

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 24 NR-2'97**  
(97-300)

# 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.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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 – Editorial Office: *Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 340 344, fax 340470.*

Recenzenci rocznika PBK są publikowani w zeszycie 4.

Referees of the volume are published in issue 4.

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

*Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.*

Ark. wyd. 15,0 Ark. druk. 12,75. Podpisano do druku w kwietniu 1997 r. Druk ukończono w maju 1997 r.

## W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Po raz pierwszy publikujemy artykuł (patrz strona 99) o zdolności roślin do obrony przed patogenami. W obronę zaangażowane są roślinne geny odporności. Ich produkty białkowe mają domeny powtórzeń bogatych w leucynę (LLR). Białka te są aktywowane przez elicytory, cząsteczki sygnałne.
- Cząsteczki adhezyjne odgrywają kluczową rolę w rozwoju zarodkowym oraz w procesach histogenezy i organogenezy (artykuł na stronie 145). Ich kontrolowana ekspresja warunkuje prawidłowe ukształtowanie złożonej architektury tkanek, w tym tkanki nerwowej.
- Powstawanie, migracje i różnicowanie komórek grzebienia nerwowego wyczerpująco omówiono w dwóch kolejnych artykułach na stronie 259 i 279. Udział cząsteczek adhezyjnych w tych procesach jest oczywisty.
- Osiągnięcia dokonane w charakteryzowaniu podklasy RNA występującego w jąderkach Eukariota – niskocząsteczkowych jąderkowych RNA (snoRNA) opisano na stronie 227. Kilka rodzajów snoRNA jest wykorzystywanych w obróbce rybosomowego RNA. Przedstawiono też inne postulowane funkcje tej klasy RNA.



# MOLEKULARNE PODSTAWY ODPORNOŚCI ROŚLIN NA CHOROBY; STRUKTURA I FUNKCJA ROŚLINNYCH GENÓW ODPORNOŚCI

## MOLECULAR BASIS OF RESISTANCE TO DISEASE IN PLANTS; STRUCTURE AND FUNCTION OF PLANT DISEASE RESISTANCE GENES

Przemysław LEHMANN

Pracownia Inżynierii Genetycznej, Instytut Genetyki Roślin,  
Polska Akademia Nauk, Poznań

*Streszczenie:* Znaczny postęp, jaki osiągnięto w poznawaniu mechanizmu odporności roślin na choroby powodowane przez patogeny, obejmuje także poznanie struktury i funkcji genów odporności. Klonowanie genów kodujących białka, które warunkują ujawnienie się u roślin cechy odporności na choroby powodowane przez patogeny o całkowicie różnych cyklach życiowych (wirusy, bakterie i grzyby), wykazało, że kodowane przez nie białka posiadają szereg charakterystycznych wspólnych domen. Poznanie struktury i mechanizmu funkcjonowania tych domen może ułatwić odpowiedź na pytania: jak sygnały pochodzące z patogenów docierają do produktów genów odporności i czy to współdziałanie jest kluczowe dla zainicjowania szlaku transdukcji sygnałów w roślinie po infekcji patogena.

*Słowa kluczowe:* choroby roślin, odporność, hipoteza gen-na-gen, geny odporności (R), reakcja nadwrażliwości, geny awirulencji, receptor, elicytor.

*Summary:* Considerable recent advances in the knowledge of the plant defence mechanism concerns also the isolation and characterization of resistance genes against bacterial, fungal and viral pathogens. Molecular cloning of these genes that enable plants to resist a diverse range of pathogens has revealed that the proteins encoded by these genes have several features in common. These features prompt the question of how the corresponding signal of pathogen reaches product of resistance genes or whether product of resistance genes are partners in a signal transduction cascade and indirectly perceive the pathogen signal.

*Key words:* plant diseases, resistance, hypersensitivity response, gene-for-gene concept, resistance genes (R), avirulence genes, receptor, elicitor.

*Wykaz skrótów:* **HR** (*hypersensitive response*) – reakcja nadwrażliwości, **LRR** (*leucine-rich repeats*) – powtórzenia bogate w leucynę, **białka PR** (*pathogenesis-related proteins*) – białka indukowane w następstwie infekcji patogena, **NBS** (*nucleic-binding site*) – miejsce wiązania nukleotydów, **AFT** – aktywne formy tlenu.

## WSTĘP

Według definicji Gaeumanna – choroba rośliny to proces patologiczny, spowodowany przez czynniki zewnętrzne, którego istotą jest długotrwałe zakłócenie funkcji fizjologicznych rośliny, ujawniające się w postaci zmian chorobowych i zagrażające egzystencji bądź normalnemu rozwojowi całej rośliny lub jej części [28]. Zachorowania roślin są następstwem zakażenia i opanowania podatnego żywiciela przez infekcyjny czynnik chorobotwórczy (wirusy, bakterie, nicienie i grzyby). Rozwój choroby zależy od rośliny i typu patogena i można go podzielić na trzy fazy: infekcję, inkubację i chorobę właściwą. Infekcja rozpoczyna się w momencie przeniknięcia patogena do wnętrza zaatakowanej rośliny, w efekcie czego dochodzi do nawiązania kontaktu pasożytniczego pomiędzy żywicielem i patogenem. Inkubacja jest etapem, podczas którego patogen dostosowuje swój metabolizm do metabolizmu gospodarza. Czasami dochodzi również do modyfikacji pewnych etapów metabolizmu rośliny do wymogów narzuconych przez patogen. Ostatnim etapem rozwoju zachorowania u roślin jest właściwa choroba polegająca na namnażaniu się patogena kosztem żywiciela, co objawia się widocznymi zmianami patologicznymi gospodarza, w szczególnych przypadkach prowadzących do jego śmierci.

Przedmiotem niniejszej pracy jest struktura i funkcja roślinnych genów odporności. Geny te kodują białka zdolne do zapoczątkowania reakcji obrony rośliny na atak patogenów przez uruchomienie szlaku przenoszenia sygnałów biologicznych od miejsca pierwotnego kontaktu komórek roślinnych z patogenem do jądra, doprowadzając w rezultacie do wywołania w roślinie reakcji obronnej.

## 1. GENETYCZNE PODSTAWY NIEKOMPATYBILNEGO WSPÓŁDZIAŁANIA ROŚLINA – PATOGEN

Jeżeli dochodzi do kontaktu rośliny z potencjalnym patogenem, możliwy jest:

- (1) rozwój choroby wywołanej przez patogen,
- (2) indukcja reakcji obronnej lub
- (3) nie obserwuje się żadnej z tych reakcji.

Jeżeli patogen rozpozna roślinę i uzna ją za gospodarza, a roślina nie ma systemu obronnego specyficznego wobec atakującego patogena, dochodzi do współdziałania

zwanego współdziałaniem kompatybilnym, którego konsekwencją jest choroba gospodarza. Jeżeli natomiast roślina rozpoznaje patogen i ma system obronny specyficzny wobec atakującego patogena, dochodzi do kontaktu roślina-patogen zwanego współdziałaniem niekompatybilnym. Roślina zdolna do takiej odpowiedzi opóźnia lub całkowicie wstrzymuje rozwój choroby. O trzecim typie relacji między rośliną i patogenem mówimy wówczas, gdy patogen nie rozpoznaje w danej roślinie gospodarza.

Genetyczne podstawy odporności roślin na choroby zostały opisane przez Flora [26,27], który prowadził badania nad patosystemem: len/grzyb *Melampsora lini*. Odporność lnu na grzyba *Melampsora lini* jest związana z obecnością pary genów; jednego w genomie gospodarza, drugiego w genomie patogena.

W tabeli 1 zilustrowano niekompatybilne współdziałanie między loci gospodarza i patogena. Dominujący gen odporności gospodarza (*R*) współdziała z dominującym genem awirulencji patogena (*V*), co jak wspomniano powyżej, wywołuje kontakt zwany niekompatybilnym. Brak albo dominującego allelu odporności w genomie roślinnym, albo genu awirulencji u patogena, wywołuje kontakt zwany kompatybilnym, prowadząc do powstania w roślinie stanu patologicznego określanego jako choroba. Produkt awirulentnego allelu patogena jest rozpoznawany przez produkt allelu odporności gospodarza, a rozpoznanie indukuje szereg reakcji obronnych u gospodarza, co prowadzi w efekcie do ujawnienia się fenotypu odpornego [26,27]. Dotąd opisano liczne przykłady patosystemów opierających się na modelu gen-na-gen dla patogenów wewnątrzkomórkowych, np. wirusów, jak i międzykomórkowych, takich jak: grzyby i bakterie. Ta różnorodność sugeruje, że identyczne lub co najmniej podobne mechanizmy rozpoznania i reakcji na infekcję patogena są związane z różnymi grupami organizmów patogenicznych i z różnymi gatunkami roślin.

Tabela 1. Niekompatybilne współdziałanie rośliny - patogen (hipoteza gen-na-gen, [26,27]): + = podatny, - = odporny, R = odporność, r = podatność, V = awirulencja i v = wirulencja

Genotyp patogena	Genotyp gospodarza		
	RR	Rr	rr
VV	-	-	+
Vv	-	-	+
vv	+	+	+

## 2. ROŚLINNE GENY ODPORNOŚCI (*R*)

### 2.1. Charakterystyka ogólna

Wysiłki podjęte w ostatnich dwóch latach doprowadziły do zmapowania i sklonowania szeregu roślinnych genów odporności. Poznanie struktury i funkcji ich produktów białkowych jest istotne dla zrozumienia mechanizmu molekularnego

reakcji obronnych roślin przeciw infekcjom powodowanym przez patogeny [10,81]. Najprawdopodobniej produkty większości genów odporności specyficznie rozpoznają produkty genów awirulencji przenoszonych przez patogeny, a ich interakcja, co założono w modelu gen-na-gen [26,27], inicjuje proces przeniesienia sygnałów, prowadzący w konsekwencji do specyficznie skierowanej odpowiedzi obronnej komórek rośliny zaatakowanej przez patogen.

Na podstawie struktury i lokalizacji produktów białkowych, roślinne geny odporności dzielą się na cztery grupy. Pierwsza grupa obejmuje geny kodujące białka występujące w cytoplazmie o własnościach kinaz serynowo/treoninowych. Geny należące do tej grupy zostały zmapowane na chromosomie 5 pomidora [57,60]. Do drugiej grupy roślinnych genów odporności należą te, które kodują białka związane z membranami, zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Obecność tych struktur sugeruje, że w trakcie ich współdziałania z produktami genów awirulencji patogena może dochodzić do bezpośredniej interakcji typu białko/białko. Grupa ta skupia około 10 genów zlokalizowanych w locus *Cf* genomu pomidora [6,21] oraz gen *L6* pochodzący z genomu *lnu* [25]. Do trzeciej grupy roślinnych genów odporności zalicza się geny kodujące białka funkcjonujące w cytoplazmie i zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Grupa ta obejmuje geny locus *RPS* zmapowane na chromosomie 4 *Arabidopsis thaliana* [3,63], gen *Rpg1* zlokalizowany w genomie *soi* [1], gen *Prf* zlokalizowany w locus *Pto* u pomidora [78] oraz gen *N* zmapowany w genomie tytoniu [88]. Czwartą grupę genów odporności stanowią geny, które kodują białka związane z membranami posiadające domeny charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych, a równocześnie powtórzenia bogate w leucynę. Do tej kategorii genów zaliczamy gen *Xa21* zmapowany na chromosomie 11 ryżu [80].

W tabeli 2 zamieszczono podstawowe dane na temat wybranych roślinnych genów odporności. Wyszczególnione geny warunkują ujawnianie się fenotypu odpornego w przypadku ataku patogenów o różnych cyklach życiowych (np. grzyby, bakterie, wirusy). Obserwowana wysoka homologia sekwencji aminokwasowych i obecność charakterystycznych domen w strukturze produktów białkowych niektórych z tych genów sugeruje możliwość podobnego mechanizmu molekularnego indukcji reakcji obronnych. Wyjaśnienie roli charakterystycznych domen produktów genów odporności, w interakcji tych białek z białkami kodowanymi przez geny awirulencji patogena prowadzącej do zapoczątkowania szlaku transdukcji sygnałów będzie przedmiotem dalszej części tej pracy.



Tabela 2. Ogólna charakterystyka wybranych roślinnych genów odporności

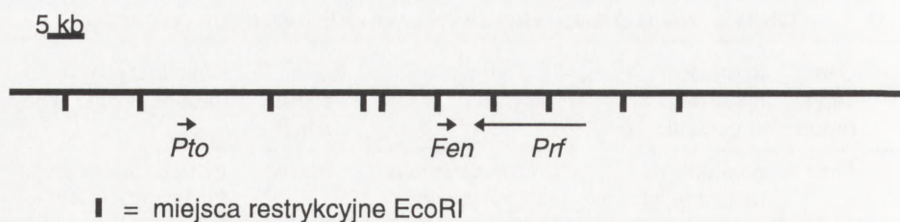
Grupa	Gen odporności	Roślina, lokalizacja w genomie	Patogen	Gen awirulencji	Charakterystyka produktu genu R
I	<i>Pto</i>	pomidor, locus <i>Pto</i> , chromosom 5	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>avrPto</i>	cytoplazma, domena kinazy SER/TREO
II	<i>Cf-2</i>	pomidor, chromosom 6,	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr2</i>	membrana, LRR, receptor transmembranowy
	<i>Cf-9</i>	pomidor, chromosom 1,	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr9</i>	receptor transmembranowy.
	<i>L6</i>	len	<i>Melampsora lini</i>		membrana, LRR, NBS, receptor transmembranowy
III	<i>Rps2</i>	rzodkiewnik, ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ), chromosom 4,	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>avrRpt2</i>	cytoplazma, LRR, NBS, zamek leucynowy
	<i>Rpm1</i> ( <i>Rps3</i> )	rzodkiewnik, ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ), chromosom 3,	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>avrRpm1</i> , <i>avrB</i>	cytoplazma, LRR, NBS
	<i>Rpg1</i>	soja	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>avrB</i>	
	<i>Prf</i>	pomidor	<i>Pseudomonas syringae</i>		cytoplazma, LRR, NBS, zamek leucynowy,
	<i>N</i>	tytoń	wirus TMV	<i>cp</i>	cytoplazma, LRR, receptor wewnątrzkomórkowy
IV	<i>Xa21</i>	ryż, chromosom 11,	<i>Xanthomonas oryzae</i>		membrana, LRR, domena kinazy SER/TREO

## 2.2 Szczegółowa charakterystyka wybranych roślinnych genów odporności i ich produktów białkowych jako pierwotnych składowych szlaku transdukcji sygnałów prowadzących do wywołania reakcji obronnej rośliny

### 2.2.1 Roślinne geny odporności kodujące białka zawierające domeny kinaz serynowo/treoninowych (Grupa I)

#### 2.2.1.1 Grupa genów *Pto*

Pierwszym roślinnym genem odporności należącym do tej grupy, który został zidentyfikowany w genomie pomidora, był gen *Pto* [60]. Gen *Pto* koduje białko o funkcji kinazy serynowo/treoninowej, której obecność w komórkach pomidora warunkuje uruchomienie reakcji obronnej po ataku bakterii *Pseudomonas syringae* przenoszących gen awirulencji *avrPto* [57,60,73,74,91]. Identyfikację i klonowanie



Rys. 1 Fizyczna mapa locus *Pto* genomu pomidora [78; rys.1]

genu *Pto* przeprowadzono metodą mapowania pozycyjnego z wykorzystaniem markera RFLP. Gen *Pto* jest częścią dużego locus (locus *Pto*) zawierającego od 5–7 genów zlokalizowanych na chromosomie 5 pomidora (rys. 1). Wszystkie geny znajdujące się z tym locus wykazują wysoki stopień homologii w stosunku do genu *Pto* [61].

Jednym z tych homologów jest gen *Fen* warunkujący odporność pomidorów na herbicyd – fention [57,61,73]. Podobieństwo między objawami nekrozy indukowanej przez fention a objawami charakterystycznymi dla reakcji nadwrażliwości (HR) indukowanej przez patogen może sugerować, że fention jest strukturalnie podobny do cząsteczki elicytora wytwarzanej przez gen awirulencji bakterii *Pseudomonas syringae* [61]. Z badań prowadzonych w warunkach *in vitro* wynika, że zarówno białko PTO, jak i FEN są kinazami białkowymi oraz że zamiana reszty lizynowej na resztę glutaminową w miejscu wiążącym grupę fosforanową (subdomena II) powoduje utratę aktywności kinazowej tych białek [57]. Porównanie sekwencji aminokwasów (w rejonie subdomen VIb i VIII biorących udział w rozpoznawaniu właściwych aminokwasów) wskazuje, że zarówno białko PTO, jak

i FEN, to kinazy serynowo/treoninowe (tab. 3). Białka te zawierają w tych kluczowych pozycjach reszty lizyny (K) i asparaginy (N), w przypadku subdomeny VIb, a reszty prolinowe (P) i reszty kwasu glutaminowego (E), w przypadku subdomeny VIII [60,61].

Mechanizm, jakim białko PTO (i FEN) rozpoznaje sygnał białkowy infekującej bakterii *Pseudomonas syringae* (czy sygnał cząsteczki fentionu), nie jest znany. Zachodzi przypuszczenie, że te kinazy mogą współdziałać z pozakomórkowym receptorem aktywowanym uprzednio

Tabela 3. Porównanie sekwencji aminokwasów subdomen VIb i VIII kilku roślinnych kinaz białkowych

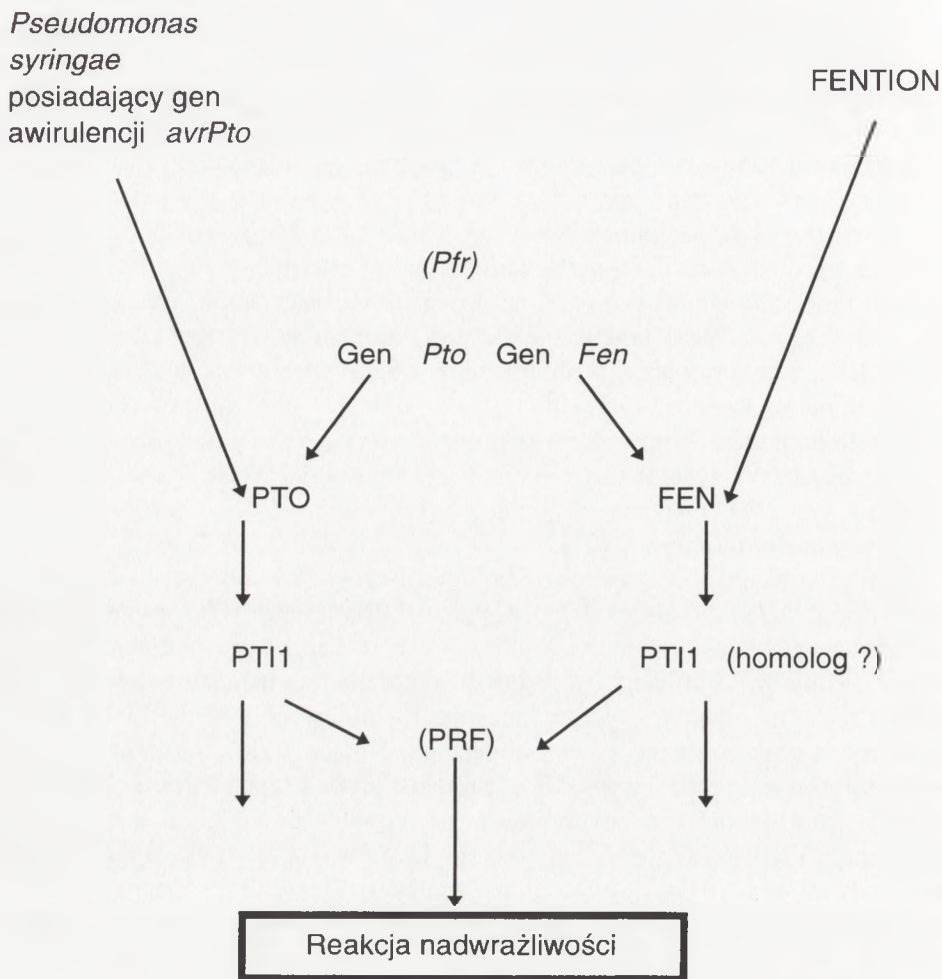
Kinazy białkowe	Subdomeny	
	VIb	VIII
FEN	DVKCTN	GNIGYIA PE
PTO	DVKS IN	GTLGYD PE
RLK5	DVKSSN	GSCGYI PE
PRK1(s/y)	HLKSSN	LLVAYKAPE
NPK15	DLKSAN	GTGYID PV
XA21	DLKPEN	GTXXYXAPE

FEN = kinaza serynowo/treoninowa FEN, PTO = kinaza serynowo/treoninowa PTO, RLK5 = kinaza białkowa *Arabidopsis thaliana* [36], PRK1(S/Y) = kinaza białkowa *Petunia inflata* [64], NPK15 = kinaza białkowa *Nicotiana tabacum* [41] i XA21 = kinaza białkowa *Oryza sativa* [80]

przez wiązanie z cząsteczką specyficznego elicytora kodowanego przez bakteryjny gen awirulencji lub cząsteczkę fentionu. Druga możliwość to taka, że sygnałna cząsteczką białka patogena (lub fentionu) może współdziałać bezpośrednio z białkiem PTO lub FEN i podnosić aktywność enzymatyczną tych kinaz.

Kolejnym homologicznym genem występującym w omawianym locus jest gen *Prf*, który jest związany zarówno z odpornością kontrolowaną przez gen *Pto*, jak i z wrażliwością na fention. Gen *Prf* został zmapowany w genomie mutantu pomidora upośledzonego pod względem obu wymienionych powyżej cech, tj. odporności na *Pseudomonas syringae*, jak i wrażliwości na fention. Gen *Prf* koduje białko zawierające charakterystyczne motywy, takie jak powtórzenia bogate w leucynę (LRR), miejsce wiązania nukleotydów (NBS) czy suwak leucynowy (ang. *leucine zipper*). Obecność tych struktur w produkcie tego genu powoduje, że zaliczamy go do trzeciej grupy genów odporności (*Rps2*, *Rpm1* i *N*) [77,78]. Ostatnio stosując drożdżowy system został sklonowany ostatni, jak dotąd homologiczny do genu *Pto*, gen *Pti1*. Gen ten znajdujący się również w locus *Pto* koduje także kinazę serynowo/tryeoninową [91].

