haplotypy "wszędzie +" lub "wszędzie -", gdzie "+" oznacza wariant danego miejsca polimorficznego zasocjowany pozytywnie, a "-" zasocjowany negatywnie z podatnością na zachorowanie (Uwaga: znaki "+" i "-" w tym przypadku mają własne znaczenie, którego nie należy mylić ze znakami towarzyszącymi liczbom określającym położenie miejsc polimorficznych względem zasady +1, tzn. pierwszej zasady kodonu ATG inicjującego translację). U przeważającej liczby osób w rodzinach z cukrzycą występuje genotyp I/I (równoznaczny z +/+) w locus VNTR, a w związku z silnymi sprzężeniami również +/- w odniesieniu do pozostałych miejsc polimorficznych w regionie INS. Julier i współpracownicy [12] wybierając te nieliczne rodziny, w których u rodziców występował genotyp +/-, podjęli próbę wykazania sprzężenia alleli locus INS z przekazywaniem podatności na zachorowanie. Stwierdzili podwyższoną częstość występowania u chorego rodzeństwa identycznych haplotypów rodzicielskich (prawdopodobieństwo IBD – ang. *identity by descent* – przekraczające 50%), co stanowi dowód istnienia poszukiwanego sprzężenia. Interesujące jest, że zjawisko to dotyczy wyłącznie haplotypów pochodzących od ojców, czego przyczyną mogłoby być preferencyjne inaktywowanie alleli pochodzenia matczynego (ang. *maternal imprinting*) w badanym locus.

Kolejne badania znacznie precyzyjniej określiły granice regionu asocjacji z podatnością na cukrzycę w locus INS [14]. Lucassen i współpracownicy przeanalizowali łącznie 19 miejsc polimorficznych (10 z nich to nowe, nie opisane wcześniej markery) na odcinku o długości 12,5 tysięcy par zasad, obejmującym fragment 3' genu hydroksylazy tyrozyny (TH), gen insuliny (INS) oraz fragment 5' genu insulino-podobnego czynnika wzrostu (IGF2) (tab. 2). Spośród nich dziesięć markerów, w tym sekwencja VNTR, wykazuje wysoką aso-

TABELA 2. Miejsca polimorficzne w genie insuliny i jego sąsiedztwie badane przez Lucassen i współpracowników [14] oraz względne ryzyko (RR – *relative risk*) zachorowania na cukrzycę insulinozależną homozygot +/+, gdzie "+" oznacza wariant danego polimorfizmu zasocjowany z podatnością na zachorowanie.

Miejsce polimorficzne	RR
Sekwencja mikrosatelitarna w genie TH	0,35
-4,127/PstI	0,7
-2,733A/C	3,8
-2,221/MspI	4,2
VNTR	4,5
-23/HphI	4,5
+805/DraIII	4,0
+1,127/PstI	4,2
+1,140A/C	4,5
+1,355T/C	4,2
+1,404/Fnu4HI	4,2
+1,428/FokI	4,2
+2,331A/T	0,8
+2,336 5bp del	0,7
+3,201/HaeII	0,8
+3,580/MspI	0,6
+3,688C/T	0,6
+3,839/AlwNI	1,6
IGF2 Exon 3/AluI	0,6

cją z predyspozycją do zachorowania; obejmują one łącznie odcinek o długości 4,1 tysięcy par zasad, flankowany przez markery -2,733A/C i +1,428/FokI. Podobnie jak w przypadku badań Julier, w wyniku silnego sprzężenia poszczególnych markerów ze sobą autorzy pracy nie zidentyfikowali jednoznacznie miejsca polimorficznego rzeczywiście istotnego dla zachorowania.

Z kolei Owerbach i Gabbay [15] stwierdzili w badanej populacji asocjację z podatnością na cukrzycę następujących markerów (rys. 1) w regionie INS: VNTR, +1,428/FokI, +2,883A/G, +4,701C/T (liczby określające położenie poszczególnych miejsc polimorficznych zostały tu zmienione w celu ujednoczenia numeracji: autorzy w oryginalnej pracy przyjmują za nukleotyd nr 1 ten, który odpowiada punktowi startu transkrypcji, w pozostałych cytowanych tu pracach jako nr 1 uważa się nukleotyd odpowiadający początkowi translacji). Zidentyfikowali trzy najczęściej spotykane w populacji haplotypy:

Haplotyp 1: VNTR klasa I/1,428-FokI(-)/2,883G/4,701C – pozytywna asocjacja;

Haplotyp 2: VNTR klasa III/1,428-FokI(+)/2,883G/4,701C – negatywna asocjacja;

Haplotyp 3: VNTR klasa III/1,428-FokI(-)/2,883A/4,701T – negatywna asocjacja.

Pozytywna asocjacja oznacza częstsze występowanie danego haplotypu u osób chorych w porównaniu ze zdrowymi (dany haplotyp zwiększa podatność na zachorowanie), negatywna asocjacja – odwrotnie (haplotyp działa ochronnie). Znaki (+) i (-) za nazwą "1,428/FokI" oznaczają odpowiednio obecność lub brak sekwencji rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny FokI. Nasilenie negatywnej asocjacji może być różne: stwierdzono, iż u homozygot 3/3 względne ryzyko zachorowania jest bardziej obniżone niż u homozygot 2/2 (silniejsze działanie ochronne haplotypu 3 niż 2). Polimorficzny locus nie jest istotny dla predyspozycji do zachorowania, jeśli identyczny jego wariant występuje w powiązaniu z haplotypami zarówno pozytywnie, jak i negatywnie zasocjowanymi z cukrzycą. Obserwujemy to zjawisko dla markerów +1,428/FokI (identyczny wariant w haplotypach 1 i 3) oraz +2,883A/G i +4,701C/T (identyczne warianty w haplotypach 1 i 2). Jedynym markerem, którego specyficzne warianty są jednoznacznie powiązane z haplotypami pozytywnie albo negatywnie zasocjowanymi z zachorowaniem, jest VNTR: allele klasy I występują w haplocie predysponującym do zachorowania, allele klasy III – w haplocie "ochronnych". Analizując sekwencje nukleotydów elementu powtarzającego się w locus VNTR stwierdzono różnice w częstości występowania elementów o określonej sekwencji w różnych haplotypach. Elementy występujące z wysoką częstością w powiązaniu z haplotypami 2 i 3 (np. element a, b, d czy e – patrz tabela 1) są rzadko spotykane w haplocie 1. Jest to szczególnie wyraźnie uwidocznione w przypadku elementu "e", którego częstość jest tym mniejsza, im wyższe jest względne ryzyko zachorowania w powiązaniu z danym haplociem: najwyższa częstość elementu "e" występuje w haplocie 3, w haplocie 2 jest ona pośrednia, a w haplocie 1 ten element nie występuje wcale w badanej populacji. Opisana przez Owerbacha i Gabbaya analiza haplotypów w locus INS oraz analiza sekwencji nukleotydów w obrębie elementów

powtarzających się wchodzących w skład VNTR wskazuje, że za dziedziczną podatność na cukrzycę insulinozależną związaną z regionem kodującym insulinę jest odpowiedzialny locus VNTR. Zarówno długość alleli, jak i sekwencja nukleotydów VNTR odgrywa przypuszczalnie istotną rolę.

Owerbach i Gabbay po raz pierwszy metodą analizy haplotypów wykazali znaczenie sekwencji VNTR. Nie analizowali oni jednak markerów leżących pomiędzy VNTR i +1,428/FokI, a tym samym nie wykluczyli ich ewentualnej roli. Dokładniejsze badania locus INS podobną do powyżej opisanej metodą z uwzględnieniem większej ilości leżących bliżej siebie markerów przeprowadzili później Bennett i współpracownicy [4]. Analizowano następujące miejsca polimorficzne: -2,733A/C, -2,221/MspI, VNTR, -23/HphI, +805/DraIII, +1,127/PstI, +1,428/FokI. Zidentyfikowano trzy najczęściej spotykane w badanej populacji haplotypy: A: [+ / + / + / + / + / + / +], B: [- / - / - / - / - / -], C: [- / + / - / - / + / + / +], gdzie “+” i “-” oznaczają odpowiednio wariant danego miejsca polimorficznego zasocjowany pozytywnie lub negatywnie z predyspozycją do zachorowania na cukrzycę. Dla locus VNTR znak “+” odnosi się do alleli klasy I, znak “-” do alleli klasy III. Spośród tych trzech haplotypów wyłącznie A zwiększa podatność na zachorowanie. Haplotypy B i C z kolei obniżają względne ryzyko zachorowania, przy czym C (określany jako VPH – ang. *very protective haplotype*) obniża je bardziej, niż B (PH – ang. *protective haplotype*). Markery -2,221/MspI, +805/DraIII, +1,127/PstI oraz +1,428/FokI nie mogą w rzeczywistości wpływać na podatność na zachorowanie, ponieważ występują one jako wariant “+” w powiązaniu z haplotypem VPH, który jako całość wywiera działanie ochronne. Różne nasilenie działania ochronnego haplotypów PH i VPH jest determinowane przez różnice w obrębie trzech pozostałych miejsc polimorficznych. -2,733A/C i -23/HphI są markerami dwuallelicznymi, tzn. posiadają tylko po jednym wariantie odpowiednio “+” i “-”. Wynika z tego, iż wariant “-” w powiązaniu z PH jest identyczny z wariantem “-” w powiązaniu z VPH, a więc nie są to markery różnicujące oba haplotypy. W przypadku VNTR natomiast istnieje liczna grupa sub-alleli klasy III, stanowiących wariant “-”. Bennett i współpracownicy zidentyfikowali wśród nich piętnaście alleli różniących się nieznacznie wielkością, które oznaczyli jako 301–315 i wykazali, że inne z tych sub-alleli są powiązane z haplotypem PH niż z VPH. Z kolei w klasie I VNTR wyróżniono aż dwadzieścia jeden sub-alleli różniących się wielkością o 14 lub 15 par zasad. Podwyższona częstość przekazywania alleli klasy I przez rodziców dzieciom chorym na cukrzycę insulinozależną potwierdza ich znaczenie dla podatności na tę chorobę i dotyczy wszystkich sub-alleli z wyjątkiem tzw. allelu 698. Analiza sekwencji nukleotydowej elementów powtarzających się wchodzących w skład VNTR wykazała, że allel 698 jako jedyny spośród klasy I posiada w swoim składzie element “e” (tab. 1), spotykany wyłącznie w haplotypach o działaniu ochronnym. Wyniki badań Bennetta i współpracowników potwierdziły zatem wcześniejsze spostrzeżenia Owerbacha i Gabbaya, iż spośród różnych miejsc polimorficznych związanych z genem insuliny to właśnie locus VNTR

determinuje podatność na cukrzycę insulinozależną, przy czym znaczenie ma długość alleli (klasa I bądź klasa III) oraz sekwencja nukleotydów elementu powtarzającego się.

5. FUNKCJA SEKWENCJI VNTR PRZY GENIE INSULINY

Lokalizacja sekwencji VNTR w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca startu transkrypcji nasuwa przypuszczenie o udziale tej sekwencji w regulacji ekspresji genu insuliny. Opublikowane ostatnio wyniki badań *in vivo* oraz *in vitro* potwierdzają tę hipotezę. W trzustkach osób będących heterozygotami I/III w locus VNTR porównano ilości mRNA będącego produktem ekspresji haplotypu predysponującego do zachorowania i haplotypu warunkującego odporność (allel I i III, odpowiednio) i wykazano znaczne różnice w ilości tych mRNA [4]. Stwierdzono mianowicie większą ilość produktu ekspresji genu insuliny sprzężonego z allelem VNTR klasy I niż produktu klasy III. Odwrotną sytuację zaobserwowano jedynie w trzustce osoby, u której występował wspomniany już wyżej allel klasy I 698.