Zidentyfikowanie dodatkowych homologicznych genów kodujących kinazy białkowe: *Fen* i *Pti1*, których produkty współdziałają z kinazą PTO wspiera pogląd, że fosforylacja białek jest jedną z kluczowych reakcji w uruchamianiu systemu obrony rośliny przed infekcją patogenów. Brak domen transmembranowych i sygnałnych sekwencji peptydowych w łańcuchach białkowych PTO i PTII wskazuje, że kinazy te zlokalizowane są w cytoplazmie. Kinaza kodowana przez gen *Pti1* jest fosforylowana przez kinazę PTO, natomiast produkt genu *Pti1* nie jest zdolny do fosforylacji białka PTO. Gdy próbowano przeprowadzić fosforylację białka PTII przez kinazę FEN, wynik był negatywny (podobny wynik obserwowano, gdy układ został odwrócony) [91]. Współdziałanie białka PTO z PTII wymaga obecności aktywności kinazowej białka PTO, ale nie wymaga aktywności tego typu u białka PTII. Jak wspomniano wyżej, PTO fosforyluje białko PTII w warunkach *in vitro*, natomiast PTII nie przeprowadza podobnej fosforylacji białka PTO, czyli białko PTO nie jest substratem dla kinazy PTII. Prawdopodobnie obserwowany brak zdolności do fosforylacji PTO u białka PTII może być spowodowany brakiem fizycznego kontaktu pomiędzy tymi białkami. [91]. Chociaż wiadomo, że w warunkach *in vitro* krzyżowa fosforylacja pomiędzy białkami zachodzi (zakłada się udział białek pośredniczących) nawet przy braku fizycznego kontaktu między nimi. Przykładem tego są serynowo/tryeoninowe kinazy u drożdży: *Ste7* i *Ste11*. Choć są one niezdolne do fosforylacji w warunkach *in vivo*, w warunkach *in vitro* kinaza *Ste11* fosforyluje białko *Ste7* [8,67]. Obserwacje te dają podstawę do stwierdzenia, że PTII może funkcjonować jako kolejny, pojawiający się na wcześniejszym etapie szlaku transdukcji sygnałów przekaźnik, prowadzący w konsekwencji do uruchomienia odpowiedzi obronnej na atak patogenów u roślin (rys. 2) [91].



Rys. 2. Ogólny schemat szlaku transdukcji sygnałów w patosystemie pomidor/*Pseudomonas syringae*

Pomimo strukturalnego podobieństwa pomiędzy PTO i FEN, jak wspomniano powyżej, tylko PTO może fosforylować PTI1. Przypomina to sytuację u innych organizmów np. drożdży czy ssaków, gdzie białka o wysokiej homologii uczestniczą w różnych szlakach transdukcji sygnałów [66]. W szlakach, w których uczestniczy PTO i FEN, inne związane z tym białka przenoszące sygnały z produktów genu awirulencji patogena i z fentionu są różne przynajmniej w części, choć końcowa odpowiedź na te sygnały może polegać na wywoływaniu reakcji nadwrażliwości. Specyficzna fosforylacja PTI1 przez PTO, ale nie przez FEN sugeruje, że PTI1 jest związany ze szlakiem przenoszenia sygnałów, w którym uczestniczy PTO, ale nie w tym, w którym bierze udział FEN. Wyniki badań świadczą, że białko

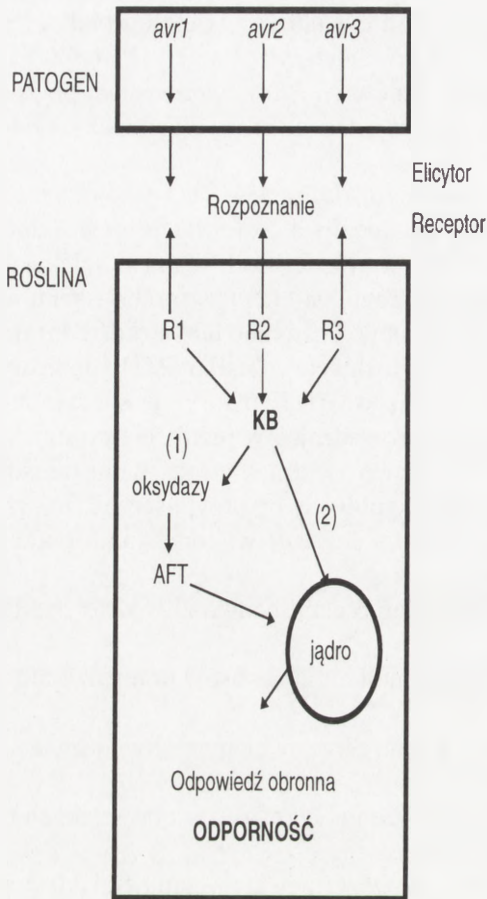
PTII nie współdziała z białkiem FEN, a ewentualny homolog białka PTII bierze udział w przenoszeniu sygnałów na wcześniejszym etapie niż białko FEN. Fakt, że *PtiI* należy do tej samej rodziny genów co *Pto* i *Fen*, nasuwa przypuszczenie, że homolog PTII może być specyficznym substratem dla kinazy FEN (Rys. 2) [91].

Identyfikacja substratu specyficznego dla kinazy PTO wspiera model szlaku przeniesienia sygnałów, w którym jest możliwa fosforylacja przez kinazy PTO i FEN niezależnych pojawiających się na późniejszych etapach szlaku transdukcji sygnałów (rys. 2). W modelu tym założono, że elicytor, produkt genu awirulencji z bakterii *Pseudomonas syringae* oddziałuje (pośrednio lub bezpośrednio) z białkiem PTO. Białko to znajduje, a następnie fosforyluje białko PTII, doprowadzając w ten sposób do jego aktywacji. Dalej białko PTII fosforyluje specyficzny substrat (jakieś niepoznane jeszcze białko) doprowadzając w rezultacie do indukcji reakcji nadwrażliwości. Chociaż pewne składowe związane ze szlakami transdukcji sygnałów mogą być różne, istnieją poważne powody by przypuszczać, że przeniesienie sygnałów w szlakach *Pto* i *Fen*, odbywa się przy wykorzystaniu podobnych mechanizmów (rys. 2). Te obserwacje to:

- (1) podobieństwo pomiędzy objawami reakcji nadwrażliwości i działaniem fentionu,
- (2) wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasów pomiędzy białkami PTO i FEN,
- (3) ekspresja genu *Pto* w roślinach transgenicznych uwrażliwiająca je na działanie fentionu [61],
- (4) uczestnictwo genu *Prf* w przenoszeniu sygnałów w obu szlakach transdukcji [77,78].

Gen *Prf* działa prawdopodobnie na wcześniejszym etapie szlaku przeniesienia sygnałów niż geny *Pto* i *Fen*, ponieważ zarówno w szlaku *Pto*, jak i *Fen*, jego obecność jest niezbędna. Przypuszczalnie białko PRF funkcjonuje także na końcowych etapach w obu szlakach przenoszenia sygnałów (rys. 2). Obecnie brak wystarczająco udokumentowanych eksperymentalnych danych na udowodnienie założeń dotyczących roli białka PRF w procesie przenoszenia sygnałów u roślin. Przez analogię do niektórych receptorów hormonów u ssaków [5] i do białka TOLL u *Drosophila* [34], do których jest podobny produkt genu *N* u tytoniu [88], białko PRF może działać jako receptor, który wiąże albo elicytor patogena albo fention i przenosi sygnał bezpośrednio do innych kinaz, które mogą być związane z membraną. Można też rozpatrywać model, w którym istnieje inne białko pośredniczące pomiędzy PRF i kinazami PTO i FEN (rys. 2).

Na rysunku 3 przedstawiono uproszczony przebieg niekompatybilnego współdziałania komórki roślinnej z patogenem. Regulacja szybkości pojawiania się w komórce aktywnych form tlenu jest ściśle związana z niekompatybilnym współdziałaniem roślina-patogen i może być jednym z dwu możliwych szlaków transdukcji



Rys. 3. Uproszczony model niekompatybilnego współdziałania komórki roślinnej z patogenem: *avr 1*, *avr2* i *avr3* – geny awirulencji, R1, R2 i R3 – produkty genów odporności, KB – kinazy białkowe, AFT – aktywne formy tlenu

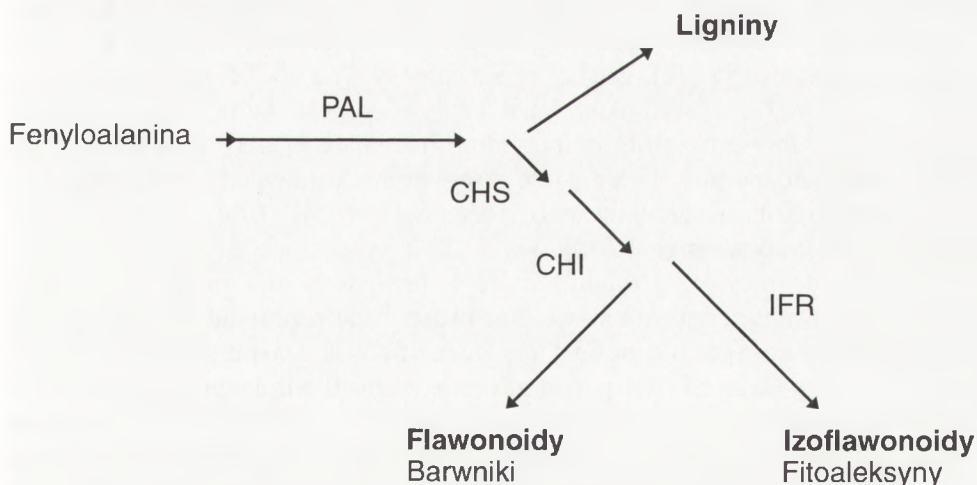
sygnałów (rys. 3) [20,55,58]. Z wielu doniesień wynika, że fosforylacja białek jest powiązana z indukcją oksydacyjnego wyładowania, co może następować przez fosforylację kinaz, a następnie aktywację oksydoreduktazy NADPH odpowiedzialnej za uwalnianie reaktywnych form tlenu w komórkach roślinnych, które działając jako wtórne przekaźniki aktywują czynniki transkrypcyjne. Udział reaktywnych form tlenu w regulacji ekspresji genów został ostatnio wyczerpująco opisany w pracy przeglądowej opublikowanej w *Postęпах Biochemii* [45]. W pracach związanych z patosystemem soja/*Pseudomonas syringae* wykazano bezpośredni udział reakcji fosforylacji w indukcji wyładowania oksydacyjnego [55]. U pomidorów wyrażających gen *Pto*, inhibitor kinazy zapobiegał zamieraniu komórek (reakcja nadwrażliwości) po ataku bakterii *Pseudomonas syringae* mających

gen awirulencji *avrPto*, co wskazuje, że aktywność kinazowa jest koniecznym warunkiem do zaistnienia reakcji obronnych charakterystycznych dla niekompatybilnego współdziałania roślina-patogen [91].

Alternatywny przebieg szlaku przenoszenia sygnałów może polegać na bezpośredniej regulacji ekspresji genów przez fosforylację czynników transkrypcyjnych (rys. 3). Uruchamianie ekspresji typowych dla reakcji nadwrażliwości genów, takich jak: transferazy glutationowej, genów kodujących białka PR (np. PR-1, PR-5,  $\beta$ -glukanaz), amoniakolizazy fenyloalaniny czy lipooksygenazy może odbywać się przez fosforylację czynników transkrypcyjnych [30,90]. Białka PTO i PTII mogą uruchamiać ekspresję genów obronnej odpowiedzi roślin przez bezpośrednią lub

pośrednią fosforylację czynników transkrypcyjnych, które są związane z indukcją tych genów. Wykazano, że trzy białka współdziałające z białkiem PTO wykazują wysoką homologię ze znanymi czynnikami transkrypcyjnymi [91]. Fosforylacja czynników transkrypcyjnych jest ogólnym mechanizmem aktywacji genów u eukariotów [38]. Wykazano, że synteza białka PR-10a związanego z patogenezą jest indukowana w różnych tkankach ziemniaka po zranieniu, działaniu elicytora czy infekcji przez *Phytophthora infestans* [18]. Analiza delecyjna promotora genu PR-10a ziemniaka pozwoliła na identyfikację odcinka 20-nukleotydowego specyficznego rozpoznawanego przez dwa jądrowe czynniki transkrypcyjne PBF-1 (*PR-10a Binding Factor 1*) i PBF-2 (*PR-10a Binding Factor 2*). Wzrost związania tych czynników do DNA był skorelowany ze wzrostem poziomu mRNA białka PR-10a. Okazało się, że przynajmniej jedna z podjednostek czynnika PBF-1 może być fosforylowana. Traktowanie tkanek, w których wyrażany jest gen *PR-10a* przy pomocy alkalicznej fosfatazy, hamowało nagromadzenie się mRNA-PR-10a. Podobny efekt tzn. obniżenie poziomu mRNA i białka PR-10a był obserwowany, gdy w doświadczeniu zastosowano inhibitor kinazy [18]. Inhibitor kinazy obniżał również aktywność amoniako-liazy fenyloalaniny (PAL) kluczowego enzymu uruchamiającego metabolizm fenylopropanoidowy (rys. 4) [2,23].

Geny kodujące enzymy szlaku metabolizmu fenylopropanoidowego, takie jak: amoniako-liaza fenyloalaniny (PAL), syntaza chalkonowa (CHS), izomeraza chalkonowa (CHI) czy reduktaza izoflawonowa (IFR), są uznawane za klasyczne geny markerowe obronnej odpowiedzi roślin na infekcje patogenów, jak również niektóre stresy abiotyczne. Wiele z końcowych produktów metabolizmu fenylopropanoido-



Rys. 4. Ogólny schemat szlaku fenylopropanoidowego: PAL – amoniako-liaza fenyloalaniny, CHS – syntaza chalkonowa, CHI – izomeraza chalkonowa, IFR – reduktaza izoflawonowa

wego, np. fitoaleksyny ma własności antymikrobiologiczne, inne natomiast służą do wzmocnienia błon komórkowych. [52].

### 2.2.2. Roślinne geny odporności kodujące białka zlokalizowane na membranach komórkowych i zawierające powtórzenia bogate w leucynę (Grupa II)

#### 2.2.2.1 Grupa genów *Cf*

Locus *Cf* obejmujący kilka homologicznych genów został zidentyfikowany w genomie pomidora. Geny te warunkują pojawianie się fenotypu pomidora odpornego na atak grzyba *Cladosporium fulvum* przenoszącego gen awirulencji *avr*. Dotąd przeprowadzono mapowania i klonowania szeregu genów z grupy *Cf*. Jednym z pierwszych genów, jakie sklonowano z tej grupy, był gen *Cf-9*. Mapowanie tego genu przeprowadzono przez zaznaczanie genomu pomidora transposonem Ds [43]. Część genów (*Cf-1*, 4 i 9) zlokalizowana na krótkim ramieniu chromosomu 1 pomidora jest alleliczna [42,47] i niecałkowicie dominująca, a fenotypowe sposoby wyrażania się reakcji odpornościowej tych allelicznych genów *Cf* mogą być bardzo zbliżone [19,32]. Dalsze badania nad lokalizacją i funkcjonowaniem locus *Cf* prowadzono przy zastosowaniu niemal-izogenicznych linii (NIL) pomidora [83]. Okazało się, że poszczególne geny z locus *Cf* działają na różnych etapach ataku grzyba *Cladosporium fulvum*. Gen *Cf-2* nadaje odporność, która polega na powstrzymaniu rozwoju patogena bezpośrednio po wnikięciu go do aparatów szparkowych rośliny [12,32]. Inny gen z tego locus, gen *Cf-3*, działa w późniejszej fazie ataku grzybowego, dopuszczając uprzednio do intensywnego rozwoju patogena przed uruchomieniem ekspresji genów z grupy *Cf* [53,68]. Znalezione ponadto korelacje pomiędzy fenotypowym wyrażaniem się odporności każdego z genów *Cf* i ich genetyczną lokalizacją [32]. Blisko związane geny *Cf-2* i *Cf-5* zlokalizowane na chromosomie 6 [19,42] warunkują fenotypową odporność, która obejmuje powiększające się komórki mezofilu bezpośrednio otaczające aparaty szparkowe. Tego rodzaju reakcja odpornościowa nie jest obserwowana w przypadku niekompatybilnego współdziałania uwarunkowanego obecnością genów *Cf-4* i *Cf-9* zlokalizowanych na chromosomie 1 [42].

Specyficzne elicytory grzybowe, które są przypuszczalnie produktami genów awirulencji, stwarzają zupełnie nowe możliwości badawcze indukowanych reakcji obronnych u roślin. Specyficzne elicytory zidentyfikowano po raz pierwszy w płynie komórkowym podatnych liści pomidora infekowanych wirulentnymi rasami *Cladosporium fulvum* [15,16]. Elicytory wprowadzone do zdrowych liści pomidora indukowały nekrozy i chlorozy, ale tylko wtedy, gdy liście zawierały odpowiedni gen *Cf* [15]. Znalezione poważne dowody, że elicytory aktywne w przypadku linii pomidora zawierających geny *Cf-4* i *Cf-9* są produktami grzybowych genów awirulencji: *avr4* i *avr9* [44,86]. Fizjologiczna odpowiedź indukowana przez płyn ko-



mórkowy (zawierający elicytory) u pomidorów przenoszących geny z grupy *Cf* obejmuje wzrost intensywności kilku typowych procesów, m.in. przepływu jonów przez błony, aktywności lipooksygenazy, nadutleniaania tłuszczów i poziomu aktywnych form tlenu [69,87]. Obronna odpowiedź pomidorów na atak grzyba *Cladosporium fulvum* wiązała się również z odkładaniem się kalozy, uruchamianiem reakcji nadwrażliwości i wzrostem syntezy fitoaleksyn i białek PR (*pathogenesis-related proteins* [12,13,14,17,53,54].

Z wcześniejszych badań wiadomo, że geny *Cf-2* i *Cf-9* różnią się między sobą lokalizacją w genomie pomidora (patrz tab. 2, *Cf-2* na chromosomie 6, *Cf-9* na chromosomie 1) [19,33,42, 43], natomiast struktury produktów białkowych tych genów są podobne. Ostatnie badania prowadzone przez grupę z Norwich próbują odpowiedzieć na pytanie, czy produkty obu tych niezwiązanych genetycznie genów: *Cf-2* i *Cf-9*, inicjują podobne mechanizmy obronne na atak tego patogena w komórkach pomidora [33,62]. Najbardziej ogólny wniosek, jaki można sformułować na podstawie wyników przeprowadzonych badań, brzmi: w obu przypadkach po zastosowaniu odpowiednich elicytorów obserwuje się następujące efekty współdziałania niekompatybilnego:

- (1) zmiany morfologiczne komórek epidermy (warstwa L1),
- (2) akumulację kwasu salicylowego,
- (3) biosyntezę etylenu i
- (4) śmierć komórki (HR).

Jak to przedstawiono w tabeli 4, w przypadku niekompatybilnego współdziałania produktów genów *Cf-9* i *avr9*, otwieranie się aparatów szparkowych miało miejsce między godziną 2 a 6 po wprowadzeniu elicytora, a zamieranie komórek mezofilu rozpoczynało się po około 10 godzinach. Silny wzrost syntezy etylenu następował pomiędzy 9 a 12 godziną i wysoki poziom utrzymywał się dłuższy czas. Wzrost poziomu kwasu salicylowego rozpoczynał się po 12 godzinach i trwał do 24 godzin po potraktowaniu roślin elicytorem, a następnie spadał [33]. Gdy chodzi o współdziałanie układu genów *Cf-2* i *avr2*, aparaty szparkowe pozostają zablokowane jeszcze po 8 godzinach, poziom kwasu salicylowego podnosi się po 12 godzinach, a etylen po 16, a potem poziom obu tych substancji spada. Komórki tkanki naczyniowej gospodarza zaczynają zamierać po około 24 godzinach. Śmierć komórek będąca wynikiem procesów zainicjowanych przez obie pary genów była często spowodowana ich powiększaniem się [33]. Wyładowania aktywnych form tlenu oraz wzrost aktywności lipooksygenazy wydają się poprzedzać wszystkie pozostałe reakcje indukowane kompatybilnym współdziałaniem w obu układach genów (tab. 4) [33,62].

Produkt białkowy genu *Cf-9* ma charakterystyczne domeny wskazujące na silne związki z błoną komórkową, co sugeruje, że funkcjonuje jako białko transmembranowe. W jego pierwszorzędowej strukturze można wyróżnić następujące domeny: peptyd sygnałny, 28 zmutowanych fragmentów LRR oflankowanych przez dwie

Tabela 4. Schemat kolejności włączania się poszczególnych etapów reakcji obronnych u pomidorów w trakcie współdziałania niekompatybilnego po zaindukowaniu tego procesu współdziałaniem produktu genu odporności z odpowiednim elicytorem [33]

Czas po infekcji	<i>Cf2/avr2</i>	Czas po infekcji	<i>Cf9/avr9</i>
<b>4–8 godzin</b>	wyładowania aktywnych form tlenu, nadutlenianie tłuszczów, wzrost poziomu glutationu, zmiana stanu redoks	<b>2-6 godzin</b>	wyładowania aktywnych form tlenu, otwarcie aparatów szparkowych, nadutlenianie tłuszczów, wzrost poziomu glutationu, zmiana stanu redoks
<b>8 godzin</b>	wzrost poziomu lipooksygenazy	<b>8–12 godzin</b>	wzrost poziomu lipooksygenazy, spadek żywotności komórek, synteza etylenu, synteza kwasu salicylowego.
<b>12 godzin</b>	synteza kwasu salicylowego		
<b>16 godzin</b>	synteza etylenu	<b>16 godzin</b>	symptomy makroskopowe
<b>24 godziny</b>	spadek żywotności komórek		
<b>72 godziny</b>	symptomy makroskopowe		

domeny wykazujące homologię do poligalakturonozowego inhibitora i transmembranową C-końcową kotwicę [31,43].