Postępując się sztucznie skonstruowanymi plazmidami zawierającymi różne allele VNTR, wprowadzonymi do hodowanych *in vitro* komórek wykazano wpływ sekwencji VNTR na intensywność transkrypcji sąsiadującego z nią genu [13]. W plazmidach obecny był promotor genu insuliny wraz z różnej długości sekwencją VNTR (klasa I lub klasa III) połączony z genem lucyferazy bądź też wyizolowana sekwencja VNTR połączona z obcym promotorem oraz genem lucyferazy. W tym drugim przypadku zastosowano promotor wyspowego polipeptydu amyloidowego IAPP (ang. *human islet amyloid polypeptide*). Intensywność ekspresji genu lucyferazy pod kontrolą tych promotorów badano w produkujących insulinę liniach komórek beta chomików (tzw. komórki HIT) oraz w liniach komórek płodowych wysp trzustki szczura. Rezultaty obserwacji natywnego promotora genu insuliny oraz sekwencji VNTR połączonej z obcym promotorem (IAPP) były podobne. We wszystkich układach stwierdzono zależność intensywności ekspresji genu od długości sekwencji VNTR: obecność dłuższych alleli (klasy III) determinowała bardziej intensywną ekspresję niż krótszych (klasy I). Przypuszczalnie intensywność transkrypcji jest uwarunkowana wiązaniem czynników białkowych do VNTR, czego dowodzą rezultaty równoczesnego wprowadzenia do komórek HeLa plazmidu zawierającego sekwencję VNTR połączoną z promotorem genu prolaktyny i genem lucyferazy (plazmid PrILuc) oraz ulegającego w tych komórkach ekspresji plazmidu zawierającego gen białka Pur-1 – szeroko spotykanego aktywatora transkrypcji [13]. Normalnie w komórkach HeLa gen insuliny pod kontrolą swojego promotora i sekwencji VNTR nie ulega ekspresji, dlatego spodziewano się bardzo niskiej aktywności podstawowej sekwencji VNTR w plazmidzie PrILuc. Po równoczesnym wprowadzeniu do komórek HeLa plazmidów PrILuc i Pur-1 obserwowano znacznie wyższą intensywność transkrypcji genu lucyferazy niż

po wprowadzeniu samego PrILuc, przy czym stopień aktywacji ekspresji genu był wprost proporcjonalnie zależny od długości VNTR w plazmidzie PrILuc. Intensywność transkrypcji oraz siła wiązania białka Pur-1 zależą również od sekwencji nukleotydów elementu powtarzającego się w obrębie VNTR. Sztuczne tetramery zawierające czterokrotnie powtórzony element o określonej sekwencji nukleotydowej (a–k, patrz tab. 1) wiążą białko Pur-1 *in vitro* ze zróżnicowaną siłą. Z kolei wprowadzenie poszczególnych tetramerów w sąsiedztwo promotora prolaktyny w plazmidzie PrILuc w różnym stopniu aktywuje transkrypcję w obecności białka Pur-1. W większości przypadków obserwowana *in vivo* intensywność transkrypcji jest wprost proporcjonalna do siły wiązania białka Pur-1 *in vitro* przez tetramery o określonej sekwencji nukleotydowej.

Niezwykle interesujący wydaje się fakt, iż ilość mRNA obserwowana w trzustkach [4] nie koreluje z intensywnością ekspresji genu w układach modelowych [13]. W trzustkach ilość mRNA insuliny wywodzącego się z allelu powiązanego z sekwencją VNTR klasy I (krótką) jest wyższa niż w przypadku VNTR klasy III. Wyjątek od tej obserwacji stanowi allel 698 – jedyny wśród alleli klasy I negatywnie zasocjowany z predyspozycją do zachorowania na cukrzycę insulinozależną. W układach modelowych jest odwrotnie: intensywniejszą transkrypcję obserwuje się w powiązaniu z dłuższą sekwencją VNTR. Należy podkreślić, iż ilość mRNA w trzustce jest uwarunkowana nie tylko intensywnością transkrypcji, ale również stabilnością mRNA, przy czym oba te parametry uzależnione są od stale zmieniającego się poziomu glukozy we krwi – dlatego próba bezpośredniego porównania zjawisk zachodzących w komórkach beta trzustki z procesami badanymi w układach modelowych może doprowadzić do pozornie sprzecznych wniosków. Bez wątpienia jednak oba opisane podejścia metodyczne dowodzą istnienia funkcjonalnych różnic pomiędzy allelami sekwencji VNTR. Szczególne obserwacje dotyczące allelu 698 mogą świadczyć o tym, że dla funkcji tej nadrzędne znaczenie ma sekwencja nukleotydów VNTR nad długością alleli wynikającą z różnej liczby powtórzeń jednostki podstawowej.

6. PODSUMOWANIE

Badanie asocjacji alleli VNTR z podatnością na cukrzycę insulinozależną w populacjach oraz szczegółowa analiza haplotypów dowodzą, iż sekwencja VNTR jest odpowiedzialna za predyspozycję do zachorowania związaną z regionem kodującym insulinę, określanym jako locus *IDDM2*. Długość alleli VNTR, wynikająca z ilości powtórzeń podstawowej kilkunastonukleotydowej jednostki oraz sekwencja nukleotydowa elementu powtarzającego się wpływają na intensywność ekspresji genu insuliny poprzez zróżnicowane wiązanie białkowych czynników transkrypcji, jak również na stabilność mRNA insuliny w komórkach beta trzustki. Znaczenie zróżnicowania funkcjonalnego poszczególnych alleli VNTR dla zachorowania na cukrzycę

nie jest dotychczas znane. Genetycznie uwarunkowana podatność na cukrzycę insulinozależną ma charakter wielogenowy z jednym locus głównym (region HLA, określane jako locus *IDDM1*) i kilku loci o mniejszym znaczeniu. Można zatem oczekiwać, iż współdziałanie tych loci warunkuje wystąpienie przyczyniającego się do zachorowania zespołu czynników, z których każdy oddzielnie nie wywoływałby krytycznego efektu; tym bardziej skomplikowane jest precyzyjne określenie roli każdego z tych loci oddzielnie. Podobną jak locus *VNTR* sprzężony z genem insuliny, rolę w regulacji ekspresji genów i determinowaniu podatności na choroby uwarunkowane genetycznie mogą pełnić inne sekwencje *VNTR* występujące licznie w genomie człowieka. Dla ścisłego zdefiniowania roli danego polimorficznego locus niezbędne jest badanie wielu sąsiadujących ze sobą markerów w różnych odpowiednio licznych populacjach, tak jak w przypadku opisanych w niniejszym przeglądzie eksperymentów.

LITERATURA

- [1] BELL GI, HORITA S, KARAM JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; **33**: 176–183.
- [2] BELL GI, KARAM JH, RUTTER WJ. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc Natn Acad Sci USA* 1981; **78**: 5759–5763.
- [3] BELL GI, PICTET RL, RUTTER WJ, CORDELL B, TISCHER E, GOODMAN HM. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 1980; **284**: 26–32.
- [4] BENNETT ST, LUCASSEN AM, GOUGH SCL, POWELL EE, UNDLIEN DE, PRITCHARD LE, MERRIMAN ME, KAWAGUCHI Y, DRONSFIELD MJ, POCIOT F, NERUP J, BOUZEKRI N, CAMBON-THOMSEN A, RØNNINGEN KS, BARNETT AH, BAIN SC, TODD JA. Susceptibility to human type 1 diabetes at *IDDM2* is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nature Genet* 1995; **9**: 284–292.
- [5] COPEMAN JB, CUCCA F, HEARNE CM, CORNALL RJ, REED PW, RØNNINGEN KS, UNDLIEN DE, NISTICO L., BUZZETTI R, TOSI R. Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (*IDDM7*) to chromosome 2q31-q33. *Nature Genet* 1995; **9**: 80–85.
- [6] COX NJ, BAKER L, SPIELMAN RS. Insulin gene sharing in sib pairs with insulin-dependent diabetes mellitus: no evidence for linkage. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 167–172.
- [7] DAVIES JL, KAWAGUCHI Y, BENNETT ST, COPEMAN JB, CORDELL HJ, PRITCHARD LE, REED PW, GOUGH SCL, JENKINS SC, PALMER SM, BALFOUR KM, ROWE BR, FARRALL M, BARNETT AH, BAIN SC, TODD JA. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; **371**: 130–136.
- [8] DONALD JA, BARENDSE W, COOPER DW. Linkage studies of HLA and insulin restriction fragment length polymorphisms in families with IDDM. *Genet Epidemiol* 1989; **6**: 77–81.
- [9] FIELD LL, TOBIAS R, MAGNUS T. A locus on chromosome 15q26 (*IDDM3*) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genet* 1994; **8**: 189–194.
- [10] FIMMERS R, NEUGEBAUER M, DENNERT J, WIENKER T, BAUR MP. Association and sibpair analysis for the HLA, Gm, Km and insulin polymorphisms in multiplex IDDM families. *Genet Epidemiol* 1989; **6**: 107–112.

- [11] HASHIMOTO L, HABITA C, BERESSI JP, DELEPINE M, BESSE C, CAMBON-THOMSEN A, DESCHAMPS I, ROTTER JI, DJOULAH S, JAMES MR, FROGUEL P, WEISSENBACH J, LATHROP GM, JULIER C. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature* 1994; **371**: 161–164.
- [12] JULIER C, HYER RN, DAVIES J, MERLIN F, SOULARUEP, BRIANT L, CATHELINÉAU G, DESCHAMPS I, ROTTER JI, FROGUEL P, BOITARD C, BELL JI, LATHROP GM. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 1991; **354**: 155–159.
- [13] KENNEDY GC, GERMAN MS, RUTTER WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus *IDDM2* regulates insulin transcription. *Nature Genet* 1995; **9**: 293–298.
- [14] LUCASSEN AM, JULIER C, BERESSI JP, BOITARD C, FROGUEL P, LATHROP M, BELL JI. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nature Genet* 1993; **4**: 305–310.
- [15] OWERBACH D, GABBAY KH. Localization of a type I diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat region flanking the insulin gene. *Diabetes* 1993; **42**: 1708–1714.
- [16] OWERBACH D, NERUP J. Restriction fragment length polymorphism of the insulin gene in diabetes mellitus. *Diabetes* 1982; **31**: 275–277.
- [17] RAFFEL LJ, HITMAN GA, TOYODA H, KARAM JH, BELL GI, ROTTER JI. The aggregation of the 5' insulin gene polymorphism in insulin dependent (type I) diabetes mellitus families. *J Med Genet* 1992; **29**: 447–450.
- [18] ROYCE NJ, CLARKSON RE, WONG Z, JEFFREYS A. Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes. *Genomics* 1988; **3**: 352–360.
- [19] SHEEHY MJ. HLA and insulin dependent diabetes. *Diabetes* 1992; **41**: 123–129.
- [20] TODD JA. The emperor's new genes: 1993 RD Lawrence lecture. *Diabetic Med* 1994; **11**: 6–16.

Otrzymano: 07.07. 1995 r.

Przyjęto: 14.09.1995 r.

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

MONITOROWANIE RESZTKOWEJ CHOROBY BIAŁACZKOWEJ

MONITORING MINIMAL RESIDUAL DISEASE

Jacek ROLIŃSKI, Anna DMOSZYŃSKA

Klinika Hematologii II Katedry Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie: Rozpoznanie resztkowej choroby białaczkowej jest istotne nie tylko dla dokładnego ustalenia stadium choroby, ale również dla oceny skuteczności leczenia. Często u pacjentów z kliniczną całkowitą remisją nadal istnieją komórki białaczkowe w ilości niemożliwej do wykrycia przy pomocy rutynowych metod diagnostycznych. Współcześnie dysponujemy bardziej czułymi metodami (cytometria przepływowa i techniki biologii molekularnej) pozwalającymi wykryć nieznaczną ilość komórek białaczkowych u chorych z całkowitą remisją hematologiczną.

Słowa kluczowe: resztkowa choroba białaczkowa, ostre białaczki, całkowita remisja

Summary: The ability to detect minimal residual disease is important not only for the accurate staging of disease at presentation, but also for the evaluation of therapy. Clinical complete remission patients still harbored leukaemia cells, but in insufficient numbers to be detected by standard diagnostic methods. Such techniques (flow cytometry and molecular biology techniques) that can detect minimal numbers of leukaemia cells in hematological complete remission patients are now available.

Key words: minimal residual disease, acute leukaemia, complete remission

Intensywna chemioterapia pozwala uzyskać remisję hematologiczną, która nie jest równoznaczna z wyeliminowaniem klonu białaczkowego.

Nawet po agresywnym leczeniu cytostatycznym często pozostaje pewna ilość komórek białaczkowych, które stanowią populację o zwiększonej lekooporności. Wykrycie komórek białaczkowych po zakończeniu indukcji czy konsolidacji (a więc intensywnej chemioterapii), może decydować o sposobie dalszego leczenia przede wszystkim o rozważeniu celowości przeszczepu szpiku. Śladowa obecność komórek blastycznych może być źródłem nawrotu białaczki, uważa się również, że całkowite ich zniszczenie jest konieczne do wyleczenia chorego. Jednym z kryteriów uzyskania całkowitej remisji (CR) w ostrych białaczkach jest obniżenie odsetka komórek bla-

stycznych szpiku poniżej 5% w badaniu morfologicznym. Dotyczy to remisji morfologicznej, która nie zawsze pokrywa się z remisją immunologiczną czy cytogenetyczną. W szpiku pacjentów z klinicznymi cechami CR oraz prawidłowymi w ocenie morfologicznej komórkami, często nadal stwierdza się komórki blastyczne (więcej niż 5%) stosując czulsze metody ich wykrywania [3]. Stąd też, istotne znaczenie ma znalezienie odpowiednio czulej metody pozwalającej na wykrycie resztkowej choroby białaczkowej.

W ostatnich latach do oceny resztkowej choroby białaczkowej stosuje się metody immunologiczne oraz techniki wykorzystywane w biologii molekularnej. Wśród tych pierwszych należy wymienić cytometrię przepływową. Jest to najczulsza i najszybsza z metod immunologicznych. Najkrócej cytometrię przepływową można scharakteryzować jako sposób oceny wielkości i budowy komórek oraz oznaczania ich markerów powierzchniowych (fenotypu) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami. Promień lasera i odpowiednio dobrany układ optyczny sprzężony z komputerem pozwala na określenie fenotypu powierzchniowego oraz cech morfologicznych komórek z prędkością kilkudziesięciu tysięcy komórek na minutę. Pozwala to osiągnąć wysoką dokładność i bardzo mały rozrzut wyników przy minimalnym nakładzie pracy, co jest nieosiągalne innymi metodami [6].

Badania w cytometrze przepływowym wykazały, że komórki blastyczne w prawie 30% ostrych białaczek u ludzi dorosłych, morfologicznie diagnozowanych jako ALL (ostre białaczki limfoblastyczne) mogą nosić fenotypowe cechy zarówno komórek B (CD 19) i T (CD 3); komórek T (CD 3) oraz linii mieloidalnej (CD 33); komórek B (CD 19) i linii mieloidalnej (CD 33) lub wszystkich trzech wyżej wymienionych linii [11]. Technika cytometrii przepływowej przy użyciu podwójnego lub potrójnego znakowania przeciwciałami monoklonalnymi pozwala na wykrycie wyżej wymienionych komórek reprezentujących mieszany fenotyp, które są bifenotypowymi komórkami białaczkowymi w prawidłowym morfologicznie szpiku.

Poszukiwanie resztkowej choroby białaczkowej przy pomocy cytometru przepływowego polega na wykrywaniu różnic w pojawianiu się specyficznych antygenów na powierzchni komórki (niekiedy antygenów wewnątrz komórkowych) w czasie jej dojrzewania od komórki macierzystej (*stem cell* – CD 34⁺) do komórki dojrzałej, na której nie wykrywa się antygenów CD 34. Ekspresja tego (CD 34) i innych antygenów, np. CD 10, CD 19, CD 33, może być wykorzystana do wykrycia określonych komórek linii limfoidalnej czy mieloidalnej znajdujących się na różnych etapach różnicowania.

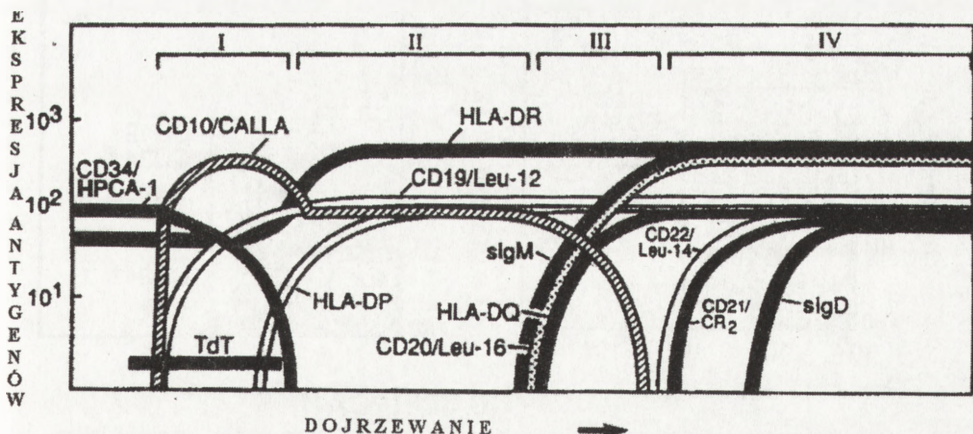
Komórki białaczkowe nie mają specyficznych nowotworowych markerów, najczęściej są to te same antygeny, które występują na prawidłowo rozwijających się komórkach linii limfoidalnej czy mieloidalnej. Diagnostyka resztkowej choroby białaczkowej może się także opierać na różnicach w obecności pewnych antygenów na większej niż normalnie ilości komórek – najczęściej jest to wynik przetrwania niektórych antygenów, które powinny zanikać w trakcie dojrzewania komórek. Do takich charakterystycznych znikających w czasie rozwoju komórki antygenów należą:

1) CD 34 – antygen komórek macierzystych, obecny we wczesnym okresie rozwoju linii limfoidalnej (komórki CD 34⁺, CD 19⁺, CD 10⁺, HLADR⁺, TdT⁺) linii mieloidalnej (komórki CD 34⁺, CD 33⁺, HLADR⁺). Antygen CD 34 nie obserwuje się na dojrzałych limfocytach i komórkach mieloidalnych.

2) CD 10 (CALLA – *common acute lymphoblastic leukaemia*) – antygen występujący na granulocytach, na Common-LLA, na niedojrzałych limfocytach B (występuje na *Pro-B cell*, *Pre-B cell*, *Immature B cell* – znika na dojrzałych limfocytach B).

3) TdT – antygen jądrowy, występujący w niedojrzałych limfocytach B (*Pro-B cell*, *Pre-B cell*) i niedojrzałych limfocytach T (*early* i *intermediate thymocyte*). Brak go na dojrzałych komórkach obu tych linii.

4) CD 1a – antygen występujący na korowych tymocytach, znika na dojrzałych tymocytach i dojrzałych limfocytach T. Schemat dojrzewania komórek w prawidłowym szpiku na przykładzie limfocytów B przedstawiono na rysunku 1. Jeżeli poszukuje się resztkowej choroby białaczkowej z użyciem wyżej wymienionych antygenów, istotne jest podwójne lub potrójne znakowanie jednej komórki przy pomocy przeciwciał monoklonalnych połączonych z różnymi fluorochromami (np. FITC, PE, RPE-Cy5). Na przykład znajdując u chorego z ostrą białaczką limfoblastyczną typu common (Common-LLA) w prawidłowym morfologicznie szpiku (blasty < 5%) zwiększony odsetek komórek CD 10⁺, CD 19⁺, CD 34⁺ możemy z dużym prawdopodobieństwem traktować komórki o takim fenotypie jako komórki białaczkowe. W czasie rozwoju limfocytów T jednym z pierwszych markerów linii limfoidalnej jest antygen CD 7. Pojawia się on przed antygenami CD 2, CD 3, CD 5. Dlatego też u chorego z rozpoznaniem T-ALL (CD 7⁺) i całkowitą remisją obecność zwiększonej liczby komórek CD 7⁺, CD 3⁻ świadczyć może o istnieniu resztkowej choroby. W przypadku B-ALL do tego typu rozpoznania możemy wykorzystać dość późne pojawianie się antygeny CD 21. Pojawia się on na limfocytach B po zniknięciu

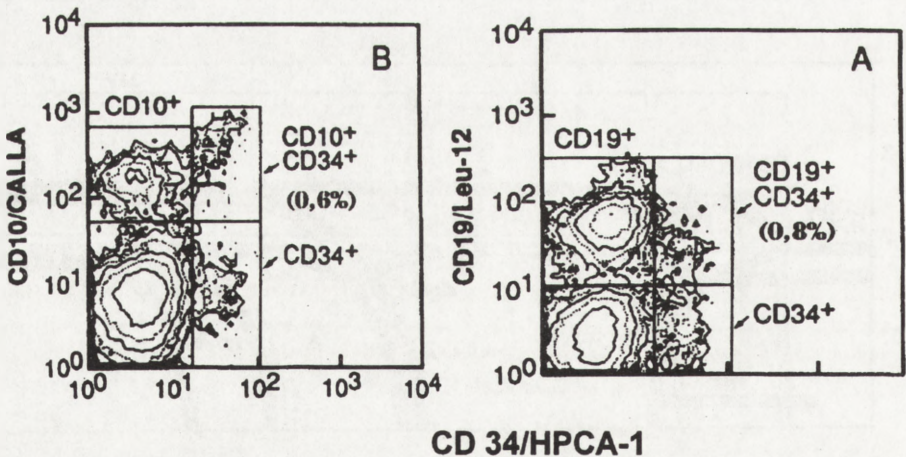


Rys. 1. Schemat rozwoju limfocytów B w prawidłowym szpiku (wg Loken [9])

antygenów CD 10 i CD 34 (rys. 1). Stąd też obecność populacji CD 21⁺, CD 34⁺ świadczy o przetrwaniu choroby resztkowej. Istotne jest przy tego rodzaju diagnozie, opracowanie norm występowania komórek o wyżej wymienionych fenotypach u ludzi zdrowych. Normy te powinny dotyczyć szpiku, gdyż "komórki resztkowe" łatwiej jest wykryć w szpiku niż we krwi obwodowej.

Na rysunku 2 przedstawiono odsetek komórek CD 34⁺, CD 19⁺ oraz CD 34⁺CD 10⁺ w prawidłowym szpiku. Przedstawione na rysunku 2 subpopulacje CD34⁺, CD 19⁺ i CD 34⁺, CD 10⁺ stanowią niewielki odsetek (odpowiednio 0,8% i 0,6%) wszystkich komórek w prawidłowym szpiku i powinny być brane pod uwagę przy poszukiwaniu komórek "resztkowych" w okresie całkowitej remisji klinicznej. Komórki o przedstawionych wyżej fenotypach mogą pojawiać się jako zaburzenia w różnicowaniu związane z podawaniem cytostatyków, mogą być również komórkami pochodzenia białaczkowego. Wiadomo, że leki cytostatyczne sprzyjają pojawianiu się młodych komórek w szpiku i we krwi obwodowej. Wykorzystuje się to między innymi do kolekcjonowania komórek macierzystych (CD 34⁺) z krwi obwodowej przed ich przeszczepianiem.