Gen *Cf-2* zlokalizowany na chromosomie 6 u pomidora koduje białko wykazujące wysoki stopień homologii do białka CF-9 [22]. To podobieństwo wskazuje, że białka te mogą uruchamiać, współdziałając z produktami właściwych genów awirulencji grzyba, podobny (lub identyczny) szlak transdukcji sygnałów. Posiadanie przez te białka powtórzeń bogatych w leucynę, zakończonych C-końcową kotwicą membranową sugeruje, że mogą one pełnić rolę receptora dla ewentualnego liganda pozakomórkowego, np. białka AVR2 lub AVR9. Wydaje się, że kluczowym regionem dla tych białek są powtórzenia bogate w leucynę (LRR). Domeny te występują w tandemach w ilości od 1–30 kopii. LRR są wykrywane w wielu białkach zarówno pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego [48]. Większość powtórzeń LRR składa się z 24 reszt leucynowych, lecz zdarzają się odstępstwa od tej liczby. Powtórzenia LRR znajdują się w funkcjonalnie i ewolucyjnie różnych grupach białek, np. w cyklazach adenylazowych u drożdży, w białkach TOLL u *Drosophila* czy w receptorach gonadotropiny u człowieka. Ich obecność wiąże się jednak z reguły z:

- (1) oddziaływaniami białko-białko oraz
- (2) z wiązaniem peptydowych ligandów.

Prawie połowa białek, u których stwierdzono występowanie domen LRR, bierze udział w przenoszeniu sygnałów wewnątrz komórek oraz między komórkami i

otoczeniem. Brak homologii sekwencji aminokwasów między białkami zawierającymi LRR wskazuje poza tym, że białka te nie pochodzą ewolucyjnie od jednego białka przodka [48].

Wykazano, że preparaty białek z membran liści pomidora wyrażającego gen *Cf-9* wiązały peptyd AVR9 [35]. W wyniku współdziałania białek CF-9 i AVR9, cytoplazmatyczne domeny białka CF-9 mogą uaktywniać kinazę białkową (PK), analogiczną do tej, jaką kodują geny grupy *Pto* u pomidora. To przypominałoby mechanizm, przez który CD4-kotwica transmembranowego receptora na komórkach T uaktywnia kinazę tyrozynową p56<sup>Lck</sup> [84]. Alternatywny mechanizm uruchamiania następnego etapu szlaku transdukcji sygnałów mógłby polegać na współdziałaniu białka CF-9 z innymi białkami przy uaktywnianiu kinazy transmembranowej posiadającej pozakomórkowe powtórzenia LRR [7] lub z niezidentyfikowanymi białkami posiadającymi powtórzenia LRR, np. inhibitorem poli-galakuronazowym (PGIPs) [11]. Uaktywnienie kinazy mogłoby prowadzić do aktywacji oksydoreduktazy NADPH. Membranowy kompleks oksydacyjny może być związany z uwalnianiem aktywnych biologicznie form tlenu w liściach pomidora. Aktywne formy tlenu mogą być wytwarzane w celu:

- (1) bezpośredniego hamowania wzrostu patogena,
- (2) indukcji procesu prowadzącego do śmierci komórek (reakcja nadwrażliwości),
- (3) wzmocnienia ścian niezainfekowanych komórek przez syntezę strukturalnych białek lub
- (4) w celu indukcji ekspresji genów PR (chitynazy itp.).

#### 2.2.2.2 Gen *L6*

Kolejnym genem zlokalizowanym w genomie roślinnym był gen *L6* zmapowany w genomie *lnu*. Obecność tego genu warunkuje powstawanie fenotypu *lnu* odpornego na infekcję grzyba *Melampsora lini*. Mapowanie i klonowanie przeprowadzono przy pomocy zaznaczania genomu transposonem *Ac*. Mutanty zawierające przypuszczalnie transpozycję *Ac* w genie *L6*, zostały następnie wyselekcjonowane z tysięcy zmutowanych roślin [24,25,50]. Gen *L6* koduje dwa produkty: jeden o długości 1294 aa, drugi krótszy o długości 705 aa. Białko *L6* charakteryzuje wysoka homologia do białka *N* i nieco niższa do *RPS2* [51]. Wszystkie trzy białka, produkty genów: *L6*, *N* i *Rps2*, mają charakterystyczne wspólne domeny. Najwyższa homologia sekwencji aminokwasów obserwowana jest w środkowej części łańcucha, w której ulokowane jest miejsce wiązania nukleotydów (NBS) obejmujące przynajmniej dwa motywy związane z wiązaniem nukleotydów: pętlę-P i domenę kinazy 2 [85]. Istnienie wysokiej homologii sekwencji aminokwasowych w białkach: *RPS2*, *N* i *L6* pozwala przypuszczać, że te białka mogą funkcjonować w podobny sposób jako przekaźniki w szlaku transdukcji sygnałów. Wysoka homologia aminokwasów pomiędzy białkiem *L6* i *N* wskazuje ponadto na ich bliskie genetyczne pokrewieństwo. Szczegółowe

porównanie produktów białkowych genów *N* i *L6* wskazuje na obecność w białku *L6* dodatkowych 60 aminokwasów przy N-końcu łańcucha nieobserwowanych w przypadku białka *N*. Potencjalny sygnałny peptyd pojawiający się w tym rejonie (we fragmencie 60-aminokwasowym) białka *L6*, sugeruje, że produkt genu *L6* może zapoczątkowywać szlak przenoszenia sygnałów pochodzący spoza komórki. Natomiast, co było wiadome już poprzednio, białko *N* jest zlokalizowane w cytoplazmie [88]. Pomimo że istniejąca wysoka homologia aminokwasów w białkach *N* i *L6* mogłaby wskazywać na identyczne funkcje obu białek w systemie uruchamiania reakcji obronnych u roślin (u lnu i tytoniu), to obecność sygnałnego peptydu w białku *L6* dowodzi, że w przeciwieństwie do cytoplazmatycznego białka *N* produkt genu *L6* funkcjonuje jako białko transmembranowe zdolne do indukcji szlaku przenoszenia sygnałów pochodzących spoza komórki. Dlatego gen *L6* został zaliczony przez nas do drugiej grupy roślinnych genów odporności pomimo wysokiej homologii do genów: *Rps2*, *Prf* i *N*, zaliczanych do grupy trzeciej.

### 2.2.3. Roślinne geny odporności kodujące białka zlokalizowane w cytoplazmie i zawierające powtórzenia bogate w leucynę (Grupa III)

#### 2.2.3.1 Grupa genów *RPS*

Grupa *RPS* należąca do trzeciej grupy genów odporności skupia geny warunkujące pojawianie się fenotypu *Arabidopsis thaliana* odpornego na atak bakterii *Pseudomonas syringae* przenoszącej specyficzne geny awirulencji [49,89]. Zalicza się do niej następujące geny: *Rps2*, *Rps3* (*Rpm1*), *Rps4* i *Rps5*. Pierwszym z genów, który został zmapowany, a następnie sklonowany w genomie *Arabidopsis*, był gen *Rps2*. Jego identyfikację przeprowadzono przez izolację mutantów *Arabidopsis*, które nie wytwarzały reakcji nadwrażliwości w odpowiedzi na atak grzyba *Pseudomonas syringae*. Dalsza procedura prowadząca do jego sklonowania prowadziła przez zlokalizowanie go na fizycznej i genetycznej mapie genomu *Arabidopsis* podobnie jak w przypadku genów z grupy *Pto* u pomidora [63]. Produkt genu *Rps2* zawiera kilka charakterystycznych motywów obejmujących między innymi: suwak leucynowy na N-końcu, miejsce wiązania nukleotydu (NBS) i region zawierający 13 powtórzeń bogatych w leucynę (LRR) na C-końcu łańcucha białkowego [3,63]. Obecność motywów LRR w białku *RPS2* może sugerować, że jego rola mogłaby polegać na uczestnictwie w szlaku przenoszenia sygnałów albo jako receptora dla sygnałnej cząsteczki patogenu, albo jako komponenty współdziałającej z innym składnikiem szlaku przenoszenia sygnałów między patogenem i rośliną.

Obecność genu *Rps3* (*Rpm1*) w genomie *Arabidopsis* warunkuje powstawanie fenotypu odpornego na atak bakterii *Pseudomonas syringae* szczepu przenoszącego gen zarówno awirulencji *avrRpm1*, jak i *avrB*. Między tymi genami nie wykazano żadnego pokrewieństwa [4,40]. Wydaje się więc, że produkt genu *Rps3* (*Rpm1*)

ma domeny specyficznie rozpoznające produkty obu genów awirulencji. Dotychczasowe badania wskazują, że białko to podobnie jak produkt genu *Rps2* ma miejsce wiązania nukleotydów (NBS) oraz szereg powtórzeń bogatych w leucynę (LRR) [29]. To wskazuje, że albo białko RPS3 (RPM1) działa jako receptor, który mógłby wiązać dwie różne cząsteczki sygnałne patogena, albo że geny *avrRpm1* i *avrB*, pomimo braku homologii między nimi, wytwarzają podobne cząsteczki białka rozpoznawane przez produkt genu *Rpm1*. Inna możliwość mogłaby polegać na tym, że gen *Rpm1* może kodować element właściwy dla obu szlaków przenoszenia sygnałów: jednego, w którym pośredniczy białko produktu genu *avrRpm1* i drugiego, w którym pośredniczy białko AVR-B [39].

Ponieważ geny awirulencji *Pseudomonas syringae* zostały sklonowane, zaistniała możliwość skonstruowania izogenicznych szczepów tej bakterii różniących się tylko obecnością specyficznego genu awirulencji: *avrRpm1* i *avrRpt2*. Linia *Arabidopsis* użyta w tym doświadczeniu przenosiła dwa geny odporności: *Rps2* i *Rpm1*. Wykazano, że izogeniczne szczepy *Pseudomonas syringae* różnią się zdolnością indukowania reakcji nadwrażliwości (HR) w roślinach. Szczep przenoszący gen *avrRpm1* indukował reakcję nadwrażliwości w ciągu 5 godzin, natomiast szczep posiadający gen *avrRpt2* w ciągu 20 godzin od początku infekcji [72]. Autorzy tej pracy próbują znaleźć odpowiedź na pytanie, co się dzieje, gdy do rośliny docierają sygnały dwóch różnych genów awirulencji. Czy odpowiedzi się nakładają, czy mają raczej charakter epistatyczny? Okazało się, że produkt genu awirulencji *avrRpt2* może zablokować odbiór sygnału pochodzącego od genu *avrRpm1* albo może dochodzić do zablokowania indukcji odpowiedzi obronnej na atak szczepu przenoszącego ten gen. Kiedy miała miejsce koinokulacja obu izogenicznych szczepów bakterii *Pseudomonas syringae*, pojawiała się reakcja nadwrażliwości charakterystyczna dla szczepu zawierającego gen *avrRpt2*. Nie obserwowano natomiast reakcji HR indukowanej przez sygnał genu *avrRpm1*. Ponieważ geny awirulencji są wyrażane w odrębnych szczepach *Pseudomonas syringae*, hamowanie przenoszenia się sygnału *avrRpm1* zachodzi przypuszczalnie poza komórkami bakteryjnymi. Stwierdzono również, że to zakłócenie miało miejsce niezależnie czy roślina przenosiła dziki gen *Rps2*, czy nie. Ten wynik wskazywał, że zakłócenie nie jest spowodowane przez aktywację szlaku RPS2. Autorzy przedyskutowali szereg możliwych wyjaśnień tych obserwacji, ale najbardziej prawdopodobna i najprostsza wydaje się ta, że geny *avrRpm1* i *avrRpt2* konkurują o wspólny element (elementy) szlaku transdukcji sygnałów. Umocnieniem dla tego modelu jest obserwacja, że specyficzność odpowiedzi *avrRpm1* mogłaby być przywracana przez wzrost ilości komórek *Pseudomonas syringae* zawierających gen *avrRpm1* w inokulum.

Dalsze badania tego modelu (*Arabidopsis/Pseudomonas syringae*) były utrudnione przez brak wiedzy na temat sposobu działania produktów genów: *avrRpm1* i *avrRpt2*. Nie wiadomo, czy produkty tych genów działają bezpośrednio jako

cząsteczki sygnałne czy działają raczej jako enzymy katalizujące powstawanie cząsteczek drugorzędowych sygnałów. Ich pokrewne geny odporności na choroby: *Rpm1* i *Rps2* kodują białka o zbliżonej strukturze; oba zawierające przypuszczalnie suwak leucynowy na N-końcu, miejsce wiązania nukleotydów (NBS) oraz 13 powtórzeń LRR [29,63]. Cytoplazmatyczna lokalizacja białka RPS2 [63] sugeruje, że jeżeli to białko działa jako receptor dla sygnałów *avrRpm1* i *avrRpt2*, to w tej sytuacji sygnały muszą przechodzić przez membrany komórek. Jedną z możliwości jest taka, że sygnały *avrRpt2* i *avrRpm1* konkurują o białka membranowe ułatwiające im transfer przez membrany. Nie ma w tej chwili przekonującego dowodu, że białka – produkty genów awirulencji *Pseudomonas syringae* wnikają do komórek roślinnych. Opublikowane dane z badań nad patogenami ssaków wskazują, że w przypadku tych patogenów dochodzi do wnikania białek patogena do komórek gospodarza [70,75,76]. Odpowiedzialny jest za to wyspecjalizowany system sekrecyjny patogena [76]. Badania prowadzone nad podobnym systemem sekrecyjnym u *Pseudomonas syringae* wykazały, że mutacje genów kodujących różne komponenty tego systemu powodują utratę zdolności indukcji reakcji nadwrażliwości u roślin [56]. Istnieje więc możliwość, że białka – produkty genów awirulencji mogą być przenoszone w ten sposób do komórek gospodarza i że istnieją białka, które ułatwiają ten transport u *Pseudomonas syringae*. O możliwość współdziałania właśnie z tymi białkami konkurują produkty genów awirulencji: *Avrrpt2* i *Avrrpm1*. Dotychczas jednak nie udało się zidentyfikować takich białek w patosystemie *Arabidopsis/Pseudomonas syringae*.

Dalsze badania prowadzone na tym modelu pozwoliły stwierdzić, że kolejność włączania genów związanych z odpowiedzią odpornościową różni się w zależności od genu odporności (*Rps2* lub *Rpm1*) obecnego w genomie *Arabidopsis* [71].

### 2.2.3.2 Gen *Rpg1*

W genomie soi zmapowano gen *Rpg1* nadający odporność na atak bakterii *Pseudomonas syringae* posiadającej gen awirulencji *avrB* [46,65]. Chociaż w przypadku większości hodowanych odmian soi gen *Rpg1* jest specyficzny tylko w odniesieniu do genu *avrB*, znaleziono kilka linii posiadających gen odporności specyficzny do genu awirulencji *avrRpm1*. Ten nowy gen wydaje się być bardzo podobny do genu *Rpm1* [1]. Gen *Rpg1* nie został dotąd sklonowany i w związku z tym nieznana jest przypuszczalna struktura jego białkowego produktu.

### 2.2.3.3 Gen *N*

W przypadku wirusa mozaiki tytoniu (TMV) okazało się, że białko płaszczka tego wirusa spełnia rolę specyficznego elicytora międzykomórkowego, który wywołuje reakcję nadwrażliwości u odmian *Nicotiana glauca* zawierających gen

odporności *N* [9]. Gen ten sklonowano podobnie jak geny *Cf-9* i *L6*, stosując zaznaczanie genomu transpozonomem *Ac* pochodzącym z kukurydzy [9]. Genomowy DNA otaczający element *Ac* użyty do identyfikacji klonów: cDNA i genomowego, zawierających gen *N*. Potwierdzeniem, że wyselekcjonowany klon zawierał poszukiwany gen było przywrócenie zdolności do odpowiedzi nadwrażliwej u mutantu dotąd niezdolnego do takiej reakcji poprzez transformację mutantu odnośnym klonem genomowego DNA [88]. Analiza sekwencji klonów cDNA i DNA genomowego wykazała, że gen *N* koduje białko o masie 131,4 kDa zawierające charakterystyczną domenę na N-końcu przypominającą cytoplazmatyczne domeny białka TOLL u *Drosophila* [34] i receptorów interleukiny-1 (IL-1R) u ssaków [79]. Domeny te, jak się wydaje, mogą odgrywać kluczową rolę w szlaku transdukcji sygnałów w patosystemie tytoń/TMV. W systemie immunologicznym ssaków cytoplazmatyczna domena IL-1R jest związana z transdukcją sygnałów wymaganych dla translokacji NF- $\kappa$ B. Ta domena (IL-1R) jest podobna, jak wspomniano powyżej, do cytoplazmatycznej domeny białka TOLL u *Drosophila* [37]. Podobieństwo domeny białka *N* do analogicznej domeny w białkach TOLL i IL-1R sugeruje, że domena ta może uruchamiać międzykomórkowy szlak transdukcji sygnałów u tytoniu, podobnie jak to się dzieje u zwierząt (TOLL i IL-1R). Białko *N*, a możliwe że i inne białka będące produktami genów odporności, mogą uaktywniać czynniki transkrypcyjne uruchamiające ekspresję genów odpowiedzialnych za zaistnienie reakcji nadwrażliwości w komórkach roślinnych.

#### 2.2.4 Roślinne geny odporności kodujące białka zawierające zarówno powtórzenia bogate w leucynę, jak i domeny kinazy serynowo-treoninowej (Grupa IV)

##### 2.2.4.1. Gen *Xa21*

Gen *Xa21*, który został zmapowany na chromosomie 11 ryżu, nadaje tej roślinie odporność na infekcję bakteriami *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Gen *Xa21* został uzyskany za pomocą klonowania pozycyjnego [80], podobnie jak poprzednio w przypadku genów: *Pto*, *Cf-9* i *N*. Gen *Xa21* należy do rodziny genów rozmieszczonych na odcinku o długości 30 cM chromosomu 11 [59]. Grupa ta składa się z co najmniej siedmiu genów związanych z odpornością ryżu na wirusy, bakterie i grzyby. Analiza sekwencji aminokwasowej przypuszczalnego produktu białkowego genu *Xa21* ujawniła wysoki stopień homologii kilku fragmentów białka XA21 do znanych domen białek produktów tej grupy genów.

Na N-końcu łańcucha białka XA21 stwierdzono obecność 23 hydrofobowych reszt aminokwasowych charakterystycznych dla peptydu sygnałowego. W rejonie łańcucha pomiędzy aminokwasami 81 i 634 ulokowane są 23 kopie powtórzeń LRR ujawniających zdolność tego białka do interakcji typu białko/białko. Sekwencja pomiędzy 708–1025 aminokwasem zawiera cytoplazmatyczną domenę kinazy biał-

kowej. Podobieństwo sekwencji aminokwasów regionów domeny VIb i VIII (patrz tab. 3) z kilkoma kinazami serynowo/treoninowymi pozwala zaliczyć białko XA21 do grupy kinaz serynowo/treoninowych [80].

Komputerowe porównanie sekwencji białka XA21 do sekwencji białkowych zgromadzonych w ogólnie dostępnych bazach danych wykazało istnienie 54,7% podobieństwa sekwencji tego białka do sekwencji białka RLK5 [36] i 53,1% do TMK1 [7], kinaz białkowych pochodzących z *Arabidopsis* [7]. Sekwencje aminokwasowe przypuszczalnych pozakomórkowych domen białka XA21 ujawniły podobieństwo do podobnych domen białka CF-9 pomidora (54,9%), natomiast domena aktywności serynowo/treoninowej kinazy białka XA21 jest najbardziej homologiczna do podobnej domeny białka SRK-29 (56,3%) i do białka PTO (56,5%) [60,82].

### 3. PODSUMOWANIE

Zdolność roślin do obrony przed atakiem patogenów znajduje się zgodnie z koncepcją gen-na-gen pod kontrolą pojedynczego dominującego genu odporności. Produkty genów odporności są zdolne do rozpoznawania patogena najprawdopodobniej przez bezpośrednią interakcję z produktami ich genów awirulencji. Ta interakcja zapoczątkowuje zmiany w metabolizmie komórki gospodarza, których efektem jest śmierć otaczających miejsce infekcji komórek gospodarza (reakcja nadwrażliwości), co prowadzi do zahamowania rozwoju patogena.

Produkty genów odporności są aktywne przez elicytory – sygnałne cząsteczki, których synteza jest kontrolowana przez geny awirulencji patogena. W większości przypadków, geny awirulencji i odporności tworzą wysoce wyspecjalizowane pary. Z tego wynika, że produkt danego genu odporności jest aktywowany tylko przez ściśle określony elicytor – produkt specyficznego genu awirulencji. Wyjątkiem od tej reguły jest produkt genu *Rpm1* z *Arabidopsis*, który rozpoznaje elicytory wytwarzane przez dwa geny awirulencji; *avrRpm1* i *avrB* przenoszone przez *Pseudomonas syringae*, co daje podstawę do stwierdzenia, że produkty genów odporności mogą niekiedy (bardzo rzadko) funkcjonować jako uniwersalne przekaźniki w szlaku transdukcji sygnałów patogena.

Jak to obszernie przedstawiono w niniejszej pracy, dokonano ostatnio licznych klonowań roślinnych genów odporności (klonowanie pozycyjne lub przez zaznaczanie transpozonomi: Ac lub Ds). Poznanie przypuszczalnych pierwszorzędowych struktur produktów białkowych genów odporności pozwoliło na wykazanie obecności charakterystycznych domen ulokowanych w tych białkach. Dotyczy to przede wszystkim powtórzeń bogatych w leucynę (LRR), które występują u większości produktów genów odporności. Liczne kopie tych domen występujące w wielu bardzo różnych białkach są związane najczęściej z procesami transdukcji sygnałów. Miejsce wiązania



nukleotydw (NBS) i suwak leucynowy to domeny, również bardzo często obserwowane w produktach roślinnych genów odporności. Obecność takich charakterystycznych elementów w białkach produktach genów odporności pochodzących z bardzo odległych gatunków roślin (tytoń, pomidor, ryż, len czy *Arabidopsis thaliana*) oraz to że reakcja nadwrażliwości jest indukowana przez patogeny o całkowicie odmiennych cyklach życiowych (grzyby, bakterie, wirusy) może wskazywać na istnienie zbliżonego mechanizmu indukowania szlaków transdukcji sygnałów prowadzących do uruchomienia systemu obrony przeciw patogenom w świecie roślin.

## ADDENDUM

Cztery ostatnie prace opublikowane w grudniu 1996 r. [56a,78a,82a,86a] związane z odpowiedzią roślin na infekcję patogenów zawierają dowody, że białka kodowane przez geny awirulencji patogenu są wprowadzane do komórek roślinnych, gdzie następnie dochodzi do ich rozpoznania przez białka - produkty roślinnych genów odporności (*R*).

Z badań grupy Staskawicza [78a] wynika, że białko AvrPto – produkt genu awirulencji bakterii działa wewnątrz komórki roślinnej. Autorzy przeprowadzili ekspresję *transient* genu *avrPto* w roślinach *Nicotiana benthamiana* transformowanych uprzednio genem *pto*. Ta ekspresja wywołała nekrozę przypominającą reakcję nadwrażliwości (HR) związaną z obecnością genu *pto*, a powstającą w wyniku infekcji bakterii *Pseudomonas syringae*, która przenosi gen *avrPto*. Autorzy ci prezentują również dowód na to, że białko AvrPto było aktywne w komórce roślinnej. Delecja 30 aminokwasów z C końca łańcucha białka AvrPto nie pozbawiała tego białka jego aktywności, gdy jednak usunięto 59 aminokwasów, białko traciło zdolność do wywoływania nekrozy. Wyniki przedstawione przez grupę Staskawicza świadczą o tym, że produkt genu awirulencji *avrPto* i produkt genu *R* mogą bezpośrednio współdziałać. Wyniki te w pełni potwierdzono, gdy zastosowano dwuhybrydowy system z drożdży.

Ponieważ białko Pto jest w 80% homologiczne z produktem blisko z nim związanego genu *fen*, którego produkt nie współdziała z AvrPto, użyto więc tego białka *fen* w doświadczeniach związanych z wymianą domen z białkiem Pto w celu określenia regionu odpowiedzialnego za specyficzność interakcji białka Pto. Wyniki badań grupy Staskawicza [78a] wskazują, że istotny dla interakcji z białkiem patogenu region znajduje się między aminokwasem 129 i 224, natomiast z badań grupy Martina [82a] wynika, że istotnym z punktu widzenia specyficzności jest region między aminokwasami 190 i 209. Jak już wiadomo od dawna, dwie konserwatywne, katalityczne domeny kinazy białkowej znajdują się między aminokwasami 182 i 184 oraz między 202 i 211 w łańcuchu. Wynika z tego, że domeny

odpowiedzialne za specyficzność kinazy Pto są rozmieszczone w rejonie między domenami katalitycznymi.

Dodatkowym potwierdzeniem wniosków wyływających z prac grupy Staskawicza i Martina są prace publikowane w PNAS [56a] i w Cell [86a].

Leister i wsp. [56a] stosując bezpośrednią transformację *Arabidopsis* genami *avrB* i *avrRpt2* *Pseudomonas syringae* uzyskali ekspresję tych genów w komórkach roślinnych, które miały mutacje albo w genie *rpm1*, albo w *rps2*. Reakcja nadwrażliwości pojawiła się tylko wtedy, kiedy zarówno aktywny, jak i niezmutowany gen *R* (*rpm1* albo *rps2*) i odpowiadający mu gen awirulencji ulegały ekspresji w tej samej komórce. Podobnie Van den Ackerveken i in. [86a] stosując *Agrobacterium*, aby uzyskać *transient*-ekspresję genu awirulencji *avrBs3* *Xanthomonas campestris* pv. *vesictoria* w wybranych liniach pieprzu zawierających gen odporności *bs3*, obserwowali zależną od białka Bs3 reakcję HR. Wynika z tego sugestia, że produkty genów *avrBs3* i *bs3* współdziałają wewnątrz tej samej komórki roślinnej, a w tym przypadku prawdopodobnie wewnątrz jądra komórkowego. Ponieważ gen *bs3* nie został jeszcze wyizolowany, więc bezpośrednie badania lokalizacji Bs3 i powinowactwa do AvrBs3 będą jeszcze musiały poczekać.

Powyższe wnioski, chociaż są znaczące i ważne, pozostawiają oczywiście wiele otwartych pytań. Pozwalają jednak lepiej zrozumieć mechanizmy patogeniczności i potwierdzają wniosek, że geny awirulencji patogenu (*avr*) kodują czynniki patogeniczności, które dają roślinom możliwość rozpoznawania i uruchamiania odpowiedzi obronnej na patogeny zawierające te geny w swoim genomie. Izolowanie roślinnych genów odporności (R), poznanie ich struktury i funkcji produktów białkowych tych genów, prowadzi do zrozumienia natury interakcji roślina-patogen na poziomie molekularnym, czyli wyjaśnienia, jak jest konkretnie realizowana "stara" koncepcja Flora interakcji rośliny z patogenem, zwana hipotezą *gen-na-gen*.

## LITERATURA

- [1]ASHFIELD T, KEEN NT, BUZZELL RI, INNES RW. Soybean resistance genes specific for different *Pseudomonas syringae* avirulence genes are allelic, or closely linked, at the RPG1 locus. *Genetics* 1995; **141**: 1597–1604.
- [2]BARON C, ZAMBRYSKI PC. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Ann Rev Genetics* 1995; **29**: 107–129.
- [3]BENT AF, KUNKEL BN, DAHLBECK D, BROWN KL, SCHMIDT R, GIRAUDAT J, LEUNG J, STASKAWICZ BJ. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 1994; **265**: 1856–1860.
- [4]BISGROVE SR, SIMONICH MT, SMITH NM, SATTLER A, INNES RW. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell* 1994; **6**: 927–933.
- [5]BRAUN T, SCHOFIELD PR, SPRENGEL R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone specificity. *EMBO J* 1991; **10**: 1885–1890.

- [6]CARLAND FM, STASKAWICZ BJ. Genetic characterisation of the *Pto* locus of tomato: semi-dominance and cosegregation of resistance to *Pseudomonas syringae* pathovar tomato and sensitivity to the insecticide Fenthion. *Mol Gen Genet* 1993; **239**: 17–27.
- [7]CHANG C, SCHALLER GE, PATTERSON SE, KWOK SF, MEYEROWITZ EM, BLEECKER AB. The *TMK1* gene from *Arabidopsis* codes for a protein with structural and biochemical characteristics of a receptor protein kinase. *Plant Cell* 1992; **4**: 1263–1271.
- [8]CHOI K-Y, SATTERBER YB, LYONS DM, ELION EA. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* 1994; **78**: 499–512.
- [9]CULVER JN, DAWSON WO. Tobacco mosaic virus elicitor coat protein genes produce a hypersensitive phenotype in transgenic *Nicotiana glauca* plants. *Mol Plant-Microbe Interact* 1991; **4**: 458–463.
- [10]DANGL JL. Pièce de résistance: Novel classes of plant disease resistance genes. *Cell* 1995; **80**: 363–366.
- [11]DE LORENZO G, CERVONE F, BELLINCAMPI D, CAPRARI C, CLARK AJ, DESIDERIO A, DEVOTO A, FORREST R, LECKIE F, NUSS L, SALVI G. Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell-cell communication. *Biochem Soc Trans* 1994; **22**: 394–397.
- [12]DE WIT PJGM. A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Neth J Plant Pathol* 1977; **83**: 109–122.
- [13]DE WIT PJGM, FLACH W. Differential accumulation of phytoalexins in tomato leaves but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Physiol Plant Pathol* 1979; **15**: 257–267.
- [14]DE WIT PJGM, KODDE E. Induction of polyacetylenic phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after inoculation with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol Plant Pathol* 1981; **18**: 143–148.
- [15]DE WIT PJGM, SPIKMAN G. Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol Plant Pathol* 1982; **21**: 1–11.
- [16]DE WIT PJGM, HOFMAN JE, AARTS JMMJG. Origin of specific elicitors of chlorosis and necrosis occurring in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiol Plant Pathol* 1984; **24**: 17–23.
- [17]DE WIT PJGM, BUURLAGE MB, HAMMOND KE. The occurrence of host-, pathogen- and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* 1986; **29**: 159–172.
- [18]DESPRES C, SUBRAMANIAM R, MATTON DP, BRISSON N. The activation of the potato *PR-10a* gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* 1995; **7**: 589–598.
- [19]DICKINSON MJ, JONES DA, JONES JDG. Close linkage between the *Cf-2/Cf-5* and *Mi* resistance loci in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993; **6**: 341–347.
- [20]DIETRICH RA, DELANEY TP, UKNES SJ, WARD ER, RYALS JA, DANGL JL. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* 1994; **77**: 565–577.
- [21]DIXON MS, JONES DA, HATZIXANTHIS K, GANAL MW, TANKSLEY SD, JONES JDG. High-resolution mapping of the physical location of the tomato *Cf-2* gene. *Mol Plant-Microbe Interact* 1995; **8**: 200–206.
- [22]DIXON MS, JONES DA, KEDDIE JJ, THOMAS C, HARRISON K, JONES JDG. The *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine rich repeat proteins. *Cell* 1996; **84**: 451–459.
- [23]DIXON RA, PAIVA NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; **7**: 1085–1097.
- [24]JELLIS JG, LAWRENCE GJ, FINNEGAN EJ. Developing a transposon tagging system to isolate rust-resistance genes from flax. *Theor Appl Genet* 1992; **85**: 46–54.

- [25] ELLIS JG, LAWRENCE GJ, FINNEGAN EJ, ANDERSON PA. Contrasting complexity of two rust resistance loci in flax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4185–4188.
- [26] FLOR HH. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* 1956; **8**: 29–54.
- [27] FLOR HH. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann Rev Phytopathol* 1971; **9**: 275–296.
- [28] GAEUMANN E. Nauka o infekcyjnych chorobach roślin. PWRiL, Warszawa 1959.
- [29] GRANT MR, GODIARD L, STRAUBE E, ASHFIELD T, LEWALD J, SATTTLER A, INNES RW, DANGL JL. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* 1995; **269**: 843–846.
- [30] GREENBERG JT, GUO A, KLESSIG DF, AUSUBEL FM. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defence functions. *Cell* 1994; **77**: 551–563.
- [31] HAMMOND-KOSACK KE, JONES DA, JONES JDG. Identification of two genes required in tomato for full *Cf-9*-dependent resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant Cell* 1994; **6**: 361–374.
- [32] HAMMOND-KOSACK KE, JONES JDG. Incomplete dominance of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1994; **7**: 58–70.
- [33] HAMMOND-KOSACK KE, SILVERMAN P, RASKIN I, JONES JDG. Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* induce changes in cell morphology and the synthesis of ethylene and salicylic acid in tomato plants carrying the corresponding *Cf* disease resistance gene. *Plant Physiol* 1996; **110**: 1381–1394.
- [34] HASHIMOTO C, HUDSON K, ANDERSON KV. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; **52**: 269–279.
- [35] HONEE G, VAN DEN ACKERVEKEN GFJM, VAN DEN BROEK HWJ, COZIJNSEN TJ, JOOSTEN MHJ, LAUGE R, KOOMAN-GERSMANN M, VERVOORT J, VOGELSANG R, VOSSEN P, WUBBEN JP, DE WIT PJGM. Molecular characterisation of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato. [w] Daniels MJ, Downie A, Osboum A. [red.] *Adv Mol Genet Plant-Microbe Interact*, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic 1994; **3**: 199–206.
- [36] HORN MA, WALKER JC. Biochemical properties of the autophosphorylation of RLK5, a receptor-like protein kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1208**: 65–74.
- [37] HULTMARK D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends Genet* 1993; **9**: 178–183.
- [38] HUNTER T, KARIN M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1992; **70**: 375–387.
- [39] INNES RW. Plant-parasite interactions: has the gene-for-gene model become outdated? *Trends Microbiol* 1995; **3**: 483–485.
- [40] INNES RW, BISGROVE SR, SMITH NM, BENT AF, STASKAWICZ BJ, LIU YC. Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the *Rpg1* locus of soybean. *Plant J* 1993; **4**: 813–820.
- [41] ITO Y, BANNO H, MORIBE T, HINATA K, MACHIDA Y. NPK15, a tobacco protein-serine/threonine kinase with a single hydrophobic region near the amino-terminus. *Mol Gen Genet* 1994; **245**: 1–10.
- [42] JONES DA, DICKINSON MJ, BALINT-KURTI PJ, DIXON MS, JONES JDG. Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993; **6**: 348–357.
- [43] JONES DA, THOMAS CM, HAMMOND-KOSACK KE, BALINT-KURTI PJ, JONES JDG. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 1994; **266**: 789–793.

- [44]JOOSTEN MHAJ, COZIJNSEN TJ, DE WIT PJGM. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 1994; **367**: 384–386.
- [45]JURGOWIAK M, BIAŁKOWSKI K, OLIŃSKI R. Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów. *Post Biochem* 1996; **42**: 6–13.
- [46]KEEN NT, BUZZELL RI. New disease resistance genes in soybean against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor. *Theor Appl Genet* 1991; **81**: 133–138.
- [47]KERR EA, BAILEY DL. Resistance to *Cladosporium fulvum* Cooke obtained from wild species of tomato. *Can J Bot* 1964; **42**: 1541–1554.
- [48]KOBÉ B, DEISENHOFER J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS* 1994; **19**: 415–421.
- [49]KUNKEL BN, BENT AF, DAHLBECK D, INNES RW, STASKAWICZ BJ. RPS2, an *Arabidopsis* disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell* 1993; **5**: 865–875.
- [50]LAWRENCE GJ, FINNEGAN EJ, ELLIS JG. Instability of the *L6* gene for rust resistance in flax is correlated with the presence of a linked *Ac* element. *Plant J* 1993; **4**: 659–669.
- [51]LAWRENCE GJ, FINNEGAN EJ, AYLIFFE MA, ELLIS JG. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* 1995; **7**: 1195–1206.
- [52]LAWTON MA, LAMB CJ. Transcriptional activation of plant defence genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 335–341.
- [53]LAZAROVITS G, HIGGINS VJ. Historical comparison of *Cladosporium fulvum* race 1 on immune, resistant, and susceptible tomato varieties. *Can J Bot* 1976; **54**: 224–234.
- [54]LAZAROVITS G, HIGGINS VJ. Ultrastructure of susceptible, resistant, and immune reactions of tomato to races of *Cladosporium fulvum*. *Can J Bot* 1976; **54**: 235–249.
- [55]LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON R, LAMB C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 1994; **79**: 583–593.
- [56]LINDGREN PB, PEET RC, PANOPOULOS NJ. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol* 1986; **168**: 512–522.
- [56a] LEISTER RT, AUSUBEL FM, KATAGIRI F. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* and *RPM1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 15497–15502.
- [57]LOH Y-T, MARTIN GB. The *Pto* bacterial resistance gene and the *Fen* insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1735–1739.
- [58]LOW PS, MERIDA JR. The oxidative burst in plant defence: function and signal transduction. *Physiol Plant* 1996; **96**: 533–542.
- [59]MACKILL DJ, BONMAN JM. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology* 1992; **82**: 746–749.
- [60]MARTIN GB, BROMMONSCHENKEL SH, CHUNWONGSE J, FRARY A, GANAL MW, SPIVEY R, WU T, EARLE ED, TANKSLEY SD. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 1993; **262**: 1432–1436.
- [61]MARTIN GB, BROMMONSCHENKEL SH, CHUNWONGSE J, EARLE ED, TANKSLEY SD. A member of the tomato *Pto* gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death. *Plant Cell* 1994; **6**: 1543–1552.
- [62]MAY MJ, HAMMOND-KOSACK KE, JONES JDG. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the *Cf*-gene-dependent defence response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol* 1996; **110**: 1367–1379.

- [63]MINDRINOS M, KATAGIRIF, YU G-L, AUSUBEL FM. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 1994; **78**: 1089–1099.
- [64]MU J, LEE H, KAO T. Characterisation of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* 1994; **6**: 709–721.
- [65]MUKHERJEE D, LAMBERT JW, COOPER RL, KENNEDY BW. Inheritance of resistance to bacterial blight (*Pseudomonas glycinea* Coerper) in soybeans (*Glycine max* L.). *Crop Sci* 1966; **6**: 324–326.
- [66]NEIMAN AM. Conservation and reiteration of a kinase cascade. *Trends Genet* 1993; **9**: 390–394.
- [67]NEIMAN AM, HERSKOWITZ I. Reconstitution of a yeast protein kinase cascade *in vitro*: activation of the yeast MEK homolog STE7 by STE11. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 3398–3402.
- [68]OLIVER RP, FARMAN ML, JONES JDG, HAMMOND-KOSACK KE. Use of fungal transformants expressing-glucuronidase activity to detect infection and measure hyphal biomass in infected plant tissues. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993; **6**: 521–525.
- [69]PEEVER TL, HIGGINS VJ. Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol* 1989; **90**: 867–875.
- [70]PERSSON C, NORDFELTH R, HOLMSTROM A, HAKANSSON S, ROSQUIST R, WOLF-WATZ H. Cell-surface-bound Yersinia translocate the protein phosphatase YopH by a polarised mechanism into the target cell. *Mol Microbiol* 1995; **18**: 135–150.
- [71]REUBER TL, AUSUBEL FM. Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the *RPS2* and *RPM1* disease resistance genes. *Plant Cell* 1996; **8**: 241–249.
- [72]RITTER C, DANGL JL. Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *Plant Cell* 1996; **8**: 251–257.
- [73]ROMMENS CMT, SALMERON JM, BAULCOMBE DC, STASKAWICZ BJ. Use of a gene expression system based on potato virus X to rapidly identify and characterise a tomato *Pto* homolog that controls fention sensitivity. *Plant Cell* 1995; **7**: 249–257.
- [74]RONALD PC, SALMERON JM, CARLAND FM, STASKAWICZ BJ. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bacteriol* 1992; **174**: 1604–1611.
- [75]ROSQVIST R, MAGNUSSON KE, WOLF-WATZ H. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* 1994; **13**: 964–972.
- [76]ROSQUIST R, HAKANSSON S, FORSBERG A, WOLF-WATZ H. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae, and shigellae. *EMBO J* 1995; **14**: 4187–4195.
- [77]SALMERON JM, BARKER SJ, CARLAND FM, MEHTA AY, STASKAWICZ BJ. Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell* 1994; **6**: 511–520.
- [78]SALMERON JM, OLDROYD GED, ROMMENS CMT, SCOFIELD SR, KIM H-S, LABELLE DT, DAHLBECK D, STASKAWICZ BJ. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase cluster. *Cell* 1996; **86**: 123–133.
- [78a] SCOFIELD SR, TOBIAS CM, RATHJEN JP, CHANG JH, LABELLE DT, MICHELMORE RW, STASKAWICZ BJ. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 1996; **274**: 2063–2065.

- [79]SIMS JE, ACRES B, GRUBIN CE, MCMAHAN CJ, WIGNALL JM, MARCH CJ, DOWER SK. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 8946–8950.
- [80]SONG W-Y, WANG G-L, CHEN L-L, KIM H-S, PIL-Y, HOLSTENT, GARDNER J, WANG B, ZHAI W-X, ZHU L-H, FAUQUET C, RONALD P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 1995; **270**: 1804–1806.
- [81]STASKAWICZ BJ, AUSUBEL FM, BAKER BJ, ELLIS JG, JONES JDG. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 1995; **268**: 661–667.
- [82]STEIN JC, HOWLETT B, BOYES DC, NASRALLAH ME, NASRALLAH JB. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8816–8820.
- [82a] TANG X, FEDERICK RD, ZHOU J, HALTERMAN DA, JIA Y, MARTIN GB. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* 1996; **274**: 2060–2063.
- [83]TIGCHELAAR EC. Collections of isogenic tomato stocks. *Rep Tomato Genet Coop* 1984; **34**: 55–57.
- [84]TOURVIEILLE B, GORMAN SD, FIELD EH, HUNKAPILLER T, PARNES JR. Isolation and sequence of L3T4 complementary DNA clones: Expression in T cells and brain. *Science* 1986; **234**: 610–614.
- [85]TRAUT TW. The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments than form different types of nucleotide binding sites. *Eur J Biochem* 1994; **222**: 9–19.
- [86]VAN DEN ACKERVEKEN GFJM, VAN KAN JAL, DE WIT PJGM. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J* 1992; **2**: 359–366.
- [86a] VAN DEN ACKERVEKEN GFJM, MAROIS E, BONAS U. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 1996; **87**: 1307–1316.
- [87]VERA-ESTRELLA R, BLUMWALD E, HIGGINS VJ. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells. Evidence of the involvement of active oxygen species. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1208–1215.
- [88]WHITHAM S, DINESH-KUMAR SP, CHOI D, HEHL R, CORR C, BAKER B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 1994; **78**: 1101–1115.
- [89]YU G-L, KATAGIRI F, AUSUBEL FM. *Arabidopsis* mutations at the RPS2 locus result in loss of resistance to *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1993; **6**: 434–443.
- [90]YU LM, LAMB CJ, DIXON RA. Purification and biochemical characterisation of proteins which bind to the H-box cis-element implicated in transcriptional activation of plant defence genes. *Plant J* 1993; **3**: 805–816.
- [91]ZHOU J, LOH Y-T, BRESSAN RA, MARTIN GB. The tomato gene *PtiI* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by PTO and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 1995; **83**: 925–935.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 03.12.1996 r.