Mimo pewnych ograniczeń cytometrii przepływowej wydaje się, że może być ona wykorzystana do diagnostyki resztkowej choroby białaczkowej. Pozwala na to coraz większa liczba cytometrów przepływowych (również w ośrodkach hematologicznych w Polsce) oraz coraz większa wiedza na temat możliwych fenotypów komórek białaczkowych, co pozwala odpowiednio interpretować otrzymane wyniki. Wadą cytometru przepływowego jest dość niska czułość – ok. 1%. Istnieją jednak możliwości zwiększenia dokładności cytometru przepływowego i uzyskania czułości pozwalającej wykryć 1 komórkę nowotworową na milion komórek prawidłowych [4]. Wymaga to jednak wyeliminowania zjawisk, takich jak autofluorescencja komór-



Rys. 2. Immunofluorescencja młodych subpopulacji limfocytów B znakowanych przeciwciałami monoklonalnymi CD 34, CD 19, CD 10 w prawidłowym szpiku (wg Loken [9])

rek i możliwość niespecyficznego wiązania przeciwciał monoklonalnych z antygenami powierzchniowymi. Komórki hematopoetyczne mają na swojej powierzchni szereg różnych antygenów, które mogą wiązać przeciwciała monoklonalne nie tylko w miejscach, których poszukujemy. Prowadzi to do pojawienia się dodatnich sygnałów na komórkach zupełnie nieoczekiwanych, np. na komórkach, które danych markerów nie mają. Receptor Fc na limfocytach B i monocytach, powierzchniowe immunoglobuliny komórek B i kompleks receptora komórki T na limfocytach T mogą być tego przykładem [4]. Mogą one wykazywać taką samą fluorescencję jak komórki, które badamy. To niespecyficzne wiązanie nie stanowi problemu, jeżeli poszukiwana populacja komórek jest większa niż 1%, ale ma ogromne znaczenie, jeżeli chcemy wykryć jedną komórkę na milion. Drugą przyczyną fałszywie dodatnich sygnałów zmniejszających czułość cytometru przepływowego to autofluorescencja. W jednym z doniesień silna autofluorescencja na nieznakowanych przeciwciałami komórkach mysich występowała z częstością wynoszącą 10^4 [4]. Oznacza to że 1 na 10 000 komórek wysyła sygnał podobny do komórki znakowanej przeciwciałem monoklonalnym związanym z fluorochromem. Trzeci problem mogący wpływać na ocenę resztkowej choroby białaczkowej to tło (*background*) cytometru przepływowego spowodowane pojawianiem się komórek i ich fragmentów będących pozostałością wcześniejszych badań (wcześniej wprowadzanych próbek). Z reguły nie przekracza ono 1 komórki na sekundę, co ogranicza jednak czułość wykrywania komórek nowotworowych do 10^4 przy szybkości przepływu 10 000 komórek na sekundę. Tło można zlikwidować poprzez dokładne płukanie cytometru przy pomocy odpowiednio przygotowanych roztworów [5]. Najczęściej stosuje się roztwór o składzie 0,07 M NaOCl/0,05 M NaOH. Wyeliminowanie wcześniej opisywanych zjawisk, takich jak autofluorescencja i niespecyficzne wiązanie, jest również możliwe (co daje czułość 10^6), ale wymaga dość żmudnych przygotowań analizowanych komórek [4].

Do oceny resztkowej choroby białaczkowej stosuje się również techniki wykorzystywane w biologii molekularnej. Wśród tych ostatnich należy wymienić reakcję łańcuchową polimerazy (PCR). Jej zasada opiera się na wykorzystaniu obecności w komórkach nowotworowych fragmentów DNA o sekwencji nie występującej w normalnych prawidłowych komórkach. Dzięki technice PCR można wykryć fragment DNA pochodzący z komórek białaczkowych (przed rozpoczęciem leczenia), a następnie wykorzystać ten fragment DNA jako sondę do wykrywania resztkowej choroby białaczkowej w okresie całkowitej remisji [13]. Metoda ta pozwala również na znalezienie translokacji chromosomowych pojawiających się w białaczkach, których sekwencja punktów złamań jest znana. Przykładem jest fuzja genów *bcr-abl* występująca w 5–35% ostrej białaczki limfoblastycznej [5]. Następną możliwością jest badanie rearanżacji genu łańcucha γ receptora komórki T występującej w większości przypadków T-ALL i 40–70% B-ALL [8]. Mając odpowiednie oligonukleotydy (primery, czyli startery) rozpoznające zmienne sekwencje antygeny receptora $\gamma\delta$ komórki T możemy je wykorzystać w większości przypadków ostrej białaczki lim-

foblastycznej. Zaletą metody PCR jest jej czułość przewyższająca o kilka rzędów wielkości tradycyjne metody diagnostyczne (cytochemiczne czy immunologiczne). Czułość tej techniki w wykrywaniu komórek blastycznych jest określana jako 0,001–0,0001%, co jest ogromnym skokiem w porównaniu z czułością cytometru przepływowego, którego możliwości są ograniczone do 1% [3], a zwiększenie jego czułości jest dość czasochłonne. Dzięki uzyskaniu (z bakterii *Thermus aquaticus* żyjącej w gejzerach) termostabilnej polimerazy DNA można cały proces amplifikacji techniką PCR przyspieszyć, co zwiększa znacznie efektywność tej metody. Z drugiej strony wysoka nadmierna czułość PCR stwarza pewne problemy. Nadkażenie materiału nawet nieznaną ilością “obcego” DNA może dać wynik fałszywie dodatni i prowadzić do amplifikacji zanieczyszczonego materiału [13].

Próbuje się temu zapobiec poprzez przeprowadzanie ekstrakcji DNA, sekwencjonowanie próbek i amplifikacje w oddzielnych, odizolowanych pomieszczeniach. Konieczne jest również przeprowadzanie negatywnej kontroli oraz oceny aktywności polimerazy i jakości matrycowego DNA. W chwili obecnej pomimo niezwyklej czułości i szybkości PCR nie jest możliwe wprowadzenie tej metody w Polsce do rutynowego diagnozowania i monitorowania resztkowej choroby białaczkowej z uwagi na koszty i niewielką liczbę pracowni biologii molekularnej. Podobnie nie można zastosować do rutynowych badań prób z koloniami blastycznymi i oceną klonalną proliferacji. Czułość wykrywania komórek blastycznych wśród prawidłowych morfologicznie komórek szpiku oraz stwierdzenia ich klonalności jest zbliżona do czułości metod biologii molekularnej [1]. W niektórych badaniach stwierdzono u chorych z nowotworami układu krwiotwórczego w całkowitej remisji i prawidłowym morfologicznie szpikiem obecność linii komórkowych pochodzenia nowotworowego w odpowiednio przygotowanych hodowlach komórek szpikowych. Odsetek chorych z wykrytą resztkową chorobą wahał się od 17% do 50% zależnie od rodzaju rozrostu [2]. Wadą tej metody są trudności w uzyskaniu wzrostu komórek nowotworowych pomimo stosowania różnych podłoży hodowlanych. W przypadku ostrych białaczek podłoża wymagają odpowiednich czynników wzrostu zależnych od stopnia zróżnicowania komórek blastycznych. W przypadku ostrej białaczki szpikowej czynnikami stymulującymi wzrost kolonii są interleukiny: 3,5,6,GM-CSF,G-CSF, rzadziej M-CSF czy erytropoetyna, zależnie od stopnia zróżnicowania komórek blastycznych [1]. Odpowiedź na interleukinę 5 obserwowano głównie w podtypie cytogenetycznym z translokacją t(8;21)(q22;q22) [12]. W niektórych przypadkach ostrej białaczki limfoblastycznej (AML) komórki mają zdolności autokrynnego wydzielania “własnych” czynników wzrostu i nie wymagają stymulacji z zewnątrz.

Komórki B- i T-ALL odpowiadają w hodowli na interleukinę 7, B-ALL reaguje na interleukinę 3 [13]. W niewielkiej ilości przypadków T-ALL komórki są pobudzane przez interleukinę 2 i 4 lub nie potrzebują stymulacji z zewnątrz [9]. Wadą wszystkich prób z koloniami blastycznymi jest czasochłonność i trudności w uzyskaniu wzrostu komórek białaczkowych. Dzięki postępowi w diagnostyce immunologicznej i cyto-

genetycznej możliwe jest obecnie rozpoznanie i monitorowanie MRD. Konieczne są jednak dalsze wielośrodkowe randomizowane próby w celu określenia znaczenia klinicznego i optymalnego postępowania terapeutycznego w MRD. Wnikliwej ocenie powinny być poddane również próby leczenia immunomodulacyjnego z użyciem cytokin, takich jak IL-2 czy interferon γ . Niestety duży koszt tych cytokin uniemożliwia szersze ich zastosowanie do badań klinicznych.

LITERATURA

- [1] DELWEL R. Growth regulation of human acute myeloid leukemia: effects of five recombinant hematopoietic factors in a serum-free culture system. *Blood* 1998;**72**:1944–1949.
- [2] FAVROT M, HERVE P: Detection of minimal malignant cell infiltration in the bone marrow of patients with solid tumors, non-Hodgkin's lymphomas and leukemias. *Bone Marrow Transplant* 1987;**2**:117–122.
- [3] GRIBBEN JG, NADLER LM. Monitoring minimal residual disease. *Seminars in Oncology* 1993;**20**:143–155.
- [4] GROSS HJ, VERWER B, HOUCK D, RECKTENWALD D: Detection of rare cells at a frequency of one per milion by flow cytometry. *Cytometry* 1993;**14**:519–526.
- [5] GROSS HJ, HOFFMAN RA. Cleaning cycle for flow cytometers. U.S. Pat. 1991;**76**:87:472.
- [6] KAWIAK J, SKIERSKI JS . Cytometria przepływowa w badaniach komórek i niektóre jej zastosowania lekarskie. *Post Biol Kom* 1992;**19**(3) 239–254 .
- [7] KOHLER S, GALILI N, SKLAR JL, DONLON TA, BLUME KG, CLEARY ML. Expression of bcr-abl fusion transcripts following bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia* 1990;**4**(8):541–547.
- [8] KWOK S, HIGUCHI R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989;**339**:237–238.
- [9] LOKEN MR, SHAH VO, DATTLIO KL, CIVIN CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood* 1987;**70**:1316–1324.
- [10] LOWENBERG B, TOUW IP. Practical aspects and diagnostic significance of *in vitro* manipulation of progenitors in human acute myeloid and lymphoid leukaemia. *Bailliere's Clinical Haematology* 1991;**4**:3:637–653.
- [11] MacINTYRE EA, d'AURIOL L, DUPARC N. Use of oligonucleotide probes directed against T cell antigen receptor gamma delta variable-(diversity)-joining junctional sequences as a general method for detecting minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Invest* 1990;**86**:2125–2135.
- [12] SOBOL RE, MICK R, ROYSTON I . Clinical significance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *New Engl J Med* 1987;**16**:1111
- [13] TAYLOR JJ, MIDDLETON GP. The molecular genetic analysis of gene rearrangements in acute lymphoblastic leukaemia. *Bailliere's Clinical Haematology* 1991;**4**:3:695–713.
- [14] TOUW I, POWWELS K, Van AGTHOVEN T. Interleukin-7 is a growth factor of precursor B and T acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;**75**:2097–2101.

Otrzymano: 30.03.1995 r.

Przyjęto: 15.07.1995 r.

Adres Autora: Klinika Hematologii AM
8 20-950 Lublin, ul. Jaczewskiego

EFEKTY UBOCZNE PO PODANIU PARENTERALNYM OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSENSOWYCH

SIDE EFFECTS AFTER PARENTERAL ADMINISTRATION OF ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

Andrzej Piotr BIAŁEK*, Tomasz SKÓRSKI**

*Instytut Chorób Wewnętrznych Pomorskiej Akademii Medycznej Klinika Gastroenterologii; ** Zakład Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego

Streszczenie: W pracy przedstawiono efekty uboczne spotykane po parenteralnym podaniu fosfotiolowych pochodnych oligonukleotydów antysensowych zwierzętom, uwzględniając parametry hematologiczne, biochemiczne oraz zmiany narządowe stwierdzone w badaniu autopsyjnym. Opisano także zmiany narządowe po podaniu wysokich dawek oligomerów (toksyczność ostra). Przedstawiono także teoretyczne podstawy strategii antysensów, problemy związane ze zwiększeniem ich efektywności biologicznej, farmakokinetykę oraz wyniki stosowania oligonukleotydów na zwierzęcych modelach doświadczalnych.

Słowa kluczowe: oligonukleotydy, biodystrybucja, toksyczność

Summary: Side effects after parenteral administration of antisense oligonucleotides, including haematological parameters, biochemistry and organic changes in autopsy were discussed in this paper. Acute toxicity was described here too. The different aspects of antisense strategy concerning theoretical bases, biochemistry, biological activity and pharmacokinetics are described in first part of this paper. This paper also includes the review of the first trials of oligomer application in animal models.

Key words: oligonucleotides, biodistribution, toxicity

Powszechnie wiadomo, że u podłoża schorzeń nowotworowych leżą zaburzenia w prawidłowej ekspresji materiału genetycznego pojedynczych komórek. Uważa się, że zaburzenia te można podzielić na 2 podstawowe grupy [40,41]. Pierwsze z nich są wynikiem uszkodzenia kodu genetycznego genów hamujących proliferację komórek,

tw. antyonkogenów. Powodują one, że komórki przestają wytwarzać pewne białka ważne w negatywnej regulacji cyklu komórkowego. Druga grupa zaburzeń polega na nadmiernej ekspresji genów pobudzających namnażanie komórek, czyli tzw. protoonkogenów, co stanowi punkt wyjścia molekularnych podstaw terapii antysensowej, polegającej na blokowaniu nieprawidłowej ekspresji protoonkogenów za pomocą swoistych oligonukleotydów.

Strategia ta budzi pewne nadzieje na znalezienie “złotego środka” w onkologii klinicznej. Za pomocą odpowiednio przygotowanych oligonukleotydów można bowiem hamować ekspresję ściśle określonych genów, leżących u podłoża danego schorzenia, co byłoby leczeniem przyczynowym na poziomie molekularnym. Ponadto terapia ta wydaje się nieść małe ryzyko powikłań narządowych ze względu na swoją specyficzność, tj. wiązanie tylko przez określone geny, co jest nie bez znaczenia, biorąc pod uwagę konwencjonalne metody leczenia za pomocą chemio- i radioterapii. Najważniejsze, że stosując powyższą strategię, prawdopodobnie będzie można leczyć wiele chorób, wobec których dotychczasowe metody leczenia okazują się być bezsilne [41].

MOLEKULARNE PODSTAWY TERAPII ANTYSSENSOWEJ

Jak wiadomo, informacja genetyczna zakodowana jest w genach, które mieszczą się w chromosomalnym DNA. Z chwilą, gdy gen ulega ekspresji, informacja zawarta w sekwencji nukleotydów chromosomalnego DNA zostaje przepisana w procesie transkrypcji na komplementarną nić pre-mRNA, która następnie zostaje “oczyszczona” z niekodujących odcinków nukleotydów, zwanych intronami w procesie wycinania i składania (*splajcing*). Dojrzały czynnościowo RNA opuszcza jądro komórkowe i wnika do cytoplazmy, gdzie w procesie translacji sekwencje nukleotydów zostają “przepisane” w rybosomach na odpowiednią sekwencję aminokwasów, tworzących łańcuch peptydowy.

Syntetyczne oligonukleotydy mogą wpływać na ekspresję genu na wszystkich jej poziomach: mogą ułożyć się w wielkiej bruzdzie podwójnej spirali DNA i przyłączyć do komplementarnej sekwencji sensu jednej nici, tworząc potrójną spiralę i blokując ekspresję genu na poziomie transkrypcji [27,31,44]. Mogą też, co jest najczęściej wykorzystywane w praktyce, swoiście hybrydyzować do komplementarnej sekwencji sensu w cząsteczce mRNA i w ten sposób blokować translację [44,53]. Ogólnie ujmując oligomery antysensowe okazały się skuteczne w blokowaniu ekspresji genów kodujących białka, będące: czynnikami wzrostowymi [8,25,43,63], receptorami powierzchniowymi komórki [29,36,37,39,55], molekułami adhezyjnymi [8], drugimi przekaźnikami informacji [19,33,46,49,50,51,52,53], czynnikami transkrypcyjnymi [7,10,11,13,20,34,35,66,68], enzymami [59], białkami transportowymi i strukturalnymi [59,44].

BIOCHEMIA OLIGOMERÓW ANTYSSENSOWYCH

Oligonukleotydy antysensowe są krótkimi odcinkami syntetycznego DNA, długości 10–30 par zasad. Przyjmuje się, że oligomer długości 15–17 par zasad będzie już posiadał unikalną sekwencję, niepowtarzalną w całym genomie ludzkim [44,64]. Zbyt krótki łańcuch może być wiązany nieswoiście przez takie same lub podobne sekwencje na cząsteczkach mRNA innych genów, natomiast zbyt długi gorzej wnika do komórki i łatwiej ulega rozpadowi [41].

Ze względu na małą stabilność oligomerów fosfodwuestrowych, które są niszczone w płynach ustrojowych przez endonukleazy oraz 3' i 5' egzonukleazy, próbuje się dokonać szeregu modyfikacji chemicznych, zwłaszcza mostka fosfodwuestrowego, podstawiając w miejsce atomu wodoru m.in. siarkę lub resztę metylową. Uzyskane w ten sposób pochodne fosfotiolowe i metylofosfonianowe są znacznie bardziej odporne na degradację [30,58,69,71,72].

Równie ważnym problemem związanym z praktycznym wykorzystaniem antysensów jest zwiększenie ich wchłaniania dokomórkowego. Ogólnie ujmując oligomery antysensowe, z wyjątkiem metylofosfonianowych pochodnych, są polianionami [59], w związku z czym nie mogą przenikać biernie przez błonę komórkową. Transport ich jest procesem aktywnym opartym na endocytozie i/lub pinocytozie [58,16]. Opisano także białko o masie 80 kDa [59,26], które wydaje się pełnić rolę receptora błonowego dla oligomerów, aczkolwiek jego prawdziwa funkcja nie jest jeszcze w pełni poznana. Dla zwiększenia dokomórkowego przenikania oligomerów łączy się je z różnymi związkami chemicznymi, m.in. cholesterolem, co zwiększa ich wchłanianie ok. czterokrotnie na drodze internalizacji tego kompleksu przez receptor dla LDL. Próbuje się też modyfikacji samego łańcucha np. przez 3' metylację, co prowadzi do zmniejszenia ogólnego ładunku cząsteczki i sześciokrotnego zwiększenia jej przenikania do komórki [62]. Próbuje się także stymulacji komórek za pomocą czynników wzrostowych, co prowadzi do zwiększenia wychwytu oligomerów [24].

POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSSENSOWYCH W MEDYCYNIE KLINICZNEJ

Prowadzone dotychczas badania zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* nad praktycznym wykorzystaniem antysensów, dały obiecujące efekty w następujących dziedzinach:

**Onkologii klinicznej.* Oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenom c-myc [38] i bcr-abl [53] i c-myc [54] powodowały wolniejszy wzrost komórek ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej u myszy. Oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenowi c-myc hamowały również wzrost ludzkiego czerniaka [20] i komórek raka jelita grubego [41]. Również obiecujące są próby

usuwania komórek białaczkowych *ex vivo* ze szpiku kostnego przed autoprzeszczepami, zwłaszcza w przewlekłej białacze szpikowej [6].

**Profilaktyce restenozy naczyń wieńcowych po angioplastyce*. Oligomery antysensowe skierowane przeciwko protoonkogenom c-myc, c-mycdc2, PCNA, podane miejscowo w czasie angioplastyki hamowały niepożądaną proliferację miocytów ściany naczyniowej po zabiegu [5,32,57].

**Neurologii*. Oligomery antysensowe przeciwko genom receptora metyloasparaginowego [65] mogą mieć praktyczne zastosowanie w leczeniu udarów mózgu, zmniejszając ognisko uszkodzenia tkanki nerwowej.

**Wirusologii i parazytologii*. Wykazano efekt hamujący oligomerów antysensowych na proliferację wirusów: opryszczki typu 1 [56], nabytych zespołów niedoborów immunologicznych [3], grypy, wirusa wywołującego brodawczaki [15] oraz pozytywny wpływ w leczeniu malarii [59].

FARMAKOKINETYKA OLIGOMERÓW ANTYSSENSOWYCH

Zaawansowane są prace dotyczące farmakokinetyki oligomerów podawanych parenteralnie. Dotyczą one głównie pochodnych fosfotiolowych. Zgodnie z dotychczasowymi doniesieniami, farmakokinetyka oligomerów opisywana jest przez dwufazowy model, z $t_{1/2\alpha} = 20-25$ min, który odpowiada biodystrybucji narządowej, oraz $t_{1/2\beta} = 27-41$ godz., w którym zachodzi eliminacja z ustroju [16,21,58]. Względnie długi okres pozanaczyniowej obecności oligonukleotydów, odpowiada prawdopodobnie ich penetracji wewnątrzkomórkowej, co potwierdzają badania *in vitro* [22]. Po około 72 godzinach większość podanych oligomerów zostaje wydalona z moczem. Z kałem wydalą się mniej niż 1%. Większość badaczy jest zgodna, że degradacja fosfotiolowych oligomerów *in vivo* jest stosunkowo niska [2,21].

Udział procentowy poszczególnych narządów w biodystrybucji przedstawia się następująco: w 3 godz. po podaniu i.v., wątroba 14%, tkanka tłuszczowa 15%, mięśnie 13%, nerki 2,5%, śledziona 0,3%, w 12 godz. – wątroba 41%, nerki 5%, tk.tłuszczowa 5%, śledziona 0,7% [21].

EFEKTY UBOCZNE PO PODANIU FOSFOTIOLOWYCH POCHODNYCH OLIGONUKLEOTYDÓW ANTYSSENSOWYCH

Oligomery antysensowe mogą działać toksycznie zarówno specyficznie, jak i niespecyficznie. Działanie specyficzne wynika z blokowania ekspresji genu, przeciwko któremu są skierowane nie tylko w komórkach chorych, ale też i w zdrowych. Efekt końcowy tego działania zależy od różnicy we wrażliwości na zniesienie ekspresji danego genu pomiędzy komórkami zdrowymi i chorymi. Efekt niespecyficzny wynika natomiast z ich działania jako związku chemicznego, nie występującego fizjologicznie w organizmie [42].

W badaniach toksykologicznych pochodne fosfotiolowe oligonukleotydów antysensowych podawano zwierzętom powtarzanymi dawkami 50–100 mg/kg dootrzewnowo [47], które skutecznie hamowały proliferację nowotworową we wcześniejszych badaniach *in vivo* [20,38,53].

U badanych zwierząt wystąpił spadek masy ciała, refleksu, aktywności psychomotorycznej oraz hipotermia, które to objawy nasilały się proporcjonalnie do dawki podanych oligomerów. Zarówno w badaniach przyżyciowych jak i autopsyjnych, najsilniejsze działanie uboczne stwierdzano w narządach o największym stopniu wchłaniania oligonukleotydów, tj. w wątrobie, nerkach, jak również w szpiku kostnym, gdzie przenikanie to jest stosunkowo niższe.

Zmiany w nerkach polegały na mało lub średnio nasilonym wieloogniskowym zwyrodnieniu cewek z towarzyszącą eozynofilią w niektórych cewkach krętych oraz na naciekach mononuklearnych i z komórek mieszanych w torebce śródmiąższu miedniczek. W żadnym z dotychczas przeprowadzonych badań nie monitorowano przyżyciowo parametrów wydolności nerek.