Przyjęto: 20.03.1997 r.

Adres autora: Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk,  
60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 34





## MASTOCYTY I FIBROBLASTY – OBOJĘTNI SĄSIEDZI CZY PRZYJAŹNI PARTNERZY?

### MAST CELLS AND FIBROBLASTS – INDIFFERENT NEIGHBOURS OR FRIENDLY PARTNERS?

Ewa BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK<sup>1</sup>, Anna ZALEWSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Samodzielna Pracownia Immunologii Doświadczalnej oraz

<sup>2</sup>Klinika Dermatologii, Akademia Medyczna w Łodzi

*Streszczenie.* Mastocyty i fibroblasty są jednymi z najważniejszych komórek wchodzących w skład tkanki łącznej właściwej. Obserwacje morfologiczne wskazały na ich bliskie sąsiedztwo w tkance. W pracy scharakteryzowano obie populacje komórek oraz przedstawiono i omówiono wzajemne oddziaływania i zależności pomiędzy mastocytami i fibroblastami.

*Słowa kluczowe:* mastocyty, fibroblasty, powiązania międzykomórkowe

*Summary.* Mast cells and fibroblasts belong to the most important cellular elements forming connective tissue. Morphological observations have shown their close proximity in the tissue. In this paper mast cells and fibroblasts have been presented and their mutual interactions and relationships have been described.

*Key words:* mast cells, fibroblasts, intercellular relationships

*Wykaz skrótów:* **MMC** (ang. *mucosal mast cells*) – mastocyty błon śluzowych; **CTMC** (ang. *connective tissue mast cells*) – mastocyty tkanki łącznej; **MCTC** – mastocyty tryptazo-chymazo-dodatnie; **MCT** – mastocyty tryptazo-dodatnie; **BMMC** (ang. *mouse bone marrow-derived mast cells*) – mysie mastocyty pochodzące ze szpiku kostnego; **PG** – prostaglandyna; **LT** – leukotrien; **PAF** – (ang. *platelet activating factor*) – czynnik aktywujący płytki; **IFN** – interferon; **IL** – interleukina; **SCF** (ang. *stem cell factor*) – czynnik wzrostowy komórek macierzystych; **MGF** (ang. *mast cell growth factor*) – czynnik wzrostowy mastocytów; **NGF** (ang. *nerve growth factor*) – czynnik wzrostu nerwów; **bFGF** (ang. *basic fibroblast growth factor*) – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów; **M-CSF** (ang. *macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie makrofagów; **G-CSF** (ang. *granulocyte colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytarne; **GM-CSF** (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe; **EGF** (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; **TGF** (ang. *transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu; **TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworu; **MMCP** (ang. *mouse*

*mast cell protease*) – proteaza mastocytów myszy; **RMCP** (ang. *rat mast cell protease*) – proteaza mastocytów szczura; **MCAF** (ang. *monocyte chemotactic and activating factor*) – monocytarny czynnik chemotaktyczny i aktywujący; **MIP** (ang. *macrophage inflammatory protein*) – zapalna proteina makrofagowa; **TCA** (ang. *T cell activating antigen*) – aktywujący komórki T antygen; **ECF-A** (ang. *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*) – czynnik chemotaktyczny dla eozynofili; **NCF-A** (ang. *neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis*) – czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów; **ICAM** (ang. *intercellular adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; **VCAM** (ang. *vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń; **LFA** (ang. *leukocyte function-associated antigen*) – antygen związany z czynnością limfocytów; **LPAM** (ang. *lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule*) – limfocytarna cząsteczka adhezji na kępkach Peyera; **VLA** (ang. *very late antigen*) – antygen bardzo późny; **VNR** (ang. *vitronectin receptor*) – receptor dla witronektyny;

## WPROWADZENIE

Mastocyty (komórki tuczne) i fibroblasty są jednymi z komórek budujących tkankę łączną właściwą (zarówno włóknistą luźną, jak i włóknistą zwartą). Mastocyty znajdują się z reguły w pobliżu naczyń krwionośnych, naczyń limfatycznych i zakończeń włókien nerwowych. Fibroblasty są bardziej równomiernie rozmieszczone w tkance, chociaż liczniej gromadzą się wzdłuż włókien kolagenu.

Od dawna zastanawiano się, czy obie populacje komórek są tylko przypadkowymi i obojętnymi względem siebie sąsiadami, czy też istnieją między nimi zależności i powiązania czynnościowe. A jeżeli takie powiązania istnieją, to czy mastocyty i fibroblasty wspólnie tworzą przyjazną i dobrze współpracującą koalicję, czy też są one w stosunku do siebie we wrogiej opozycji. W niniejszym opracowaniu przedstawimy obie komórki i przeanalizujemy ich wzajemne relacje, aby próbować odpowiedzieć na pytanie: mastocyty i fibroblasty – obojętni sąsiedzi czy przyjaźni partnerzy?

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA MASTOCYTÓW

Pomimo wielu badań prowadzonych w różnych laboratoriach pochodzenie mastocytów oraz przebieg procesu ich różnicowania i dojrzewania, nie zostały do dzisiaj ostatecznie wyjaśnione. Powszechnie jednak akceptowany jest pogląd, że prekursorzy mastocytów powstają z wielopotencjalnych komórek krwiotwórczych szpiku kostnego. Komórki prekursorowe mastocytów człowieka należą do linii CD34+ [41]. Ze szpiku kostnego wędrują one do krwi, przy czym wykazano, że liczba krążących komórek prekursorowych (opisywanych jako "komórki pozbawione ziarnistości") jest niewielka [37]. Komórki prekursorowe mastocytów znajdujące się w krążeniu wykazują już ekspresję receptorów FcεRI i c-kit. Z krwioobiegu

komórki prekursorowe wędrują do tkanek jako komórki niedojrzałe i tam dopiero, pod wpływem czynników mikrośrodowiska, ostatecznie się różnicują i dojrzewają.

Czynniki humoralne regulujące proliferację, różnicowanie i ostateczne dojrzewanie komórek tucznych są bardzo liczne i do dzisiaj do końca nie poznane. Bez wątplenia główną cytokiną wpływającą na te procesy jest czynnik wzrostowy komórek macierzystych (SCF; synonimy: ligand receptora c-kit, czynnik wzrostowy komórek tucznych – MGF). Ponadto istotny wpływ wydają się mieć, przynajmniej u gryzoni, interleukiny 3, 4, 9 i 10 (IL-3, IL-4, IL-9, IL-10) oraz czynnik wzrostu nerwów (NGF) [36, 37, 42, 88].

Mastocyty nie stanowią jednorodnej populacji komórek [74, 89, 90]. U gryzoni wyróżniono dwie podstawowe subpopulacje - komórki tuczne tkanki łącznej (CTMC) (tzw. "typowe" komórki tuczne) oraz komórki tuczne błon śluzowych (MMC) (tzw. "atypowe" komórki tuczne). U człowieka odpowiednikami subpopulacji mastocytów gryzoni są: subpopulacja  $MC_{TC}$  oraz subpopulacja  $MC_T$ . Podział komórek tucznych na dwie odrębne subpopulacje oparty jest przede wszystkim na obecności w ziarnistościach mastocytów rodzaju obojętnych proteaz. Ziarnistości komórek subpopulacji CTMC ( $MC_{TC}$ ) zawierają przynajmniej dwa rodzaje obojętnych proteaz (w mastocytach człowieka są to tryptaza i chymaza), ziarnistości mastocytów subpopulacji MMC ( $MC_T$ ) zawierają jeden typ obojętnej proteazy (u człowieka jest to tryptaza). Należy podkreślić, że praktycznie w każdym narządzie znajdują się obie subpopulacje, chociaż w różnym składzie procentowym. Mastocyty typu CTMC ( $MC_{TC}$ ) liczebnie dominują w skórze i błonie podśluzowej układu pokarmowego, mastocyty typu MMC ( $MC_T$ ) dominują w błonie śluzowej układu oddechowego i układu pokarmowego.

Komórki tuczne obu subpopulacji różnią się wieloma cechami morfologicznymi [11, 17, 60]. Mastocyty "typowe" są większe, ich ziarnistości są jednolitego kształtu i wielkości, a struktury parakrystaliczne mają postać kratki o znacznej gęstości elektronowej. Mastocyty "atypowe" są mniejsze, ziarnistości mają mniej liczne, a struktury parakrystaliczne tych ziarnistości są ułożone spiralnie. Poza tymi różnicami morfologicznymi obie subpopulacje cechują się istotnie różną zawartością mediatorów. Zagadnienie to będzie jeszcze przedstawione w dalszym ciągu opracowania.

Mastocyty wykazują ekspresję wielu różnych struktur powierzchniowych. Bez wątplenia, najważniejszym receptorem błonowym, warunkującym udział komórek tucznych w reakcjach nadwrażliwości typu I, jest receptor o wysokim powinowactwie dla IgE ( $Fc\epsilon RI$ ) [59]. W błonie mastocytów znajdują się także receptory dla wielu cytokin, w tym przede wszystkim dla IL-4 i SCF, a także antygen CD43 (leukosialina). Udokumentowano również występowanie niektórych cząsteczek adhezyjnych, chociaż z pewnością zagadnienie to nie jest dzisiaj do końca poznane. Wiadomo jednak, że w błonie mastocytów znajdują się: adresyna naczyniowa ICAM-1 (antygen CD54), selektyna L oraz liczne integryny –  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4; LPAM-2),

$\alpha_4\beta_7$  (LPAM-1),  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5),  $\alpha_v\beta_2$  (VNR),  $\alpha_E\beta_7$  (HML-1), oraz, jak ostatnio wykazano, integryna  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1). Jak się wydaje ekspresja cząsteczek adhezyjnych na mastocytach zależy w znacznej mierze od stopnia dojrzałości komórek oraz ich stanu czynnościowego. Na przykład, ekspresja integryny  $\alpha_4\beta_7$  jest bardzo wysoka na mastocytach niedojrzałych (znajdujących się w krwioobiegu), natomiast komórki dojrzałe, osiadłe w tkankach, wykazują już znacząco mniejszą ekspresję tej integryny. Ekspresja integryny  $\alpha_E\beta_7$  jest znacznie zwiększana pod wpływem stymulacji transformującym czynnikiem wzrostu beta (TGF- $\beta$ ), a także po aktywacji mastocytów w wyniku mostkowania receptorów Fc $\epsilon$ RI. Z kolei ekspresja adresyny ICAM-1, stosunkowo niewielka na mastocytach spoczynkowych, znacznie wzrasta pod wpływem IL-4 [45, 57, 79, 86, 88, 92].

Komórki tuczne są źródłem wielu mediatorów i cytokin o szerokim zakresie biologicznych aktywności [58, 77]. Tradycyjnie mediatory mastocytów przyjęto dzielić na trzy grupy:

- (1) preformowane, magazynowane w ziarnistościach i uwalniane bardzo szybko po stymulacji komórki,
- (2) wytwarzane wtórnie w odpowiedzi na stymulację i uwalniane znacznie wolniej,
- (3) cytokiny.

Mediatory uwalniane z mastocytów są zbiorczo przedstawione w tabelach 1 i 2. Należy jednak z całym naciskiem podkreślić, że subpopulacje mastocytów różnią się dość znacznie zawartością poszczególnych mediatorów, a także, iż występują pewne różnice w zawartości mediatorów pomiędzy mastocytami różnych gatunków zwierząt.

Jak przedstawiono w tabeli 1, do grupy mediatorów preformowanych należą aminy biogenne – histamina i serotonina. Zawartość histaminy jest ogólnie bardzo wysoka, chociaż w mastocytach subpopulacji CTMC jest jej znacznie więcej (10–30 pg/komórkę) niż w ziarnistościach mastocytów subpopulacji MMC (1–3 pg/komórkę). Histamina jest zmagazynowana w postaci kompleksu z proteoglikanami ziarnistości. Serotonina jest obecna w ziarnistościach mastocytów typu CTMC u gryzoni, natomiast mastocyty gryzoni typu MMC oraz mastocyty człowieka serotoniny nie zawierają. Proteoglikany obecne w ziarnistościach mastocytów, stanowiące około 30% zawartości ziaren wydzielniczych, to heparyna i/lub siarczan chondroityny; heparyna występuje głównie w ziarnistościach mastocytów typu CTMC, siarczan chondroityny w ziarnistościach mastocytów typu MMC. Obojętne proteazy, stanowiące niezwykle istotną grupę mediatorów komórek tucznych, występują w ziarnistościach wszystkich typów mastocytów w kompleksie z proteoglikanami. Dla różnych typów mastocytów charakterystyczne są różne rodzaje obojętnych proteaz. W ziarnistościach mastocytów mysich stwierdzono obecność pięciu różnych rodzajów chymazy (MMCP-1, -2, -3, -4, -5), dwóch rodzajów tryptazy (MMCP-6, -7) i jednego rodzaju karboksypeptydazy A. W mastocytach mysich

TABELA 1. Mediatorzy produkowane przez mastocyty  
[3, 7, 8, 24, 25, 34, 58, 66, 69, 70, 76, 77, 78, 82]

PREFORMOWANE	<p>Aminy biogenne: histamina, serotonina</p> <p>Proteoglikany: heparyna, siarczan chondroityny</p> <p>Enzymy: 1. Obojętne proteazy chymaza tryptaza karboksypeptydaza A lub B</p> <p>2. Kwaśne hydrolazy arylosulfataza <math>\beta</math>-heksozaminidaza <math>\beta</math>-galaktozydaza <math>\beta</math>-glukuronidaza</p> <p>3. Pozostałe proteazy elastaza katepsyna G kininogenaza</p> <p>4. Enzymy utleniające peroksydaza dysmutaza nadtlenkowa</p> <p>Czynniki chemotaktyczne dla eozynofików (ECF-A) dla neutrofilów (NCF-A)</p> <p>Czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</p>
WTÓRNE	<p>Czynnik aktywujący płytki krwi (PAF)</p> <p>Prostaglandyny (głównie PGD<sub>2</sub>)</p> <p>Leukotrieny (głównie LTC<sub>4</sub>)</p>
INNE	<p>Zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (bFGF)</p> <p>Kolageny typów IV oraz VIII</p> <p>Łańcuchy <math>\beta</math>1, <math>\beta</math>2 lamininy</p> <p>Tlenek azotu (NO)</p>

typu MMC występują jedynie dwa rodzaje chymazy (MMCP-1, -2). W mastocytach mysich typu CTMC stwierdzono obecność trzech rodzajów chymaz (MMCP-3, -4, -5), dwóch rodzajów tryptaz (MMCP-6, -7) oraz karboksypeptydazy A. W ziarnistościach mastocytów szczura wykazano obecność: chymazy RMCP-2 (w komórkach tucznych typu MMC), chymazy RMCP-1, tryptazy i karboksypeptydazy A (w komórkach tucznych typu CTMC). U człowieka mastocyty subpopulacji MC<sub>TC</sub> zawierają tryptazę, chymazę i karboksypeptydazę B, a mastocyty subpopulacji MC<sub>T</sub> – tryptazę, i być może niewielką ilość chymazy. Druga grupa enzymów zlokalizowanych w ziarnistościach komórek tucznych to kwaśne hydrolazy: arylosulfataza,  $\beta$ -heksozaminidaza,  $\beta$ -galaktozydaza,  $\beta$ -glukuronidaza. Ich rozmieszczenie w poszczególnych subpopulacjach mastocytów nie zostało jeszcze dokładnie opisane. W ziarnistościach mastocytów znajdują się także czynniki chemotaktyczne dla eozynofików (ECF-A) i czynniki chemotaktyczne dla neutrofilów (NCF-A), a także

TABELA 2. Cytokiny produkowane przez mastocyty [3, 23, 46, 63]

INTERLEUKINY	IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13
CHEMOKINY	Zapalne proteiny makrofagowe 1 $\alpha$ i 1 $\beta$ (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) Aktywujący komórki T antygen 3 (TCA-3) Monocytny czynnik chemotaktyczny i aktywujący (MCAF)
INNE	Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) Czynnik martwicy nowotworu alpha (TNF- $\alpha$ ) Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- $\beta$ ) Czynnik stymulujący kolonie granulocytarno-makrofagowe (GM-CSF)

kininogenaza, elastaza, katepsyna G oraz enzymy utleniające: peroksydaza i dysmutaza nadtlenkowa [3, 8, 34, 76].

W ostatnich latach udokumentowano dodatkowo, iż ziarnistości komórek tłuszcznych zawierają także zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów (bFGF) [66, 69], oraz czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ) [24, 25].

Mediatorami lipidowymi wytwarzanymi wtórnie po aktywacji komórki są czynnik aktywujący płytki (PAF) oraz produkty przemian fosfolipidów błonowych – prostaglandyny (głównie PGD<sub>2</sub>) i leukotrieny (głównie LTC<sub>4</sub>). Należy jednak w tym miejscu podkreślić, iż w mastocytach typu MMC przemiany kwasu arachidonowego prowadzą w zasadzie w kierunku powstawania LTC<sub>4</sub> (proporcja LTC<sub>4</sub>:PGD<sub>2</sub> wynosi jak 25:1), natomiast w mastocytach typu CTMC w kierunku wytwarzania PGD<sub>2</sub> (proporcja LTC<sub>4</sub>:PGD<sub>2</sub> wynosi jak 1:40) [70].

Mastocyty są również bardzo ważnym źródłem wielu cytokin, w tym niektórych chemokin [23, 46, 63]. Ich listę przedstawiono szczegółowo w tabeli 2. Należy jednak wyraźnie podkreślić, iż obecny stan badań w tym zakresie nie pozwala jeszcze na ostateczne sprecyzowanie listy "mastokin", gdyż:

(1) badania są prowadzone na bardzo różnych populacjach mastocytów (w tym na liniach hodowlanych),

(2) w wielu przypadkach wykazano w komórkach tłuszcznych jedynie obecność mRNA dla danej cytokiny, co jeszcze nie jest przecież ostatecznym dowodem na to, iż komórki wydzielają te cytokiny. Niezwykle istotne przy tym wydają się być obserwacje, iż zakres indukcji genów dla cytokin zależy od rodzaju czynnika aktywującego mastocyty oraz że w niektórych przypadkach komórki tłuszczne syntetyzują i wydzielają cytokiny bez równoczesnej egzocytozy ziarnistości i sekrecji mediatorów preformowanych [10, 47].

Ostatnio wykazano, że komórki tłuszczne produkują kolagen typu IV i kolagen typu VIII, a także łańcuchy  $\beta_1$  i  $\beta_2$  lamininy [72, 82]. Są także źródłem tlenu azotu (NO) [7].

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA FIBROBLASTÓW

Budowa fibroblastów i miofibroblastów, uważanych za formy pośrednie pomiędzy fibroblastami a komórkami mięśni gładkich, jest dobrze znana [32, 60, 81]. W ostatnich latach wskazuje się coraz częściej na zróżnicowanie fibroblastów na poszczególne subpopulacje, chociaż zagadnienie to nie jest do końca zbadane. Co wydaje się szczególnie interesujące, zróżnicowanie fibroblastów jest związane nie tylko z danym narządem, ale także różne rodzaje fibroblastów można spotkać w obrębie ściśle określonej przestrzeni anatomicznej. Dla przykładu, Knapp i wsp. [43] opisali różne subpopulacje fibroblastów w skórze zdrowej oraz zbliznowaciałej, a Harper [29] wskazał na różnice pomiędzy fibroblastami warstwy brodawkowej i warstwy siateczkowej skóry; fibroblasty warstwy brodawkowej cechowały się znacznie wyższym potencjałem proliferacyjnym. Niezwykle interesujące wydają się być obserwacje Sappino i wsp. [75] oraz Skalli i wsp. [78] dotyczące przekształconych fibroblastów, tj. miofibroblastów. Badacze ci wykazali, iż miofibroblasty mogą różnić się ekspresją białek cytoszkieletu i izoform aktyny. Na podstawie tych kryteriów badacze ci wyróżnili cztery różne subpopulacje miofibroblastów wykazujące ekspresję:

wimentyny (komórki V),

wimentyny i desminy (komórki VD),

wimentyny i  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich (komórki VA),

wimentyny, desminy i  $\alpha$ -aktyny mięśni gładkich (komórki VAD).

Fibroblasty wykazują ekspresję wielu cząsteczek adhezyjnych. Wśród nich adreliny naczyniowe – ICAM-1 i VCAM-1 i integryny –  $\alpha_3\beta_1$  (VLA-3),  $\alpha_6\beta_4$  (VLA-6),  $\alpha_v\beta_3$  (VNR).

Fibroblasty produkują włókna kolagenowe, siateczkowe i sprężyste, a także większość proteoglikanów tkanki łącznej. Syntetyzują również w znaczących ilościach liczne białka niekolagenowe – fibronektynę, tenascynę, entaktynę, undulinę i trombospodynę. Mogą także syntetyzować cholesterol [38]. Fibroblasty są także bardzo ważnym źródłem kolagenazy. Enzym ten jest wydzielany w postaci nieaktywnej, a w przestrzeni pozakomórkowej aktywowany przez stromelizynę. Równocześnie, fibroblasty syntetyzują inhibitor kolagenazy [38, 64, 83].

Wykazano, iż fibroblasty stanowią również ważne źródło wielu cytokin. Należą do nich IL-1, IL-6, IL-8, czynnik stymulujący kolonie makrofagowe (M-CSF), czynnik stymulujący kolonie granulocyta-makrofagowe (GM-CSF), czynnik stymulujący kolonie granulocytarne (G-CSF), TNF- $\alpha$ , monocytarny czynnik chemotaktyczny i aktywujący (MCAF), interferon beta (IFN- $\beta$ ), a także SCF i FGF [21, 71]. Prawdopodobnie fibroblasty syntetyzują także czynnik wzrostu nerwów (NGF) [85]. Substancje produkowane i wydzielane przez fibroblasty są zbiorczo przedstawione w tabeli 3.