Wątroba zwierząt leczonych antysensami wykazywała niewielkie uszkodzenia, objawiające się powiększeniem narządu oraz 2–3-krotnym podwyższeniem poziomu transaminaz asparaginowej i alaninowej, bez enzymatycznych parametrów cholestazy i hiperbilirubinemii. W badaniu histo-patologicznym wykazano wieloogniskowe zwyrodnienie hepatocytów i/lub martwicę wraz z naciekami zapalnymi oraz wybitną hipertrofię i hiperplazję komórek Kupffera. W niektórych wypadkach komórki Kupffera wraz z krążącymi makrofagami tworzyły wybitne skupiska zatokowe i/lub nacyniowe (podśródnabłonkowe / okołonacyniowe). Stwierdzano również okołowrotne nacieki komórek jednojądrowych oraz hematopoezę pozaszpikową. Tak więc wzrost masy wątroby może być odbiciem nacieków zapalnych i przerostem komórek Kupffera, zmiany zaś morfologiczne korespondują z niewielkim wzrostem enzymów wątrobowych. Wydaje się więc, że choć wchłanianie oligomerów do wątroby sięga 42%, nie jest ona przez nie znamienne uszkodzana, a uszkodzenie to nie jest zależne od podanej dawki [21,47,58].

Również powiększenie śledziony może być spowodowane głównie przez ekspansję białej i czerwonej miazgi, która jest spowodowana hematopoezą pozaszpikową (linii erytrocytarnej, granulocytarnej, megakariocytarnej) i histiocytozą w czerwonej miazdze oraz grudkowym rozrostem limfoidalnym (komórki B) i rozrostem okołotętniczkowym (komórki T). Wraz ze zwiększeniem podanej dawki pojawiały się nacieki makrofagowe w torebce śledziony. Niektórzy badacze podkreślają, że zmiany te są charakterystyczne tylko dla niektórych sekwencji nukleotydów, podczas gdy inne nie powodują powiększenia śledziony [21].

Niezależnie od podanej dawki, u wszystkich zwierząt wystąpiła trombocytopenia [42,59], ze zwiększeniem objętości płytek, niewielką leukocytozą i granulocytozą. Zmiany te są odbiciem funkcji szpiku kostnego, gdzie stwierdzano zmniejszenie liczby megakariocytów oraz względny wzrost granulopoezy nad erytropoezą (co

koresponduje z pozaszpikową hematopoezą w wątrobie i śledzionie). Trombocytopenia wskazuje, że oligonukleotydy, upośledzając tworzenie płytek, działają jak inne polianiony (np. suramina, heparyna), które mogą wywołać trombocytopenię, zwłaszcza u chorych z uszkodzeniem szpiku w przebiegu chorób rozrostowych lub w wyniku wcześniejszej terapii [59]. Należy też zwrócić uwagę, że trombocytopenia utrzymywała się pomimo kompensacyjnej hematopoezy. Opisane zmiany wskazują, że szpik kostny jest jednym z narządów o największej wrażliwości na toksyczne działanie oligonukleotydów, pomimo względnie niskiej ich tam penetracji.

W nadnerczach stwierdzano niewielkie zmiany o charakterze zwyrodnienia, martwicy, zwłaszcza w warstwie siateczkowej kory, które były proporcjonalne do przyjętej dawki. Podobnie niewielkie zmiany obserwowano w grasicy, gdzie występowało zmniejszenie ilości tymocytów oraz limfoliza. W trzustce występowały śródmiąższowe i okołotrzustkowe nacieki makrofagowe, które pojawiły się niezależnie od dawki. W narządach jamy brzusznej oraz miednicy małej stwierdzono wieloogniskowe nacieki makrofagowe (wzdłuż całego przewodu pokarmowego, gruczołów płciowych, zwłaszcza najądrzy). W węzłach chłonnych sieci wystąpiła histocytoza zatokowa z limfolizą, natomiast skóra w miejscu iniekcji wykazywała również nacieki makrofagów. Powyższe zmiany wiąże się z podrażnieniem otrzewnej związanym z dootrzewnowym podaniem oligonukleotydów oraz mimowolnym ich podaniem śródskórnym podczas iniekcji i.p.

Zwiększenie dootrzewnowej dawki oligonukleotydów do 150 mg/kg masy ciała prowadziło do nasilenia się objawów ubocznych, co było przyczyną śmierci większości zwierząt w przeciągu 2–4 dni [1, 18]. Dawka 640 mg/kg powodowała zgon po kilku minutach [1, 18].

Badaniem autopsyjnym stwierdzano u tych zwierząt oprócz zmian opisywanych powyżej, które były bardziej nasilone, ciężkie uszkodzenie nerek i mięśnia sercowego, a także zmiany w innych narządach charakterystyczne dla ostrej reakcji na stres.

W nerkach stwierdzano rozległą martwicę kory (martwica kłębuszków i cewek z utratą błony podstawnej) i/lub ostrą martwicę cewek (bez zajęcia kłębuszków) z obecnością wałeczków szklistych i komórkowych, mineralizacją cewek i dużych obszarów krwotocznych, obejmujących większą część kory i rdzenia.

Zmiany w sercu polegały na wieloogniskowej martwicy ze zwapnieniami, co wskazywałoby na dokonany zawał. Płuca tych zwierząt wykazywały rozlane przekrwienie oraz, w niektórych przypadkach, płyn w jamie opłucnej przy braku w niej zmian zapalnych.

W wątrobie obserwowano atrofię hepatocytów, zaś w śledzionie dodatkowo limfolizę okołotętniczkową, która jest charakterystyczna dla terminalnych stanów wywołanych ostrym bodźcem (stressem). Na podstawie opisanych zmian uważa się, że przyczyną śmierci zwierząt, którym podawano bardzo duże dawki pochodnych fosfotiolowych oligonukleotydów antysensowych była ostra niewydolność nerek wywołana martwicą kory i/lub ostrą martwicą cewek. Nie jest jednak jednoznaczne

czy opisane zmiany morfologiczne mają charakter pierwotny czy wtórny, np. w wyniku wstrząsu kardiogenego, co mogą sugerować zmiany w mięśniu sercowym i płucach.

Należy też wspomnieć, że w jednym przypadku zwierzęcia leczonego niskimi dawkami fosfotiolowych oligomerów, nastąpiła śmierć w 5 dniu kuracji, w wyniku krwotoku do przewodu pokarmowego i dróg oddechowych, co wydaje się jednak być efektem małopłytkowości a nie bezpośrednim działaniem toksycznym na te układy [21].

PODSUMOWANIE

Obserwowane efekty uboczne oligonukleotydów antysensowych zależą nie tylko od dawki, gdyż w niektórych ośrodkach nie obserwowano efektów toksycznych po wstrzyknięciu 50–150 mg/kg [2]. Sugeruje to, że efekty uboczne mogą zależeć także od sekwencji oligonukleotydów i stopnia ich oczyszczenia, drogi podania oraz stanu zdrowia organizmu. Przeprowadzone badania dotyczące efektów ubocznych oligonukleotydów antysensowych wskazują na ich niską toksyczność w dawkach terapeutycznych, aczkolwiek wyniki te wymagają dalszego potwierdzenia. Badania te są nadal intensywnie prowadzone i nadal pozostaje do rozstrzygnięcia wiele kwestii, m.in. czy:

*Opisane zmiany są charakterystyczne dla określonej sekwencji oligomerów.

*Zmiany w narządach są zależne od drogi podania leku (opisano podawanie dużych dawek oligomerów podskórnym lub miejscowo, nie obserwując efektów toksycznych [2,23,67]).

*Zmiany te są charakterystyczne tylko dla pochodnych fosfotiolowych (ukazało się kilka opracowań dotyczących metylofosfonianowych pochodnych, które wykazują niewielkie efekty uboczne [63]).

*Uda się zsyntezować antysensy o dużo większym potencjale terapeutycznym (silniejsze działanie swoiste przy mniejszych efektach ubocznych).

Wyniki prowadzonych badań pozwalają mieć nadzieję, że oligonukleotydy antysensowe mogą okazać się skutecznymi i stosunkowo mało toksycznymi lekami przeciwnowotworowymi w praktyce klinicznej XXI wieku.

BIBLIOGRAFIA

- [1] AGRAWAL S, GOODCHILD J, CIVEIRA MP, THORNTON AH, SARIN PS, ZAMECNIK PC. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**:7079–7083.
- [2] AGRAWAL S, TEMSEMANI J, TANG JY. Pharmacokinetics, biodistribution and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7595–7599.

- [3] AGRAWAL S, TANG JY. GEM 91 – An antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate as a specific therapeutic agent for AIDS. *Antis Res Develop* 1992; **2**: 260–266.
- [4] BAYEVER E, IVERSEN P, SMITH L, SPINOLO J, ZON G. Guest editorial: Systemic human antisense therapy begins. *Antis Res Develop* 1992; **2**: 109–110.
- [5] BENETT MR, ANGLIN S, McEVAN JR, JAGOE R, NEVBY AC, EVAN GI. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest* 1993; **93**: 820–828.
- [6] CALABRETTA B, SIMS RB, VALTIERI M, CARACCILOLO D, SZCZYLIK C, VENRURELLI D, RATAJCZAK M, BERAN M, GEWIRTZ AM. Normal and leucemic hematopoietic cell manifest differential sensitivity to inhibitory effect of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides: An *in vivo* study relevant to bone marrow purging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2351–2355.
- [7] CALABRETTA B, SKÓRSKI T, ZON G. Antisense oligodeoxynucleotides. *Seminars in Cancer Biology* 1992; **3**: 391–398.
- [8] CARDOSO AA, LI MA, BATARD P, HATZFELD A, BROWN EL, LEVESQUE JP, SOOKEDO H, PANTERNE B, SANSIL VESTRINI P, CLARC SC, HATZFELD J. Release from quiescence of CD34⁺ CD38⁻ human umbilical cord blood cells reveals their potentiality of engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8707–8711.
- [9] CHIANG MY, CHAN H, ZOUNES MA, FREIER SM, LIMA WF, BENNETT CF. Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18162–18171.
- [10] CHIASSON BJ, HOOPER ML, MURPHY PR, ROBERTSON HA. Antisense oligonucleotide eliminates *in vivo* expression of *c-fos* in mammalian brain. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* 1992; **227**: 451–453.
- [11] CITRO G, PERROTTI D, CUCCO C, D'AGNANO SACCHI A, ZUPI G, CALABRETTA B. Inhibition of leukemia cell proliferation by receptor-mediated uptake of *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7031–7035.
- [12] CLARENC JP, DEGOLS G, LEONETTI JP, MILHAUD P, LEBLEU B. Delivery of antisense oligonucleotides by poly(L-lysine) conjugation and liposome encapsulation. *Anti Cancer Drug Design* 1993; **8**: 1–94.
- [13] COLLINS JF, HERMAN P, SCHUCH CH, BAGBY GC. *C-myc* antisense oligonucleotides inhibit the colony forming capacity of colo320 colonic carcinoma cells. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1523–1527.
- [14] COLMAN A. Antisense strategies in cell and developmental biology. *J Cell Sci* 1990; **97**: 399–409.
- [15] COWSERT LM, FOX MC, ZON G, MIRABELLI CHK. *In vitro* evaluation of phosphorothioate oligonucleotides target to the E2 mRNA of papillomavirus: Potential treatment for genital warts. *Antimicrob Agents and Chemother* 1993; **37**: 171–177.
- [16] GAO W, STORM C, EGAN W, CHENG Y. Cellular pharmacology of phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells. *Mol Pharm* 1992; **43**: 45–50.
- [17] GOODARZI G, WATABE M, WATABE K. Binding of oligonucleotides to cell membranes at acid pH. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **181**: 1343–1351.
- [18] GOODCHILD J, AGRAWAL S, CIVEIRA MP, SARIN PS, SUN D, ZAMECNIK PC. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5507–5511.
- [19] GRAY GD, HERNANDEZ OM, HEBEL D, ROOT M, POW-SANG JM, WICKSTORM E. Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by *c-Ha-ras* oncogene in nude mice. *Cancer Res* 1993; **342**: 254–255.
- [20] HIJIYA N, ZHANG J, RATAJCZAK MZ, DeRIEL K, HERLYN M, GEWIRTZ AM. The biologic and therapeutic significance of *c-Myb* expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4499–4503.