TABELA 3. Substancje produkowane przez fibroblasty [21, 38, 64, 71, 83, 85]

SKŁADNIKI SUBSTANCJI POZA- KOMÓRKOWEJ	Włókna: kolagenowe, siateczkowe, sprężyste Proteoglikany: kwas hialuronowy, siarczan chondroityny, siarczan heparanu, siarczan dermatanu Białka niekolagenowe: fibronektyna, tenascyna, entaktyna, undulina, trombospondyna
ENZYMY	Kolagenaza Proteazy serynowe
INHIBITORY ENZYMÓW	Inhibitor kolagenazy Inhibitory proteaz
CYTOKINY	Interleukiny: IL-1, IL-6, IL-8 Czynnik stymulujący kolonie makrofagowe (M-CSF) Czynnik stymulujący kolonie granulocyta-makrofagowe (GM-CSF) Czynnik stymulujący kolonie granulocyta (G-CSF) Czynnik wzrostowy fibroblastów (FGF) Czynnik wzrostu nerwów (NGF) Czynnik wzrostowy komórek pnia (SCF) Czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ) Interferon beta (IFN- $\beta$ ) Monocyta czynnik chemotaktyczny i aktywujący (MCAF)

## ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY MASTOCYTAMI A FIBROBLASTAMI

Mastocyty i fibroblasty oddziałują wzajemnie na siebie, w różnorodny sposób wpływając na swoją aktywność biologiczną. Wydaje się obecnie, iż zależności te są bardzo złożone i wielokierunkowe.

**Obserwacje morfologiczne.** W preparatach histologicznych, pochodzących z tkanek zarówno zdrowych, jak i zmienionych chorobowo, zaobserwowano, iż mastocyty i fibroblasty położone są w tkance z reguły bardzo blisko siebie, często do siebie przylegając, a nawet wzajemnie się "przeplatając" [31, 43]. Zaobserwowano także i opisano idące od fibroblastów w kierunku mastocytów długie wypustki cytoplazmatyczne [31, 40]. Szczegółowe badania ultrastrukturalne udokumentowały, iż przyleganie obu komórek może mieć charakter prosty, tzn. błony plazmatyczne przebiegają mniej więcej równolegle. Może także występować wzajemne wpuklanie błon komórkowych i tworzenie drobnych mikrofałdów. Niekiedy dochodzi do wytworzenia wyspecjalizowanych połączeń między oboma komórkami w postaci drobnych mostków (kanalików) przebiegających od jednej komórki do drugiej w najwęższym miejscu przylegających przestrzeni międzykomórkowych. Opisano także tworzenie połączeń polegających na powstawaniu cytoplazmaty-



cznych wiązek mikrofilamentów [22, 27]. W miejscu przylegania do mastocytów na terenie cytoplazmy fibroblastów obserwowano liczne pęcherzyki pinocytarne. I chociaż struktury te były obserwowane także w obszarach "nieprzylegających" do komórek tucznych, ich obecność może świadczyć o zjawisku wymiany metabolicznej pomiędzy mastocytami a fibroblastami.

W warunkach *in vitro* na hodowlach mastocytów i fibroblastów również wskazano, iż oba typy komórek wzajemnie do siebie przylegają. Zaobserwowano także, że czasem przyleganie obu komórek staje się mniej wyraźne, komórki "odsuwają się" od siebie a mastocyty pozostawiają skupienia ziarnistości [27]. Ziarnistości te są pochłaniane przez fibroblasty. Ten transfer ziarnistości mastocytów został nazwany "transgranulacją" [9, 27]. Transgranulacja ziarnistości jest kilkuetapowym procesem, podczas którego następują kolejno:

(1) utworzenie przez mastocyty pseudopodiów i zbliżenie ich do powierzchni fibroblasta,

(2) wytworzenie wyspecjalizowanych połączeń pomiędzy przylegającymi komórkami,

(3) zmiany w obrębie ziarnistości komórek tucznych znajdujących się w pseudopodium,

(4) przeniesienie wydzielonych ziarnistości do cytoplazmy przylegającego fibroblasta [27].

Proces fagocytozy ziarnistości mastocytów jest zależny od czasu; w hodowli fibroblastów do której dodano izolowane ziarnistości komórek tucznych liczba tych ziarnistości na terenie cytoplazmy fibroblastów wzrastała powoli i po 24 godzinach była największa [2]. Po tym czasie liczba ziarnistości pochłoniętych przez fibroblasta stopniowo malała, co wskazuje, iż fibroblasty rozkładają (degradują) matrix ziarnistości [61]. Rao i wsp. [67] sugerowali, że proces fagocytozy ziarnistości jest czynnikiem pobudzającym aktywność fibroblastów.

**Wpływ fibroblastów na mastocyty.** Wpływ fibroblastów na komórki tuczne wyraża się przede wszystkim poprzez ich wielostronne oddziaływanie na proliferację, różnicowanie i dojrzewanie mastocytów, i to na wszystkich etapach tych procesów.

Levi-Schaffer i wsp. [12, 49, 50], prowadząc hodowlę mysich mastocytów pochodzących ze szpiku kostnego (*mouse bone marrow-derived mast cells* – BMDC) -wykazujących cechy typowe dla subpopulacji MMC – z fibroblastami 3T3 (linia pochodząca z fibroblastów skóry myszy) zaobserwowali, iż po 10–14 dniach w hodowli obecne są dojrzałe mastocyty o cechach subpopulacji CTMC. Mastocyty te bowiem charakteryzowały się znaczną zawartością proteoglikanów i wysoką zawartością histaminy (15 razy wyższą niż w komórkach wyjściowych). Wykazywały także charakterystyczną dla mastocytów CTMC morfologię ziarnistości (macierz ziarnistości elektronowogęsta, homogenna). Ci sami badacze prowadząc hodowlę szczurzych dojrzałych mastocytów o cechach subpopulacji CTMC z fibroblastami 3T3 udokumentowali, iż w tych warunkach hodowlanych mastocyty zachowują

swoją aktywność biologiczną co najmniej przez 30 dni [48, 54]. W obu układach doświadczalnych wykazano także, że mastocyty hodowane z fibroblastami 3T3 (oraz innymi liniami fibroblastów) [53] cechują się wyższą zdolnością uwalniania histaminy pod wpływem stymulacji IgE-zależnej i stymulacji IgE-niezależnej (anafilakoidalnej) oraz zwiększoną syntezą  $LTB_4$  i  $PGD_2$ . Ponadto, w obecności fibroblastów obserwowano szybszą regenerację morfologiczną i biochemiczną komórek tucznych po ich aktywacji [51].

Dvorak i wsp. [14, 19] prowadząc hodowlę ludzkich komórek jądrzastych, otrzymanych z krwi pępowinowej, z fibroblastami 3T3 udokumentowali, iż po 11–14 tygodniach hodowli w zawieszynie komórek obecne są komórki tuczne. Mastocyty te były funkcjonalnie dojrzałe, zawierały 1,4–2,8  $\mu\text{g}$  histaminy/ $10^6$  komórek, wykazywały ekspresję receptora  $Fc\epsilon RI$  (około  $10^5$  cząsteczek receptora/komórkę) i odpowiadały uwalnianiem histaminy na stymulację anty-IgE [19, 36]. Morfologicznie charakteryzowały się dużą liczbą ziarnistości zawierających tryptazę i chymazę [19]. Kirshenbaum i wsp. [41] wyhodowali komórki tuczne z komórek  $CD34+$  człowieka w hodowli z fibroblastami 3T3. Również Irani i wsp. [35] otrzymali dojrzałe mastocyty hodując komórki wątroby płodowej z fibroblastami 3T3.

Wpływ fibroblastów na procesy różnicowania i dojrzewania mastocytów odbywa się przede wszystkim poprzez wytwarzany w dużych ilościach przez te komórki SCF. SCF oddziałuje na mastocyty poprzez transbłonowy receptor związany z kinazą tyrozynową (antygen  $CD117$ ) [86] kodowany przez protoonkogen *c-kit* [33]. Receptor ten pojawia się na komórkach tucznych już w bardzo wczesnych stadiach rozwojowych (u człowieka jest obecny na komórkach prekursorowych  $CD34+$ ), a w trakcie dojrzewania mastocytów gęstość receptora *c-kit* na komórce znacznie wzrasta [87]. W badaniach *in vitro* wykazano, że długotrwałe hodowle prekursorów mastocytów myszy i człowieka stymulowane SCF (bez obecności w hodowli fibroblastów) prowadzą do proliferacji tych komórek w kierunku dojrzałych komórek tucznych [84, 87]. W badaniach *in vivo* wykazano, że miejscowe podanie SCF myszom indukuje rozwój mastocytów CTMC skóry myszy, a u szczurów indukuje rozwój mastocytów subpopulacji CTMC i MMC.

Ostatnio wskazuje się jednak, iż rola fibroblastów w procesie różnicowania i dojrzewania komórek tucznych (przynajmniej u człowieka) jest bardziej znacząca i nie realizuje się jedynie poprzez SCF. Prekursory mastocytów człowieka hodowane w środowisku zawierającym sam SCF lub nawet pełny nadsącz z hodowli fibroblastów (ale bez obecności fibroblastów!) różnicują się w kierunku mastocytów które, w oparciu o kryteria morfologiczne [13, 15, 20], nie są w pełni dojrzałe (przede wszystkim nie ukształtowana jest ostatecznie ultrastruktura ich ziarnistości) [16]. Dowodzi to, że humoralne czynniki pochodzenia fibroblastycznego, w tym głównie SCF, nie są wystarczające do ostatecznego wykształcenia w pełni dojrzałych mastocytów. Tak więc, można obecnie twierdzić, iż SCF, i być może inne fibroblastyczne czynniki humoralne, inicjują i ukierunkowują różnicowanie prekursorów mastocytów

człowieka w kierunku mastocytów "młodocianych". Natomiast do osiągnięcia pełnej dojrzałości tych komórek niezbędne są dodatkowe sygnały pochodzące bezpośrednio od fibroblastów, a więc konieczny jest bezpośredni kontakt obu tych komórek. Nie wiadomo obecnie, jakie czynniki (cząsteczki) związane strukturalnie z fibroblastem są istotne w tym procesie. Być może bierze w tym udział błonowa forma SCF, obecna w dużej ilości w błonie fibroblastów, która może wpływać na adhezję komórek tucznych do powierzchni fibroblastów [1]. Jest także możliwe, iż w proces przekazywania sygnałów zaangażowane są cząsteczki adhezyjne, obecne przecież w błonach obu typów komórek.

Oddziaływanie fibroblastów na aktywność biologiczną dojrzałych mastocytów jest jeszcze bardzo słabo poznane. Biorąc jednakże pod uwagę, iż fibroblasty są źródłem nie tylko wielu składników substancji międzykomórkowej, ale także źródłem wielu plejotropowych cytokin można przypuszczać, że fibroblasty wywierają znaczny wpływ na funkcjonowanie komórek tucznych. Wykazano na przykład, iż SCF – główna cytokina odpowiedzialna za wzrost i dojrzewanie komórek tucznych – może również wpływać na szereg funkcji tych komórek. SCF ma zdolność bezpośredniej aktywacji mastocytów do uwalniania histaminy, wzmacnia – w mastocytach ostatecznie dojrzałych – proces sekrecji mediatorów komórkowych uwalnianych w odpowiedzi na stymulację anafilaktyczną, wywiera także działanie chemotaktyczne [5, 6, 55]. Udokumentowano również, iż wspólna hodowla mastocytów z fibroblastami indukuje syntezę cytokin przez mastocyty, chociaż nie ustalono czynnika fibroblastycznego odpowiedzialnego za taki efekt [68].

**Wpływ mastocytów na fibroblasty.** Mastocyty, poprzez uwalniane mediatory, wywierają wielokierunkowy wpływ na szereg funkcji fibroblastów. W pierwszym rzędzie, szereg mediatorów uwalnianych z ziarnistości bezpośrednio po degranulacji komórki wywiera silny efekt proliferacyjny. Głównym czynnikiem proliferacyjnym jest bez wątpienia histamina [39, 62]. W hodowli, po degranulacji mastocytów indukowanej związkiem 48/80, liczba fibroblastów wzrastała aż o 25% [52]. Także proteoglikany wykazują działanie mitogenne na fibroblasty, przy czym, jak wykazali Yamashita i wsp. [91], działanie takie jest obserwowane jedynie przy niskich stężeniach heparyny (0,03–1 µg/ml); w stężeniach wyższych (ponad 100 µg/ml) heparyna hamowała proliferację fibroblastów. Silnym czynnikiem mitogennym dla fibroblastów jest tryptaza. W warunkach *in vitro* proliferacja fibroblastów była obserwowana już w 5 minut po dodaniu tryptazy. Należy przy tym mocno podkreślić, iż działanie proliferacyjne tryptazy obserwowano przy nanomolarnych stężeniach tego związku, a więc zbliżonych do stężeń "fizjologicznych" [73]. Tryptaza nasila także efekt proliferacyjny innych czynników takich jak insulina, naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) i bFGF [73]. Szczególnie ważnym wydaje się być bFGF [26], produkowany przecież między innymi przez mastocyty [66, 69]. Należy w tym miejscu przypomnieć, iż bFGF, jak wiadomo, wykazuje silne powinowactwo do heparyny tworząc z nią kompleks. Utworzenie takiego kompleksu stabilizuje aktywność bFGF,

a także chroni go przed enzymatyczną degradacją [80]. Ponadto heparyna ułatwia wiązanie się bFGF do receptorów komórkowych [93]. Tak więc heparyna nie tylko *per se* jest czynnikiem mitogennym, ale wzmacnia, na różny sposób, takie działanie innych czynników.

Mediatory uwalniane z mastocytów po ich degranulacji wywierają także wpływ na inne aktywności fibroblastów. Histamina zwiększa syntezę kolagenu [30], tryptaza i chymaza aktywują prokolagenazę [4], a tryptaza dodatkowo jest aktywatorem kolagenazy [28]. Ostatnio udokumentowano również, że TNF- $\alpha$  silnie zwiększa ekspresję niektórych cząsteczek adhezyjnych na fibroblastach, głównie ICAM-1 oraz (choć słabiej i prawdopodobnie współdziałając z innymi cytokinami) VCAM-1 [56].

Jak opisano wcześniej, mastocyty stanowią bardzo ważne źródło szeregu cytokin. Powszechnie wiadomo, że wiele cytokin wywiera wpływ na biologię fibroblastów [44]. Regulują one między innymi wzrost i proliferację tych komórek, ich metabolizm a także chemotaksję [18, 65, 94]. Nie ma jednak obecnie przekonujących dowodów, iż cytokiny wydzielane właśnie przez zaktywowane mastocyty (a nie przez inne komórki) wpływają na aktywność fibroblastów.

## PODSUMOWANIE

Przedstawione rozważania pozwalają nam na stwierdzenie, iż bliskie sąsiedztwo mastocytów i fibroblastów nie jest przypadkowe. Obie populacje komórek wzajemnie oddziałują na siebie i, jak się wydaje, stosunki pomiędzy nimi są bardzo przyjazne i życzliwe. Fibroblasty przede wszystkim regulują procesy wzrostu, różnicowania i dojrzewania komórek tucznych, ale także wywierają pewien wpływ na ich aktywność. Mastocyty przede wszystkim regulują procesy życiowe i aktywność fibroblastów. Z pewnością ta współpraca mastocytów i fibroblastów jest elementem homeostazy organizmu. Prawdopodobnie, wzajemne oddziaływania obu populacji komórek leżą u podstaw niektórych procesów patologicznych, jak chociażby odczyn zapalny czy procesy włóknienia. Dalsze badania mogą powiększyć naszą wiedzę w tym zakresie.

## LITERATURA

- [1] ADACHI S, EBI Y, NISHIKAWA SI, MAYASHI SI, YAMAZAKI M, KASUGAI T, YAMAMURA T, NOMURA S, KITAMURA Y. Necessity of extracellular domain of W(c-kit) receptors for attachment of murine cultured mast cells to fibroblasts. *Blood* 1992; **79**: 650–656.
- [2] ATKINS FM, FRIEDMAN MM, SUBBA RAO PV, METCALFE DD. Interactions between mast cells, fibroblasts and connective tissue components. *Int Arch Allergy Immun* 1985; **77**: 96–102.

- [3] BEFUS AD. Mast cell heterogeneity and functions in mucosal defenses and pathogenesis. [w] Kagnoff MF, Kiyono H. [red] Essentials of Mucosal Immunology. San Diego: Academic Press 1996: 341–354.
- [4] BIRKEDAL-HANSEN H, COBB CM, TAYLOR RE, FULLMER HM. Activation of fibroblast procollagenase by mast cell proteases. *Biochim Biophys Acta* 1976; **438**: 273–286.
- [5] BISCHOFF SC, DAHINDEN CA. c-kit ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells. *J Exp Med* 1992; **175**: 237–244.
- [6] BISCHOFF SC, DAHINDEN CA. Effect of the c-kit ligand on mediator release by human lung mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; **99**: 319–322.
- [7] BISSONNETTE EY, HOGABOAM CM, WALLACE JL, BEFUS AD. Potentiation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J Immunol* 1991; **147**: 3060–3065.
- [8] CAUGHEY GH. Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules. A league of their own. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **150**: S138–S142.
- [9] CLAMAN HN. Mast cell changes in a case of rapidly progressive scleroderma - ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol* 1989; **92**: 290–295.
- [10] COSTA JJ. Mast cells and cytokines: new insights into the pathogenesis of allergic diseases. *Int Allergy* 1990; **5**: 2–8.
- [11] CRAIG SS, SCHECHTER NM, SCHWARTZ LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1988; **58**: 682–691.
- [12] DAYTON ET, PHARR P, OGAWA M, SERAFIN WE, AUSTEN KF, LEVI-SCHAFFER F, STEVENS RL. 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular constituency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 569–572.
- [13] DVORAK AM, FURITSU T, ISHIZAKA T. Ultrastructural morphology of human mast cell progenitors in sequential cocultures of cord blood cells and fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; **100**: 219–229.
- [14] DVORAK AM, FURITSU T, KISSELL-RAINVILLE S, ISHIZAKA T. Ultrastructural identification of human mast cells resembling skin mast cells stimulated to develop in long-term human cord blood mononuclear cells cultured with 3T3 murine skin fibroblasts. *J Leukoc Biol* 1992; **51**: 557–569.
- [15] DVORAK AM, KISSELL S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J Leukoc Biol* 1991; **49**: 197–210.
- [16] DVORAK AM, MITSUIH, ISHIZAKA T. Stimulation of partial development of human mast cells by supernatant fluid from mouse fibroblast cultures. *Clin Exp Allergy* 1994; **24**: 649–659.
- [17] DVORAK AM, SCHLEIMER RP, DVORAK HF, LICHTENSTEIN LM, WELLER PF. Human lung mast cells and alveolar macrophage cytoplasmic lipid bodies contain arachidonic acid and prostaglandin endoperoxidase synthase (cyclooxygenase), the substrate and enzyme necessary for prostaglandin production. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; **99**: 208–217.
- [18] FERTIN C, NICOLAS JF, GILLERY P, KALIS B, BANCHEREAU J, MAQUART FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. *Cell Mol Biol* 1991; **37**: 823–829.
- [19] FURITSU T, SAITO H, DVORAK AM, SCHWARTZ LB, IRANI AM, BURDICK JF, ISHIZAKA K, ISHIZAKA T. Development of human mast cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 10039–10043.
- [20] GALLI SJ, DVORAK AM, MARCUM JA, ISHIZAKA T, NABEL G, DER-SIMONIAN H, PYNE K, GOLDIN JM, ROSENBERG RD, CANTOR H, DVORAK HF. Mast cell clones: A model for the analysis of cellular maturation. *J Cell Biol* 1982; **95**: 435–444.
- [21] GAULDIE J, JORDANA M, COX G, OHTOSHIT, DOLOVICH J, DENBURG J. Fibroblasts and other structural cells in airway inflammation. *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**: S14–S17.

- [22] GIORNO R, LIEBER J, CLAMAN HN. Ultrastructure evidence for mast cell activation in a case of neurofibromatosis. *Neurofibromatosis* 1989; **2**: 35–41.
- [23] GORDON JR, BURD PR, GALLI SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today* 1990; **11**: 458–464.
- [24] GORDON JR, GALLI SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. *Nature* 1990; **346**: 274–276.
- [25] GORDON JR, GALLI SJ. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ /cachectin) by mouse mast cells stimulated via the Fc $\epsilon$ RI. A mechanism for the sustained action of mast cells-derived TNF- $\alpha$  during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 1991; **174**: 103–107.
- [26] GOSPODAROWICZ D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 1974; **249**: 123–127.
- [27] GREENBERG G, BURNSTOCK G. A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res* 1983; **147**: 1–13.
- [28] GRUBER BL, MARCHESE MJ, SUZUKI F, SCHWARTZ LB, OKADA Y, NAGASE H, RAMAMURTHY NS. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1657–1662.
- [29] HARPER RA. Human skin fibroblasts derived from papillary and reticular dermis: differences in growth potential *in vitro*. *Science* 1979; **204**: 526–527.
- [30] HATAMUCHI A, FUJIWARA K, UEKI H. Effects of histamine on collagen synthesis by cultured fibroblasts derived from guinea pig skin. *Arch Dermatol Res* 1985; **277**: 60–64.
- [31] HEARD BE, DEWAR A, CORRIN B. Apposition of fibroblasts to mast cells and lymphocytes in normal human lung and in cryptogenic fibrosing alveolitis. Ultrastructure and cell perimeter measurements. *J Pathol* 1992; **166**: 303–310.
- [32] HEBDA PA, COLLINS MA, THARP MD. Mast cells and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* 1993; **11**: 685–696.
- [33] HUANG E, NOCKA K, BEIER DR, CHU TY, BUCK J, LAHM HW, WELLNER D, LEDER P, BESMER P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. *Cell* 1990; **63**: 225–233.
- [34] IRANI AA, SCHWARTZ LB. Neutral proteases as indicators of human mast cell heterogeneity. [w] Schwartz LB. [red.] Neutral Proteases of Mast Cells. Monogr Allergy. S. Karger, Basel 1990: 146–162.
- [35] IRANI AA, CRAIG SS, NILSSON G, ISHIZAKA T, SCHWARTZ LB. Characterization of human mast cells developed *in vitro* from fetal liver cells cocultured with murine 3T3 fibroblasts. *Immunology* 1992; **77**: 136–143.
- [36] ISHIZAKA T, FURITSU T, INAGAKI N. *In vitro* development and functions of human mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; **94**: 116–121.
- [37] ISHIZAKA T, MITSUI H, YANAGIDA M, MIURA T, DVORAK AM. Development of human mast cells from their progenitors. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 937–943.
- [38] JAFFE EA, RUGGIERO JT, LEUNG LK, DOYLE MJ, McKEOWN-LONGO PJ, MOSHER DF. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 998–1002.
- [39] JORDANA M, BEFUS A, NEWHOUSE MT, BIENENSTOCK J, GAULDIE J. Effect of histamine on proliferation of normal human adult lung fibroblasts. *Thorax* 1988; **43**: 552–558.
- [40] KIRKPATRICK CJ, CURRY A. Interaction between mast cells and perineurial fibroblasts in neurofibroma. New insights into mast cell function. *Path Res Pract* 1988; **183**: 453–458.
- [41] KIRSHENBAUM AS, GOFF JP, KESSLER SW, MICAN JM, ZSEBO KM, METCALFE DD. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J Immunol* 1992; **148**: 772–777.
- [42] KITAMURA Y, KASUGAI T, ARIZONO N, MATSUDA H. Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *Am J Med Sci* 1993; **306**: 185–191.

- [43] KNAPP TR, DANIELS RJ, KAPLAN EN. Pathologic scar formation. Morphologic and biochemical correlates. *Am J Pathol* 1977; **86**: 47–69.
- [44] KOVACS EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1991; **12**: 17–23.
- [45] KRUGER-KRASAGAKES S, GRUTZKAU A, BAGHRAMIAN R, HENZ BM. Interactions of immature human mast cells with extracellular matrix: expression of specific adhesion receptors and their role in cell binding to matrix proteins. *J Invest Dermatol* 1996; **106**: 538–543.
- [46] KUPRYŚ I, KUNA P. Komórki tuczne i cytokiny – nowe spojrzenie na udział mastocytów w reakcji zapalnej. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 43–63.
- [47] LEAL-BERUMEN I, CONLON P, MARSHALL JS. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994; **152**: 5468–5476.
- [48] LEVI-SCHAFFER F, AUSTEN KF, CAULFIELD JP, HEIN A, BLOES WF, STEVENS RL. Fibroblasts maintain the phenotype and viability of the rat heparin-containing mast cell *in vitro*. *J Immunol* 1985; **135**: 3454–3462.
- [49] LEVI-SCHAFFER F, AUSTEN KF, GRAVALLESE PM, STEVENS RL. Coculture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 6485–6488.
- [50] LEVI-SCHAFFER F, DAYTON ET, AUSTEN KF, HEIN A, CAULFIELD JP, GRAVALLESE PM, LIU FT, STEVENS RL. Mouse bone marrow-derived fibroblasts. Morphology and stimulation-induced release of histamine, leukotriene B<sub>4</sub>, leukotriene C<sub>4</sub>, and prostaglandin D<sub>2</sub>. *J Immunol* 1987; **139**: 3431–3441.
- [51] LEVI-SCHAFFER F, RIESEL N. In vitro regeneration of activated rat peritoneal mast cells cocultured with 3T3 fibroblasts. *Cell Immunol* 1989; **119**: 30–40.
- [52] LEVI-SCHAFFER F, RUBINCHIK E. Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 999–1003.
- [53] LEVI-SCHAFFER F, SEGAL V, BARAM D, MEKORI YA. Effect of coculture of rodent mast cells with murine chronic graft-versus-host disease (cGVHD) derived fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 1992; **89**: 501–509.
- [54] LEVI-SCHAFFER F, SHALIT M. Differential release of histamine and prostaglandin D<sub>2</sub> in rat peritoneal mast cells activated with peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; **90**: 352–357.
- [55] MEININGER CJ, YANO H, ROTTAPPEL R, BERNSTEIN A, ZSEBO KM, ZETTER BR. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 1992; **79**: 958–963.
- [56] MENG H, MARCHESE MJ, GARLICK JA, JELASKA A, KORN JH, GAILIT J, CLARK RAF, GRUBER BL. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 789–796.
- [57] METCALFE DD. Interaction of mast cells with extracellular matrix proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; **107**: 60–62.
- [58] METCALFE DD, COSTA JJ, BURD PR. Mast cells and basophils. [w] Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R [red.] Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. New York: Raven Press Ltd 1992: 709–725.
- [59] METZGER H. The receptor with high affinity for IgE. *Immunol Rev* 1992; **125**: 37–48.
- [60] MOSKALEWSKI S. Tkanka łączna. [w] Ostrowski K. [red]. Histologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL 1995: 191–216.
- [61] NISHIOKA K, KOBAYASHI Y, KATAYAMA I, TAKIJIRI C. Mast cell numbers in diffuse scleroderma. *Arch Dermatol* 1987; **123**: 205–208.
- [62] NORRBY K. Evidence of mast-cell histamine being mitogenic in intact tissue. *Agents Actions* 1985; **16**: 287–290.
- [63] PLAUT M, PIERCE JH, WATSON CJ, HANLEY-HYDE J, NORDAN RP, PAUL WE. Mast

- cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcERI or to calcium ionophores. *Nature* 1989; **339**: 64–67.
- [64] PHIPPS RP, PENNEY DP, KENG P, SILVERA M, HARKINS S, DERDAK S. Immune functions of subpopulations of lung fibroblasts. *Immunol Res* 1990; **9**: 275–286.
- [65] POSTLETHWAITE AE, SEYER JM. Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4. *J Clin Invest* 1991; **87**: 2147–2152.
- [66] QU Z, LIEBLER JM, POWERS MR, GALEY T, AHMADI P, HUANG XN, ANSEL JC, BUTTERFIELD JH, PLANCK SR, ROSENBAUM JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995; **147**: 564–573.
- [67] RAO PVS, FRIEDMAN MM, ATKINS FM, METCALFE DD. Phagocytosis of mast cell granules by cultured fibroblasts. *J Immunol* 1983; **130**: 341–349.
- [68] RAZIN E, LESLIE KB, SCHRADER JW. Connective tissue mast cells in contact with fibroblasts express IL-3 mRNA. Analysis of single cells by polymerase chain reaction. *J Immunol* 1991; **146**: 981–987.
- [69] REED JA, ALBINO AP, MCNUTT NS. Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1995; **72**: 215–222.
- [70] ROBINSON C. Mast cells and newly-generated lipid mediators. [w] Holgate ST. [red] Mast Cells, Mediators and Disease. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1989: 149–174.
- [71] ROCHE WR. Fibroblasts and asthma. *Clin Exp Allergy* 1991; **21**: 545–548.
- [72] RUGER B, DUNBAR PR, HASAN Q, SAWADA H, KITTELBERGER R, GREENHILL N, NEALE TJ. Human mast cells produce type VIII collagen *in vivo*. *Int J Exp Path* 1994; **75**: 397–404.
- [73] RUOSS SJ, HARTMANN T, CAUGHEY GH. Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest* 1991; **88**: 493–499.
- [74] RYDZYŃSKI K. Heterogeność komórek tucznych: fakt czy artefakt? *Post Biol Kom* 1992; **19**: 61–76.
- [75] SAPPINO AP, SCHÜRCH W, GABBIANI G. Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 1990; **63**: 144–161.
- [76] SCHWARTZ LB. Preformed mediators of human mast cells and basophils. [w] Holgate ST. [red.] Mast Cells, Mediators and Disease. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1989: 129–147.
- [77] SCHWARTZ LB. Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 91–97.
- [78] SKALLI O, SCHURCH W, SEEMAYER T, LAGACE R, MONTANDON D, PITTET B, GABBIANI G. Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogenous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* 1989; **60**: 275–285.
- [79] SMITH TJ, WEIS JH. Mucosal T cells and mast cells share common adhesion receptors. *Immunol Today* 1996; **17**: 60–63.
- [80] SOMMER A, RIFKIN DB. Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J Cell Physiol* 1989; **138**: 215–220.
- [81] SONECKI P, OLCZYK K. Myofibroblasty i ich rola w procesach naprawy uszkodzonych tkanek. *Przegl Lek* 1992; **49**: 191–193.
- [82] THOMPSON HL, BURBELO PD, GABRIEL G, YAMADA Y, METCALFE DD. Murine mast cells synthesize basement membrane components. A potential role in early fibrosis. *J Clin Invest* 1991; **87**: 619–623.
- [83] TRABANDT A, GAY RE, BIRKDAL-HANSEN H, GAY S. Intracellular secretory pathway and ultrastructural localization of interstitial procollagenase in human gingival fibroblasts. *Matrix* 1990; **10**: 339–347.



- [84] TSAI M, TAKEISHI T, THOMPSON H, LANGLEY KE, ZSEBO KM, METCALFE DD, GEISSLER EN, GALL SJ. Induction of mast cell proliferation, maturation and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6382–6386.
- [85] TUVERI MA, PASSIU G, MATHIEU A, ALOE L. Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1993; **11**: 319–322.
- [86] VALENT P. The riddle of the mast cell: kit(CD117)-ligand as the missing link? *Immunol Today* 1994; **15**: 111–114.
- [87] VALENT P, STANBLOCHLE, SPERR WR, SILLABER C, ZSEBO KM, AGIS H, STROBL H, GEISSLER K, BETTELHEIM P, LECHNER K. Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood* 1992; **80**: 2237–2245.
- [88] WEBER S, RUTH B, KRUGER-KRASAGAKES S, CZARNETZKI BM. Adhesion molecules on the human mast cell line HMC-1 are upregulated during cell activation. *Arch Dermatol Res* 1995; **287**: 695–698.
- [89] WEIDNER N, AUSTEN KF. Evidence for morphological diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 1990; **63**: 63–72.
- [90] WEIDNER N, AUSTEN KF. Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Path Res Pract* 1993; **189**: 156–162.
- [91] YAMASHITA Y, NAKAGOMI K, TAKEDA T, HASEGAWA S, MITSUI Y. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. *Thorax* 1992; **47**: 634–639.
- [92] YASUDA M, HASUNUMA Y, ADACHI H, SEKINE C, SAKANISHI T, HASHIMOTO H, RA C, YAGITA H, OKUMURA K. Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells. *Int Immunol* 1995; **7**: 251–258.
- [93] YAYON A, KLAGSBRUN M, ESKO JD, LEDER P, ORNITZ DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991; **64**: 841–848.
- [94] ZUCALI JR, DINARELLO CA, OBLON DJ, GROSS MA, ANDERSON L, WEINER RS. Interleukin-1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1857–1863.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 11.12.1996 r.*

*Przyjęto: 06.03.1997 r.*

*Adres autora: Akademia Medyczna w Łodzi*

*ul. Mazowiecka 11, 92-215 Łódź*



## UDZIAŁ CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH W WYBRANYCH PROCESACH ROZWOJOWYCH

### CELL ADHESION MOLECULES IN DEVELOPMENT: SELECTED TOPICS

Cezary WÓJCIK

Zakład Histologii i Embriologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w  
Warszawie,

*Streszczenie:* Cząsteczki adhezyjne odgrywają kluczową rolę w rozwoju zarodkowym oraz procesach histogenezy i organogenezy. Ich kontrolowana ekspresja warunkuje prawidłowe ukształtowanie złożonej architektury tkanek i różnicowanie się różnych rodzajów komórek. Cząsteczki adhezyjne determinują określony fenotyp komórek, uczestniczą w gastrulacji, powstawaniu mezenchymy, różnicowaniu się pochodnych neuroektodermy, mięśni szkieletowych, narządów o miąższu nabłonkowym itd. Zmiana ekspresji cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek towarzyszy lub wręcz wywołuje zmianę ich fenotypu zwaną transdyferencjacją, która stanowi podstawę niektórych procesów rozwojowych.

*Słowa kluczowe:* rozwój zarodkowy, cząsteczki adhezyjne, transdyferencjacja, gastrulacja, morfogeneza nabłonków, miogeneza, różnicowanie, powstawanie mezenchymy, rozwój układu nerwowego.

*Summary:* Cell adhesion molecules are among the key developmental regulators, participating in histogenesis and morphogenesis. The controlled expression of various cell adhesion molecules is crucial to the establishment of the proper tissue architecture and terminal differentiation of the cells. The phenotype of the cells is often determined by the expression of specific cell adhesion molecules, especially in processes like gastrulation, mesenchyme formation, neuroectoderm differentiation, miogenesis, epithelial organs formation and others. A change in the expression of the cell adhesion molecules accompanies or even induces transdifferentiation, which is usual in several developmental events.

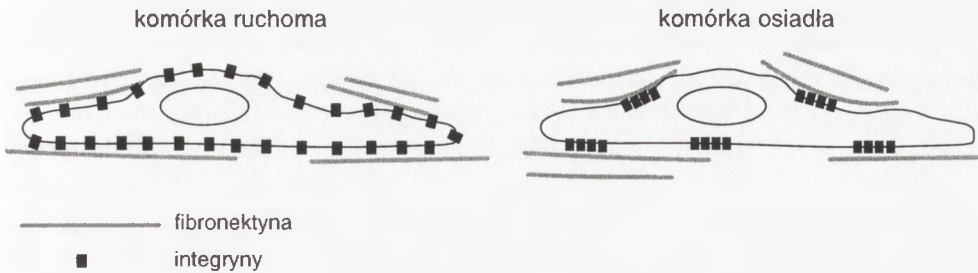
*Key words:* embryonic development, cell adhesion molecules, transdifferentiation, gastrulation, epithelial morphogenesis, miogenesis, differentiation, mesenchyme formation, nervous system development

## 1. WSTĘP

Cząsteczki adhezyjne obejmują wiele różnych białek zakotwiczonych w błonie komórkowej i oddziaływujących ze specyficznymi cząsteczkami macierzy zewnątrzkomórkowej lub cząsteczkami adhezyjnymi innych komórek. Ich rola nie jest jedynie mechaniczna, lecz aktywnie uczestniczą one w przekazywaniu sygnałów do komórki. Wiele receptorów dla czynników wzrostu jest rodzajem cząsteczek adhezyjnych, zaś czynniki wzrostu bardzo często wchodzi w skład większych białek macierzy pozakomórkowej lub białek zakotwiczonych w błonach innych komórek.

Proces zapłodnienia wiąże się z ekspresją na gametach i wzajemnym oddziaływaniem różnych cząsteczek adhezyjnych oraz specyficznych białek macierzy pozakomórkowej tworzących osłonkę przejrzystą. Integryny zawierające łańcuch  $\beta 1$  występują na powierzchni dojrzewającego owocytu, po czym są internalizowane i uwalniane z endosomów dopiero w miarę kolejnych podziałów dojrzewania. Na powierzchni dojrzałej komórki jajowej występują jednak inne bliżej niescharakteryzowane integryny, które biorą udział w zapłodnieniu, będąc receptorem dla fertyliny plemnika. Fertylina posiada domenę o dużej homologii do dezintegryn oraz domenę homologiczną do wirusowych peptydów indukujących fuzję komórek [22,89]. Na powierzchni ludzkich zarodków przedimplantacyjnych wykryto łańcuchy integryn  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ , E-kadherynę, ICAM-1, NCAM i VCAM-1. Na powierzchni ludzkich owocytów występuje także L-selektyna, lecz po zapłodnieniu zanika i nie występuje w zarodkach przedimplantacyjnych. Na części badanych owocytów ludzkich wykryto ponadto obecność innych integryn, takich jak  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha L$ ,  $\beta 2$  i  $\beta 7$  [13]. Wczesne zarodki ludzkie wykazują już produkcję onkofetalnej formy fibronektyny, której obecność stymuluje produkcję kolagenazy IV (metalloproteinazy 2), niezbędnej w procesie implantacji [101]. Integryny również uczestniczą w oddziaływaniu pomiędzy komórkami trofoblastu a doczesną, gdyż implantację można zablokować przeciwciałami wiążącymi i blokującymi integryny [94].

W początkowym okresie rozwoju zarodkowego zachodzi proces kompaktacji i wówczas to następuje po raz pierwszy ekspresja kadheryn, które warunkują różnicowanie się komórek w kierunku tkanki nabłonkowej. W późniejszych stadiach rozwojowych ekspresja różnych rodzajów kadheryn warunkuje powstawanie określonych typów nabłonka, np. ekspresja N-kadheryny warunkuje różnicowanie się komórek neuroektodermy, a E-kadheryny komórek tworzących pierwotny naskórek. Ektopowa ekspresja N-kadheryny powoduje wypieranie innych kadheryn z połączeń z kateninami i zmianę budowy tkanki w kierunku typowym dla neuroektodermy. Ekspresja w komórkach neuroektodermy zmutowanej formy N-kadheryny pozbawionej domeny zewnątrzkomórkowej zwanej N-cad $\Delta$ E powoduje wyparcie wiązania prawidłowej N-kadheryny z kateninami, a co za tym idzie głębokie zaburzenie



Rys. 1. Schemat przedstawiający różnice w rozmieszczeniu integrzyn będących receptorami dla fibronektyny na powierzchni komórek wędrujących i osiadłych

adhezji międzykomórkowej. Prowadzi to do daleko idącej dezorganizacji powstającego ośrodkowego układu nerwowego [45].

Jak wiadomo, kadheryny oddziałują z cytoszkieletem aktynowym poprzez cytoplazmatyczne białka, zwane  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  kateninami. Nastrzyknięcie zarodka *Xenopus laevis* przeciwciałami anty- $\beta$ -kateninowymi powoduje indukcję dodatkowej struny grzbietowej i cewy nerwowej a w niektórych przypadkach prowadzi nawet do rozwoju dwugłowej kijanki [74]. Pozbawienie zarodków myszy genu  $\beta$ -kateniny powoduje, iż zarodki transgeniczne implantują się i rozwijają jedynie do czasu gastrulacji. Wówczas to komórki ektodermy zarodkowej tracą między sobą połączenia i ulegają złuszczeniu do jamy owodni nie wytwarzając mezodermy. W tym samym czasie struktury pozazarodkowe wykazują prawidłową morfologię. Obydwa te przykłady wskazują na to, jak ważne są cząsteczki adhezyjne już w początkowych etapach rozwoju zarodkowego [32].

Różnicowanie się komórek endodermy ściennej zachodzi na podłożu fibronektyny, podczas gdy nawet niewielka domieszka lamininy powoduje, iż komórki różnicują w kierunku endodermy trzewnej. Peptyd pokrewny parathormonowi PTHrP (*parathyroid hormone-related peptide*) uwalniany przez komórki trofoblastu indukuje różnicowanie się komórek endodermy w kierunku endodermy ściennej niezależnie od obecności fibronektyny. W pełni zróżnicowane komórki endodermy ściennej wykazują ekspresję integrzyn  $\alpha 5\beta 3$ ,  $\alpha 6\beta 3$  i  $\alpha v\beta 3$  umożliwiających ich wiązanie się z fibronektyną, lamininą i witronektyną [3].

Ekspresja różnych rodzajów cząsteczek adhezyjnych charakteryzuje komórki różnych tkanek i często determinuje ich fenotyp. Co więcej, związanie stosownych ligandów zarówno przez cząsteczki adhezyjne, jak i przez białka błonowe wiążące czynniki wzrostu często wywołuje zmiany doprowadzające do skrajnych zmian fenotypu komórek, np. do przekształcenia się nabłonka w zarodkową tkankę łączną (mezenchymę) i *vice versa*. Na przykład izolowane komórki nabłonkowe soczewki oka po umieszczeniu na matrycy z kolagenu I przekształcają się w fibroblasty

mezenchymy i rozpoczynają produkcję kolagenu typu I oraz fibronektyny, zaprzestając produkcji kolagenu typu IV, lamininy i krystalliny. Wzmaga się ekspresja łańcucha  $\beta 1$  integryn oraz pojawia się ekspresja łańcucha  $\alpha 5$ , podczas gdy zanika charakterystyczna dla nabłonka integryna  $\alpha 6$  współtworząca receptor dla lamininy. Podejrzewa się, iż zmiana fenotypu komórek z nabłonkowego na fibroblastyczny w tym przypadku zależy przede wszystkim od oddziaływania integryn  $\beta 1$  z kolagenem I [119]. Zjawisko takie nosi nazwę przeróżnicowania czyli transdyferencjacji. Zachodzi ono często w rozwoju zarodkowym oraz niekiedy w dojrzałym organizmie (np. w gruczole mlekowym). Wbrew nauczanemu statycznemu obrazowi ściśle wydzielonych rodzajów tkanek, np. tkanki nabłonkowej, łącznej czy mięśniowej, osiągnięty przez komórki stan zróżnicowania rzadko kiedy jest trwały i często może dojść do zjawiska transdyferencjacji.

W tkankach dorosłego organizmu transdyferencjacja może poprzedzać stany nowotworowe jako tzw. metaplasja, może też występować w obrębie niektórych nowotworów. Może pojawiać się też w innych stanach chorobowych, np. monocyty wywodzące się z krwi obwodowej przekształcają się w fibroblasty uczestniczące w patologicznych procesach włóknienia, zaś przy utracie komórek zewnątrzwydzielniczych trzustki część komórek wyścielających przewody wyprowadzające proliferuje i przekształca się w hepatocyty oraz w komórki wewnątrzwydzielnicze [75,78,81]. U niektórych płazów proces transdyferencjacji uczestniczy w regeneracji utraconych kończyn, stąd duże zainteresowanie jego poznaniem w celu ewentualnych zastosowań leczniczych [99].