- [21] IVERSEN P, MATA J, TRACEWELL WG, ZON G. Pharmacokinetics of an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev from human immunodeficiency virus type 1 in the adult male rat following single injections and continuous infusion. *Antisense Res Dev* 1994; **4**:43–52.
- [22] IVERSEN PL, ZHU S, ZON G. Cellular uptake and subcellular distribution of phosphorothioate oligonucleotides into cultured cells. *Antisense Res Dev* 1992; **2**: 211–222.
- [23] IVERSEN P. *In vivo* studies with phosphorothioate oligonucleotides: rationale for systemic therapy. In: Croke ST, Lebleu B(eds) *Antisense Res Appl* 1993; 461–469.
- [24] KRIEG AM, GMELING-MEYLING F, GOURLEY MF, KISCH WJ, CHRISEY LA, STEINBERG AD. Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. *Antisense Res Dev* 1991; **1**:161–171.
- [25] LEVY Y, TSAPIS A, BROUET JC. Interleukin-6 antisense oligonucleotides inhibit the growth of human myeloma cell lines. *J Clin Invest* 1993; **88**:696–699.
- [26] LOKE SL, STEIN CA, ZHANG XH, MORI K, NAKANISHI M, SUBASINGHE C, COHEN JS, NECKERS LM. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3474–3478.
- [27] MAHER JL, WOLD B, DERVAN PB. Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation. *Science* 1989; **245**:725.
- [28] MARTI G, EGAN W, NOGUCHI P, ZON G, MATSUKURA M, BRODER S. Oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate fluxes and localization in hemopoietic cells. *Antisense Res Dev* 1992; **2**:27–39.
- [29] METHIA N, LOUACHE F, VAINCHENKER W, WENDLING F. Oligonucleotides antisense to the proto-oncogene *c-mpl* specifically inhibit *in vitro* megakaryocytopoiesis. *Blood* 1993; **82**: 1395–1401.
- [30] MILLER PS. Oligonucleotide methylphosphonates as antisense reagents. *Biotechnology* 1991; **9**:358.
- [31] MOFFAT AS. Triplex DNA finally comes of age. *Science* 1991; **252**: 1374–1375.
- [32] MORISHITA R, GIBBSON GH, ELLISON KE, NAKAJIMA M, ZHANG M, KANEDA Y, OGIHARA T, DZAU VJ. Single intraluminal delivery of antisense *cdc2* kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8474–8478.
- [33] MUKOPHADHYAY T, TAINSKY M, CAVENDER AC, ROTH JA. Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991; **51**: 1744–1748.
- [34] NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, RATAJCZAK MZ, CALABRETTA B, SKÓRSKI T. The role of *c-myc* protooncogene in chronic myelogenous leucemia. *Folia Histochem Cytobiol* 1994; **32**:35–40.
- [35] RASCHELLA G, NEGRONI A, SKÓRSKI T, PUCII S, NIEBOROWSKA -SKÓRSKA M, ROMEO A, CALABRETTA B. Inhibition of proliferation by *c-myb* antisense RNA and oligodeoxynucleotides in transformed neuroectodermal cell lines. *Cancer Res* 1992; **52**: 4221–4226.
- [36] RATAJCZAK MZ, LUGER SM, DeRIEL K, ABRAHM J, CALABRETTA B, GEWIRTZ AM. Role of the *KIT* protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 1710–1714.
- [37] RATAJCZAK MZ, LUGER S, GEWIRTZ AM. The *c-kit* protooncogene in normal and malignant human hematopoiesis. *Int J Cell Clon* 1992; **10**: 205–214.
- [38] RATAJCZAK MZ, KANT JA, LUGER SM, HIJIYA N, ZHANG J, ZON G, GEWIRTZ AM. *In vivo* treatment of human leucemia in a scid mouse model with *c-myb* antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11823–11827.

- [39] RATAJCZAK MZ, KUCZYNSKI W, ONODERA K, MOORE J, RATAJCZAK J, KREGENOW D, DeRIEL K, GEWIRTZ AM. A reappraisal of the role of Insulin Like Growth Factor (IGF-1) in the regulation of the human hematopoiesis. *J Clin Invest* 1994 (w druku).
- [40] RATAJCZAK MZ, URBANOWSKA E. Rola onkogenów w nowotworzeniu. *Pol Tyg Lek* 1988; **47**:753.
- [41] RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T. Potencjalne możliwości i perspektywy wykorzystania oligonukleotydów w onkologii klinicznej. *Pol Tyg Lek* 1991; **48**: 915–917.
- [42] RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T. Perspektywy wykorzystania antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej. *Post Biol Kom* 1994; **2**: 177–196.
- [43] REISS K, PORCU P, SELL C, PIETRZYKOWSKI Z, BASERGA R. The insulin like growth factor -1 receptor is required for the proliferation of hemopoietic cells. *Oncogene* 1992; **7**: 2243–2248.
- [44] RIODRAN ML, MARTIN JC. Oligonucleotide-based therapeutics. *Nature* 1991; **350**: 442–443.
- [45] ROSOLEN A.I WSP. Antisense of single copy N-myc expression results in decreased growth without reduction of c-myc protein in neuroepithelioma cell line. *Cancer Res* 1990; **50**: 6316.
- [46] SAISON-BEHMOARAS T, TOCQUE B, REY I, CHASSIGNOL M, THUONG NT, HELENE C. Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation include selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cell proliferation. *EMBO* 1991; **10**: 1111–1118.
- [47] SARMIENTO UM, PERES JR, BECKER JM, NARAYANAN R. *In vivo* toxicological effects of rel A antisense phosphorothioates in CD-1 mice. *Antisense Res Dev* 1994; **4**: 99–107.
- [48] SIMONS M, EDELMAN ER, DeKEYSER JL, LANGER R, ROSENBERG RD. Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation *in vivo*. *Nature* 1992; **359**: 67–70.
- [49] SKÓRSKI T, SZCZYLIK C, RATAJCZAK MZ, MALAGUARNERA L, GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. Growth factor-dependent inhibition of normal hematopoiesis by N-ras antisense oligodeoxynucleotides. *J Exp Med* 1992; **175**: 743–750.
- [50] SKÓRSKI T, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, BARIETTA C, MALAGUARNERA L, SZCZYLIK C, CHEN ST, LANGE B, CALABRETTA B. Highly efficient elimination of Philadelphia leucemic cells by exposure to *bcr/abl* antisense oligodeoxynucleotides combined with mafosfamide. *J Clin Invest* 1993; **92**:194–202.
- [51] 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 hematopoiesis. *J Exp Med* 1993; **178**: 1923–1933.
- [52] SKÓRSKI T, KANAKARAJ P, KU DH, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, CANAANI E, PERUSSIA B, CALABRETTA B. Negative regulation of p120 GAP GTPase promoting activity by p210 *bcr-abl*: implication for RAS dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 1994 (w druku)
- [53] SKÓRSKI T, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, NICOLAIDES N, SZCZYLIK C, IVERSEN P, IOZZO RV, ZON G, CALABRETTA B. Suppression of Philadelphia leucemia cell growth in mice by *bcr-abl* antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; (w druku)
- [54] SKÓRSKI T, NIEBOROWSKA-SKÓRSKA M, CAMPBELL K, IOZZO RV, ZON G, DARZYNKIEWICZ Z, CALABRETTA B. Leukemia treatment in SCID mice by antisense oligonucleotides targeting cooperating oncogenes. Submitted.
- [55] SMALL D, LEVENSTEIN M, KIM E, CAROW C, AMIN S, ROCKWELL P, WITTE L, BURROW CH, RATAJCZAK MZ, GEWIRTZ AM, CIVIN CI. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34⁺ human bone marrow cell and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 459–463.
- [56] SMITH CC, AURELIAN L, REDDY M, MILLER PS, HOWLEY PM. Antiviral effect of an oligo (nucleotidemethylphosphonate) complementary to the splice junction of herpes simplex virus type 1 immediate early pre-mRNAs 4 and 5. *Biochemistry* 1986; **83**: 2787–2791.

- [57] SPEIR E, EPSTEIN SE. Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Circulation* 1992; **86**: 538–547.
- [58] STEIN CA, COHEN JS. Phosphorothioate oligodeoxynucleotide analogues. In: Oligodeoxynucleotides. Antisense inhibitors of gene expression. (Cohen JS, ed) Basingstoke, The Macmillan Press Ltd. 1989; 97–117.
- [59] STEIN CA, CHENG YC. Antisense oligonucleotide as therapeutic agents – is the bullet really magical? *Science* 1993; **261**: 1004–1012.
- [60] STEIN CA. Antisense oligonucleotides – promises and pitfalls. *Leucemia*. The Macmillan Press Ltd 1992; **10**: 967–974.
- [61] SZCZYLIK C, SKÓRSKI T, NICOLAIDES N, MANZELLA L, MALAGUARNERA L, VENTURELLI D, GEWIRTZ AM, CALABRETTA B. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by *bcr-abl* antisense oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; **253**: 562–565.
- [62] TEMSAMANI J, KUBERT M, TANG J, PADMAPRIYA A, AGRAWAL S. Cellular uptake of oligodeoxynucleotide phosphorothioates and their analogs. *Antisense Res Dev* 1994; **4**: 35–42.
- [63] TROJAN J, JOHNSON THR, RUDIN SD, ILAN J, TIKOCINSKI M, ILAN J. Treatment and prevention of glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense Insuline-like growth factor-1 RNA. *Science* 1993; **259**: 94–96.
- [64] UHLMAN E, PEYMAN A. Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle. *Chemical Rev* 1990; **90**: 543–584.
- [65] WAHLENSTEDT C, MERLO E, PICH M, KOOB GF, YEE F, HEILIG M. Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligonucleotides. *Science* 1993b; **259**: 528–531.
- [66] WATSON PH, PON RT, SHIU RPC. Inhibition of *c-myc* expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for *c-myc* in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1991; **51**: 3996–4000.
- [67] WHITESELL L, ROSOLEN A, NECKERS LM. *In vivo* modulation of N-myc expression by continuous perfusion with antisense oligonucleotide. *Antisense Res Dev* 1991;
- [68] WICKSTORM EL, BACON TA, GONZALEZ A, FREEMAN DL, LYMAN GH, WICKSTORM E. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and *c-myc* protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against *c-myc* RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **52**: 6741–6745.
- [69] WOOLF TM, JENNINGS CGB, REBAGLIATTI M, MELTON DA. The stability, toxicity and effectiveness of unmodified phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in *Xenopus* oocytes and embryos. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**: 1768–1769.
- [70] YAKUBOW L, KHALED Z, ZHANG LM, TRUNEN A, VLASSOV V, STEIN CA. Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18818–18823.
- [71] YASWEN P, STAMPFER MR, GROSH K, COHEN J. Effects of sequence of thioated oligonucleotides on cultured human mammary epithelial cells. *Antisense Res Dev* 1993; **3**: 67.
- [72] ZON G. Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharm Res* 1988; **5**: 539–549.

Otrzymano: 15.12.1995 r.

Przyjęto: 25.07.1995 r.

Adres autora: Klinika Gastroenterologii Pomorskiej Akademii Medycznej
71-844 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1

<http://rcin.org.pl>

RECENZJE

Cell Culture in Pharmaceutical Research. N. E. Fusenig, H. Graf (eds), Ernst Schering Research Foundation, Workshop 11. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong-Kong, Barcelona, Budapest, 1995 ISBN 3-540-58141-3.

Technika hodowli tkanek poczyniła ogromne postępy w ciągu dwóch ostatnich dziesięcioleci i zyskuje coraz szersze zastosowanie niemal we wszystkich dziedzinach nauk przyrodniczych: od biologii komórki poprzez biologię molekularną do biotechnologii i zastosowania w hodowli roślin i zwierząt. Bogata już literatura w tej dziedzinie wzbogaciła się ostatnio o wartościową pozycję "*Cell Culture in Pharmaceutical Research*". Książka zawiera obszerne referaty wygłoszone przez wybitnych specjalistów w naukach podstawowych i klinicznych na 11 Konferencji Warsztatowej Fundacji Ernsta Scheringa. Organizatorzy wyszli na przeciw pytaniom ostatnich czasów, w jakim stopniu model kultur tkankowych zdolny jest zastąpić badania prowadzone *in vivo* na żywych zwierzętach. Dobór prelegentów miał zapewnić odpowiedzi na te pytania.

Książka zawiera 13 wykładów prezentujących zastosowanie modeli badawczych użytecznych w badaniach różnicowania się monocytów *in vitro*, roli komórek pnia w kardiogenezie i miogenezie, badaniach złącz szczelinowych bariery krew-mózg i karcinogenezy. Zawiera modele hodowli komórek nowotworowych do badań parakrynowych i autokrynowych mechanizmów wzrostu w przerzutach nowotworowych, modele badania angiogenezy, modele hodowli komórek przysadki do badań regulacji syntezy i wydzielania gonadotropin przez gonadalne steroidy, modele kokultury komórek gruczołowych endometrium i komórek stromalnych do badania modulacji działania progesteronu na białka wydzielane wektorialnie.

Hodowla tkanek jest metodą atrakcyjną, bowiem oferuje określone i dające się kontrolować systemy biologiczne do badania podstawowych mechanizmów fizjologicznych oraz proponuje metody rutynowe powtarzalne i tańsze niż eksperymenty przeprowadzane na zwierzętach.

Szczególą wartość ma artykuł wprowadzający N. E. Fuseniga, w którym autor ocenia rosnące zapotrzebowanie farmakotoksykologii na testy oparte na technice hodowli tkanek wynikające z legislacyjnych restrykcji rządów i Unii Europejskiej ograniczających eksperymentowanie na zwierzętach. Autor ocenia krytycznie badania na liniach komórkowych tworzących model dostarczający wyników, które bywają nieporównywalne do sytuacji *in vivo*. Wyżej ceni hodowle pierwotne, porównywalne ze stanem *in vivo*, jeżeli obserwacje dotyczą stosunkowo krótkiego czasu od ekspancji tkanki, ocenia też wartość hodowli komórek imortalizowanych i organotypowych. Omawia bardziej szczegółowo ekwiwalentny model skóry jako przykład fizjologicznego systemu organotypowego *in vitro*. Kokultura keratynocytów na matrix z kolagenu I z fibroblastami zakotwiczonymi w teże matrix stwarza warunki

organotypowego rozwoju różnych rodzajów komórek skóry. Obecnie jest to optymalny model badania wzrostu i różnicowania się prowadzący do wytworzenia wielowarstwowego nabłonka o cechach strukturalnych i czynnościowych naskórka *in vivo*. Model taki jest także dobrym narzędziem badania interakcji komórek nabłonkowych i mezenchymalnych z udziałem cytokin i czynników wzrostu. Szczegóły dotyczące skonstruowania tego modelu i jego funkcjonowania oraz zastosowania go w badaniach karcinogenezy komórek ludzkich opisano w rozdziale 6 omawianej książki.

Badanie miogenezy i kardiogenezy oparte na kulturach komórek macierzystych wężła zarodkowego mysiej blastocysty pozwala obserwować różnicowanie się mio-cytów i badanie znaczenia i wpływu na kardiogenezę interakcji komórkowych i czynników wzrostu, takich jak: FGF, TGF beta, IGF, jak również białek substancji międzykomórkowej, takich jak: fibronektyna, vitronektyna, kolagen i laminina. System opisany w rozdziale 3 może być bardzo użyteczny w badaniach farmakologicznych leków chronotropowych, jak również w badaniach czynników kardiotoxycznych w czasie embriogenezy *in vitro*. Wykład 8 prezentuje model użyteczny w badaniach poszczególnych etapów angiogenezy, jak również mechanizmów kierujących tym procesem. Metody te dostarczają niedrogich i efektywnych testów alternatywnych przydatnych także dla skringingu oraz identyfikacji i oczyszczania nowych czynników angiogenicznych.

Mahfoudi i wsp. w referacie 10 prezentują bardzo interesujący model kokultury w komorze dwuprzediałowej komórek nabłonkowych endometrium i komórek stromy otaczających gruczoły endometrialne. System ten wykluczający bezpośredni kontakt 2 różnych typów komórek sprawdza się w badaniach interakcji parakrynowych. Kultury komórek przysadki, komórek warstwy ziarnistej jajnika i nowotworów gruczołu mlekowego są wygodnymi, pewnymi, sprawdzonymi *in vivo* modelami badania regulacji wydzielania gonadotropin, proliferacji i różnicowania się oraz dynamiki receptorów steroidowych. Fuseing akcentuje w swym wykładzie znaczenie "fizjologii *in vitro*" dla oceny wyników uzyskanych w hodowli tkankowej i ich interpretacji. Zwraca uwagę na częste ignorowanie faktu, że liczne systemy *in vitro* stosowane obecnie są tylko modelami rzeczywistego stanu biologicznego i dlatego wyniki uzyskane przy ich pomocy nie zawsze można przenosić bezpośrednio na sytuację *in vivo*. Prezentowane w książce modele były sprawdzane i porównywane z wynikami uzyskanymi *in vivo*. Wszystkie opisywane modele oparte są na konkretnych badaniach naukowych oraz uzasadnione szeroko i wnikliwie także teoretycznie. Ponadto książka informuje o kierunku i tendencjach rozwoju techniki hodowli tkanek w odpowiedzi na wymagania stawiane przez rozwój nowoczesnej biologii i medycyny. Książka jest warta polecenia nie tylko zespołom farmakologicznym, lecz także wszystkim instytucjom naukowym: biologicznym, medycznym i zootechnicznym stosującym w badaniach technikę hodowli tkanek.

Stanisława Stokłosowa

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek
Zakładu Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii UJ

KOMUNIKATY

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1995 i 1996, za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content.

Wysokość nagrody w 1995 i 1996 r. wyniesie 60 NZŁ.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 34-03-44, fax 3404470

Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- * **1.** Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- * **2.** Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- * **3.** Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- * **4.** Preferowane będą prace młodych autorów.
- * **5.** Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- * **6.** Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- * **7.** Pracę należy składać do do 15 października każdego roku w Zarządzie Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 .
- * **8.** Ocena kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- * **9.** Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postępie Biologii Komórki".
- * **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

XXV Konferencja szkoleniowa z zakresu biologii komórki

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików, Komitet Patofizjologii Komórki PAN oraz Redakcja Postępów Biologii Komórki organizują doroczną

XXV konferencję szkoleniową z zakresu biologii komórki na temat "Postępy badań DNA" w dniu 18 listopada (sobota) 1995 r. w Warszawie.

Obrady odbędą się w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w "Anatomicum" Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5.

Opłata za uczestnictwo 4 NZŁ płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymają suplement 5 PBK zawierający pełne materiały konferencji.

Program konferencji:

10.00–10.10 Otwarcie konferencji

10.10–10.50 **Nowopoznane mechanizmy regulacji informacji genetycznej** –
prof. dr hab. J. Barciszewski (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
Poznań)

10.50–11.30 **Synteza oligonukleotydów adresowanych do badań biologii molekularnej** –
doc. dr hab. A. Kraszewski (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN,
Poznań)

11.30–12.10 **DNA organelli komórkowych** – *prof. dr hab. H. Augustyniak* (Instytut Biologii Molekularnej UAM, Poznań)

12.10–12.30 Przerwa

12.30–13.10 **Diagnostyka molekularna** – *prof. dr hab. R. Słomski* (Zakład Genetyki Człowieka PAN i Katedra Biochemii i Biotechnologii AR, Poznań)

13.10–13.50 **Wykorzystywanie technologii transferu genu w celach terapeutycznych** – *prof. dr hab. J. Nowak* (Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań)

13.50–14.30 **Powtórzenia DNA** – *dr J. Kwiatkowska* (Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań)

Uczestnikom konferencji zostaną również udostępnione po niższej cenie zeszyty "Postępów Biologii Komórki".

Organizatorzy

Warszawa, październik 1995 r.

NR 1

W tym Zeszytcie • Postępów Biologii Komórki •	1
Komunikaty	2
SŁOMCZYŃSKA M.: Receptory hormonów steroidowych – budowa i funkcja	3
GOŁĄB J., ZAGOŹDŻON R.: Terapia genowa – wprowadzanie genów do komórek	23
MOSTOWSKA A., GWÓDŹ E. A.: Reakcje aparatu fotosyntetycznego na stres oksydacyjny	43
BILIŃSKA B.: Kortykoliberyna (CRF) lokalnym regulatorem funkcji komórek Leydiga ssaków	65
WILCZYŃSKI G.: Ultrastrukturalne i molekularne aspekty ekspresji jąderkowych genów rRNA	73

NR 2

W tym zeszytcie • Postępów Biologii Komórki •	101
ADLER G.: Białka wiążące GTP jako uniwersalny przekaźnik sygnałów	103
BARCZYK A.: Cytogenetyka męskiej gametogenezy. Część 1. Translokacje wzajemne	113
RATAJCZAK M. Z., HAŁASA M., KUCZYŃSKI W.I.: Udział ligandu receptora STK-1 (FLK2/FLT3) w regulacji ludzkiej i mysiej hematopoezy	131
ZAPOROWSKA H.: Rola wanadu w metabolizmie komórki zwierzęcej	149
JANECZKO K.: Udział astrocytów w powstawaniu blizny pourazowej w ośrodkowym układzie nerwowym. I. Ekspresja białek cytoszkieletowych jako przejaw reakcji na uszkodzenie	167
ZIAJA M.: Mikroglej: makrofagi ośrodkowego układu nerwowego	181
TERLIKOWSKI S., NOWAK H.F., ŁOTOCKI W.: Wpływ czynnika martwicy nowotworu na komórki śródbłónka naczyń	197

NR 3

W tym Zeszytcie • Postępów Biologii Komórki •	202
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
LIBIK 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

NR 4

W tym zeszytcie • Postępów Biologii Komórki •	343
DYBOWSKA U., SOBOTA A.: Metody wprowadzania makrocząsteczek do komórek	345
OLAS B., WACHOWICZ B.: Aktywacja płytek krwi; mechanizm przekazywania sygnałów	359
DULLIN P., SCHNEIDER Z., WALERYCH W.: Przedwczesna terminacja transkrypcji genów klasy II i jej zapobieganie	379
JUNGERMAN M.: Locus minisatelitarny przy genie insuliny a podatność na cukrzycę insulinozależną	395
ROLIŃSKI J., DMOSZYŃSKA A.: Monitorowanie resztkowej choroby białaczkowej	407
BIAŁEK A., SKÓRSKI T.: Efekty uboczne po podaniu parenteralnym oligonukleotydów antysensownych	415
Recenzje	427
Komunikaty	428

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 przysyłać 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, poprawionego 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 stronę 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, opisy 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

nie

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została

wysłana do innej redakcji.

tak

nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak

nie

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

tak

nie

pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak

nie

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 redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpis

TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	343
DYBOWSKA U., SOBOTA A.: Metody wprowadzania makrocząsteczek do komórek	345
OLAS B., WACHOWICZ B.: Aktywacja płytek krwi; mechanizm przekazywania sygnaliów	359
DULLIN P., SCHNEIDER Z., WALERYCH W.: Przedwczesna terminacja transkrypcji genów klasy II i jej zapobieganie	379
JUNGERMAN M.: Locus minisatelitarny przy genie insuliny a podatność na cukrzyce insulinozależną	395
ROLIŃSKI J., DMOSZYŃSKA A.: Monitorowanie resztkowej choroby białaczkowej	407
BIAŁEK A., SKÓRSKI T.: Efekty uboczne po podaniu parenteralnym oligonukleotydu antysensownych	415
Recenzje	427
Komunikaty	428

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 for 1996 should be placed at local press distributors or directly at 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 US dollars.

Indeks 369705