## 2. GASTRULACJA

Powstająca w czasie gastrulacji mezoderma posiada istotną właściwość tworzenia spójnej masy komórkowej. Izolowane z zarodka komórki mezodermy spontanicznie agregują, co świadczy o silnych homofilowych oddziaływaniach adhezyjnych. Początek ingresji komórek mezodermy zależy od ich oddziaływania z glikozamino-glikanami zawierającymi siarczany heparanu. Doświadczalne trawienie eksplantów ektodermalnych z *Xenopus laevis* heparynazą zapobiega powstawaniu mezodermy mimo indukcyjnego działania aktywiny lub FGF-u, podczas gdy chondroitynaza nie wywołuje tego efektu [39]. Ponieważ mezoderma jest wielowarstwowa (zwykle ok. 4 warstw w gastrulującym zarodku), *in vivo* jedynie warstwa podstawna migruje mając bezpośrednio kontakt z podłożem, natomiast pozostałe warstwy są niejako pociągane dzięki siłom wzajemnej adhezji komórek. Komórki mezodermy mają wygląd gwiazdzisty i są zatopione w silnie uwodnionej macierzy bogatej w kwas hialuronowy, jednakże wszystkie utrzymują ze sobą kontakt przez wypustki cytoplazmy, tworząc koherentną mechanicznie siateczkę komórek. Wraz z wędrującymi

komórkami mezodermy przesuwać się również położone między nimi elementy macierzy pozakomórkowej. Połączenia pomiędzy komórkami mezodermy zależą od ekspresji kadheryn (głównie N- i U-kadheryny) oraz licznych integrzyn (w czasie gastrulacji dochodzi do ekspresji łańcuchów  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ). Połączenia te nie są stabilne, tj. ciągle powstają nowe i zanikają uformowane uprzednio, zwłaszcza w obrębie komórek poruszających się na samym początku powstającej warstwy mezodermy [22, 107].

Komórki warstwy podstawnej mezodermy poruszają się po błonie podstawnej ektodermy, która od strony mezodermy pokryta jest dodatkowo siateczką włókienek zbudowanych z fibronektyny. Błona podstawna powstaje przed rozpoczęciem ingresji komórek w obrębie smugi pierwotnej i węzła Hensena. Początek ingresji komórek pociąga za sobą przerwanie ciągłości błony podstawnej w obrębie tych struktur zarodkowych. Głównymi receptorami fibronektyny ulegającymi ekspresji na powierzchni komórek mezodermy są integryny zawierające łańcuchy  $\beta 1$  i  $\alpha 5$ . Na komórkach tych występują także łańcuchy integryny  $\alpha 6$  oraz  $\alpha v$ , będące receptorem lamininy błony podstawnej, jednak znaczenie tego oddziaływania nie jest znane [1,10,107].

U ssaków głównym, choć nie jedynym składnikiem błony podstawnej zapewniającym podłoże do migracji komórek mezodermy jest fibronektyna. mRNA dla fibronektyny pojawia się w zarodku po raz pierwszy w stadium wczesnej smugi pierwotnej a powstające białko ulega wbudowywaniu w błonę podstawną ektodermy [95]. Nie poznano dotychczas mechanizmu za pomocą którego komórki mezodermy rozpoznają kierunek migracji zachodzącej wzdłuż włókienek fibronektyny, wiadomo jedynie, że ich filipodia wysuwają się w kierunku przeciwnym do węzła Hensena. Użycie przeciwciał przeciwko fibronektynie lub specyficznego peptydu RGD (Arg-Gly-Asp w kodzie jednoliterowym) blokującego wiązanie z integryną  $\alpha 5\beta 1$  skutecznie blokuje proces gastrulacji, hamując wędrówkę komórek mezodermy [107].

Rozmieszczenie integrzyn w obrębie błony cytoplazmatycznej komórki zmienia się w zależności od tego, czy jest ona osiadła czy też wędrująca. Wykazano, że w komórkach wędrujących  $\beta 1$  integryny są rozproszone i mobilne w całej błonie komórkowej, podczas gdy w komórkach osiadłych skupiają się one w regionach połączeń z macierzą pozakomórkową tworząc punkty bądź płytki przylegania (rys.1) w obrębie których współwystępuje fibronektyna z  $\alpha$ -aktyniną od strony cytoplazmatycznej. Szybkość migracji komórek zależy zarówno od aktywności specyficznych integrzyn łączących się z substratem, jak i od awidności tego substratu. Oddziaływanie pomiędzy macierzą zewnątrzkomórkową a integrzynami jest obopólne, gdyż nie tylko prowadzi do grupowania się integrzyn w płytki przylegania, ale także powoduje montaż cząsteczek fibronektyny, pozwalając na wydłużanie włókienek i wytwarzanie wiązań krzyżowych. Wspomniana wyżej awidność integrzyn, rozumiana jako ich powinowactwo i specyficzność wobec danego substratu może się aktywnie zmieniać, podobnie jak ma to miejsce w przypadku płytek krwi. Obecna

na ich powierzchni integryna  $\alpha 5 \beta 1$  w spoczynku nie wiąże fibrynogeny, lecz dopiero po aktywacji płytek z udziałem trombiny. Z kolei związanie się integrzyn z ich ligandem powoduje przekazanie stosownego sygnału do cytoplazmy, związanego z wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ , pH, aktywacją cykazy adenylanowej, aktywacją kanałów potasowych oraz fosforylacją i aktywacją specyficznej kinazy tyrozynowej pp125<sup>FAK</sup> (FAK, *focal adhesion kinase*). Nieznane są bliżej natomiast dalsze substraty fosforylacji zależnej od pp125<sup>FAK</sup>. Autofosforylacja tego białka warunkuje jego związanie się z kinazami z rodziny *src*, pp60<sup>src</sup> i pp59<sup>lyn</sup>, zaś domena karboksyterminalna warunkuje występowanie w obrębie plamek przylegania [10,35].

Myszy transgeniczne pozbawione FAK miały uogólniony niedorozwój narządów pochodzenia mezodermalnego. Izolowane z ich zarodków komórki wykazywały ograniczoną ruchliwość oraz zwiększoną liczbę płytek przylegania. Może to świadczyć o tym, iż kinaza FAK uczestniczy w recyklingu składników płytek przylegania niezbędnym w czasie ruchu komórek [36]. mRNA FAK występuje już w puli matczynej mRNA w owocycie, ale białko pp125 ulega ekspresji dopiero w czasie gastrulacji, przede wszystkim w mezodermie. W późniejszych okresach rozwoju pp125<sup>FAK</sup> lokalizuje się w połączeniach między somitami oraz w rozwijającym się mózgu i niektórych nerwach czaszkowych [35].

Poza integrzynami w skład płytek przylegania wchodzi również inne, mniej scharakteryzowane rodzaje cząsteczek adhezyjnych, takie jak syndekany. Są to proteoglikany związane z powierzchnią komórek, składające się z rdzenia białkowego zakotwiczonego w błonie komórkowej, do którego wiążą się glikozaminoglikany. Syndekany modulują adhezję zależną od integrzyn, wiążąc się z domeną wiążącą heparynę fibronektyny (HepII) i są prawdopodobnie ko-receptorami dla czynników wzrostu. Z płytkami przylegania związany jest głównie syndekan-4 [30].

O znaczeniu oddziaływania integrzyn z fibronektyną w rozwoju zarodkowym świadczą doświadczenia z zarodkami myszy, które pozbawiono drogą homologicznej rekombinacji genu fibronektyny. W zarodkach tych co prawda następowała gastrulacja i dochodziło do ingresji komórek mezodermy, jednak nie rozwijały się jej dalsze pochodne, co doprowadzało do obumarcia nieprawidłowego płodu. Podobny fenotyp obserwowano u zwierząt pozbawionych genu dla łańcucha  $\alpha 5$  integrzyn, choć zaburzenia były nieco mniejsze, co tłumaczy się obecnością innych receptorów dla fibronektyny niż  $\alpha 5 \beta 1$  [28,112].

W czasie dalszych etapów rozwoju zarodkowego, w czasie procesów histogenezы komórki napotykają na swojej drodze i wiążą różne elementy macierzy zewnątrzkomórkowej. Ma to kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju. Do najlepiej poznanych układów tego typu należy interakcja komórek z elementami tworzącej się błony podstawnej, zachodząca w czasie powstawania różnych narządów zawierających tkankę nabłonkową, w czasie rozwoju mięśni i tkanki nerwowej. Poniżej omówione zostaną wybrane przykłady procesów tego rodzaju.



### 3. ROZWÓJ MEZENCHYMY

Z fenotypem komórek mezenchymalnych, niezależnie od ich pochodzenia, związana jest ekspresja kadheryny-11 (cad-11). Pojawia się ona po raz pierwszy w zarodku w rozproszonych i wędrujących komórkach powstających z neuroektodermalnych grzebieni nerwowych oraz z mezodermy przedstrunowej i przyosiowej. Następną falą ekspresji cad-11 pojawia się w komórkach sklerotomów, gdy następuje ich przekształcanie z nabłonka w mezenchymę. Tworzą się wówczas gradienty ekspresji cad-11 w mezenchymie zawiązków kończyn, narządów płciowych i ogona. Wzmocniona ekspresja cad-11 zachodzi w czasie kondensacji komórek mezenchymy poprzedzającej chondrogenezę oraz w trakcie rozgałęziającej się morfogenezy narządów nabłonkowych [88]. Zgrupowaniom komórek mezenchymy towarzyszy także ekspresja innych cząsteczek adhezyjnych, takich jak np. VLA-4 czyli  $\alpha 4\beta 1$  integryna [40].

Komórki mezenchymy powstają z komórek nabłonkowych w procesie zwanym przeróżnicowaniem (transdyferencjacja), zachodzącym pod wpływem grupy czynników wzrostu takich jak TGF- $\beta$ , bFGF lub HGF. W doświadczeniach prowadzonych *in vitro* na komórkach nabłonkowych wywodzących się z gruczołu mlekowego myszy, zaobserwowano, iż TGF- $\beta$  wywołuje wyraźną zmianę ich fenotypu na fenotyp fibroblastów. Zmiana fenotypu była odwracalna po usunięciu TGF- $\beta$  i towarzyszyła jej reorganizacja cytoszkieletu aktynowego oraz zmiany molekularne takie jak zmniejszenie się ekspresji E-kadheryny, białka ZO-1 i desmoplakiny 1 i 2 przy zwiększeniu się ekspresji fibronektyny [58].

Czynnik wzrostu hepatocytów HGF (*hepatocyte growth factor*), znany także jako czynnik rozpraszający (*scatter factor* – SF) jest wydzielany przez zarodkowe fibroblasty oraz przez kilka ustalonych linii fibroblastów *in vitro*, jak również przez niektóre nabłonki, np. krypt jelitowych [62,105]. Jego receptorem jest zlokalizowana w błonie komórkowej powierzchni podstawnobocznej komórek nabłonkowych kinaza tyrozynowa będąca produktem protoonkogenu *c-met*. Część zewnątrzkomórkowa białka *c-met* przypomina kadheryny. Transdukcja sygnału przez białko *c-met* zależy m.in. od kinazy 3-fosfatydyloinozytolu, ras-GAP, fosfolipazy C- $\gamma$  i c-src. Białka te wpływają w bliżej nie poznany sposób na funkcję kadheryn i/lub katenin powodując utratę przez nie własności adhezyjnych i w konsekwencji rozproszenie komórek tworzących w pierwsią ciągły pokład [21,62]. Myszy transgeniczne pozbawione genu dla HGF/SF giną *in utero* z niedorozwiniętą wątrobą i łożyskiem. HGF/SF warunkujący prawidłowy rozwój łożyska jest wydzielany przez błonę omoczną [83,102]. HGF pełni poza rolę przeróżnicowującego morfogenu, także rolę mitogenu (pobudza podziały komórkowe) i motogenu (wzbudza ruch komórek wzdłuż gradientu stężeń) [102]. Fibroblasty są pobudzane do produkcji HGF pod wpływem wielu czynników, m.in. interleukiny-1 i bFGF [79].

Analiza występowania mRNA dla HGF/SF metodą *Northern blotting* w tkankach płodów ludzkich 9–17 tygodni wieku ciążowego wykazała, że ekspresja tego czynnika zachodzi wówczas w wielu tkankach lecz głównie w wątrobie, jelitach, pęcherzyku żółciowym i śledzionie. Natomiast mRNA dla *c-met* znajduje się praktycznie we wszystkich tkankach z wyjątkiem tarczycy [105].

Ważny jest udział HGF/SF w rozwoju tkanki chrzęstnej, gdyż *in vitro* stymuluje on migrację chondrocytów, wzmacnia ich proliferację oraz pobudza syntezę proteoglikanów chrząstki. Hybrydyzacja *in situ* HGF/SF mRNA wykazała, iż ulega on ekspresji wyłącznie w obszarach zawiązków kończyn, gdzie rozwiną się stawy oraz w przestrzeniach międzyżebrowych [97].

U osobników dorosłych układ HGF/*c-met* odgrywa istotną rolę w przemianach zachodzących w gruczole mlekowym w czasie ciąży i laktacji. Prawdopodobnie pod wpływem prolaktyny w czasie ciąży dochodzi do spadku mRNA dla HGF i białka *c-Met* do poziomu niewykrywalnego w czasie laktacji. Układ HGF/*c-met* w gruczole mlekowym, warunkuje podobnie jak w nerce tubulogenezę, czyli tworzenie cewek nabłonkowych pod wpływem zrębu łącznotkankowego. Proces ten ustępuje miejsca w czasie ciąży wytwarzaniu pęcherzyków wydzielniczych oraz intensywnej syntezie białek mleka w czasie laktacji. Po zakończeniu karmienia, poziomy mRNA dla HGF i *c-met* w gruczole mlekowym szybko wracają do wartości sprzed ciąży [69]. Zarówno komórki wydzielnicze jak i komórki mioepitelialne wykazują ekspresję *c-Met*, lecz reagują one odmiennie na HGF. Komórki wydzielnicze pod wpływem HGF ulegają podziałom, podczas gdy komórki mioepitelialne, zapewniające rodzaj rusztowania dla rozwijających się cewek nie dzielą się, lecz ulegają różnicowaniu [64]. Z kolei TGF- $\beta$  indukuje odwracalną przemianę komórek nabłonkowych gruczołu mlekowego w fibroblasty przy jednoczesnym zablokowaniu cyklu komórkowego, powodując zanik ekspresji takich cząsteczek adhezyjnych charakterystycznych dla nabłonka jak E-kadheryna oraz desmoplakiny I i II przy pojawieniu się ekspresji fibronektyny [58]. W czasie ciąży mezenchyma gruczołu mlekowego produkuje neuregulinę należącą do cząsteczek adhezyjnych z rodziny immunoglobulin. Neuregulina indukuje formowanie pęcherzyków wydzielniczych i produkcję białek mleka poprzez występujące na komórkach nabłonkowych receptory będące produktami protoonkogenów *erbB* [113].

HGF/SF wywiera na szereg linii komórek nowotorowych wpływ hamujący proliferację i różnicujący, np. poddane działaniu HGF/SF komórki linii raka okrężnicy SW1222 wytwarzają *in vitro* struktury przypominające krypty, komórki raka trzustki Capan2 kuliste zawiązki przewodów trzustkowych, komórki raka gruczołu mlekowego EpH4 tworzy przypominające prawidłowe cewki tego gruczołu, zaś komórki raka prostaty pRNS-1-1 rozgałęzione struktury cewkowe przypominające ten gruczoł [8].

#### 4. RÓŻNICOWANIE TKANKI MIĘŚNIOWEJ POPZRZECZNIE PRAŻKOWANEJ

Prekursorowe komórki mioblastów wędrują do zawiązków kończyn z somitów. Przekonano się o tym m.in. dzięki ortotopowemu przeszczepianiu somitów między zarodkami myszy z użyciem jako dawcy myszy zawierającej transgen  $\beta$ -galaktozydazy. Pozwoliło to wykryć histochemicznie komórki pochodzące z somitów dawcy wywędrowujące do zawiązków kończyn [96].

Ich wędrówka zależy od obecności receptora dla HGF/SF będącego produktem protoonkogenu *c-met*. HGF jest produkowany przez mezenchymę kończyn, tworząc w macierzy międzykomórkowej gradient zwiększający się w kierunku dystalnym [61]. Wyhodowano myszy transgeniczne pozbawione protoonkogenu *c-met*. Wykazywały one zupełny brak mięśni szkieletowych kończyn i przepony [6].

Przekształcanie się prekursorów mioblastów we włókna mięśni poprzecznie prążkowanych jest kolejnym przykładem transdyferencji. Komórki nabłonkowe somitów przekształcają się wprawdzie w komórki mezenchymatyczne, które dają początek mioblastom. Miogenezę można wywołać indukując fibroblasty do produkcji tropomiozyny, co powoduje ich transdyferencję w mioblasty. Osteoblasty poddane podobnej transformacji nie podlegają transdyferencji [48]. Warto wspomnieć, że włókna mięśni poprzecznie prążkowanych szkieletowych mogą powstawać w przypadku części mięśniówki przetyku poprzez transdyferencję mięśni gładkich [68].

Mioblasty na podłożu z fibronektyny ulegają odróżnicowywaniu, podczas gdy na podłożu z lamininy przeciwnie, ulegają dalszemu różnicowaniu się w miotuby. Głównym receptorem dla lamininy na komórkach mięśniowych jest integryna  $\alpha 7\beta 1$ , podczas gdy w embrionalnych mioblastach przeważa ekspresja integryny  $\alpha 6\beta 1$ . Integryna  $\alpha 7\beta 1$  pojawia się dopiero w rozwijających się mięśniach w miarę jak powstaje bogata w lamininę błona podstawna. Jej ekspresja jest szczególnie silna przy połączeniach ścięgniastomięśniowych. Geny dla łańcuchów integryny  $\alpha 7\beta 1$  ulegają alternatywnemu splicingowi zmieniającemu się w trakcie rozwoju, powodując powstawanie odmiennych białek. Wzbogaca to możliwości oddziaływań z macierzą pozakomórkową. Nie wiadomo natomiast jaki receptor (-y) odpowiada (-ją) za odróżnicowujące oddziaływanie fibronektyny na mioblasty [10,30]. W oddziaływaniu mioblastów z lamininą ważną rolę odgrywają zwłaszcza glikokonjugaty powierzchni komórek, podczas gdy glikozylacja lamininy lub jej brak wydaje się nie wpływać na ten proces [46].

W 10-tygodniowym zarodku ludzkim zarówno fibronektyna, jak i laminina są obecne w substancji międzykomórkowej rozwijających się mięśni. Pod wpływem czynników mitogennych (sygnały od czynników wzrostu oraz od integryn) mioblasty intensywnie proliferują, wykazując ekspresję różnych rodzajów integryn, zawie-

rających przede wszystkim łańcuchy  $\alpha 5$  i  $\alpha 6$ . W cytoplazmie mioblastów aktyna tworzy typowe włókna naprężeniowe. Integryny  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$  i  $\alpha 3\beta 1$  uczestniczą w tworzeniu płytek przylegania pomiędzy mioblastami [31]. Rozmieszczenie  $\alpha 5\beta 1$  pokrywa się z występowaniem fibronektyny w mioblastach, natomiast w stadium miotub nie wykrywa się już ani tej integryny na powierzchni komórek ani fibronektyny w substancji międzykomórkowej. Poza już poznanymi integrynami ulega ekspresji w miotubach specyficzne białko o masie 150 kDa, które asocjuje z łańcuchem  $\beta 1$  i jest prawdopodobnie specyficznym dla miotub łańcuchem amt. W czasie dojrzewania miotub i ich przekształcania się we włókna mięśniowe poprzecznie prążkowane, aktyna ulega wewnątrzkomórkowemu rozmieszczeniu w obrębie sarkomerów a błona podstawna ulega ostatecznemu uformowaniu. Integryny mają wówczas za zadanie stabilizację sarkomerów, natomiast kompleks dystrofiny z dystroglikanami zapewnia sztywność włókien. Zarówno dystroglikany jak i integryna  $\alpha 6\beta 1$  pośredniczą w wiązaniu się z lamininą. W mięśniu sercowym oraz w niektórych drobnych mięśniach szkieletowych funkcje dystrofiny spełnia pokrewne białko utrofina [22,30].

W komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych ulegają ekspresji także różne białka adhezyjne z grupy kadheryn, m.in. N-, R-, B-, M- i T-kadheryna. Niektóre z nich są charakterystyczne dla wczesnych stadiów rozwojowych, np. N-kadheryna, uczestnicząca w procesie formowania się miotub, która następnie ogranicza się w dojrzałym mięśniu do obszarów połączeń nerwowo-mięśniowych. Z kolei T-kadheryna nie występuje na mioblastach, pojawia się w miarę dojrzewania tkanki, lecz nigdy nie występuje na obszarach połączeń nerwowo-mięśniowych [74].

M-kadheryna pojawia się w somitach i jej ekspresja ogranicza się do komórek z nich się wywodzących. W czasie powstawania pierwszych miotub tj. podczas miogenezy pierwotnej, poziom ekspresji M-kadheryny jest niewielki i jest ona rozproszona równomiernie na powierzchni komórek, nie odgrywając prawdopodobnie roli w tym procesie. Inaczej rzecz wygląda w czasie drugiej fali miogenezy zachodzącej w późniejszym okresie życia płodowego. Ekspresja M-kadheryny gwałtownie wzrasta, akumuluje się ona wówczas w miejscach kontaktu pomiędzy komórkami, natomiast nie ma jej w miejscach ich kontaktu z błoną podstawną. Po ukończeniu miogenezy ekspresja M-kadheryny zanika i nie wykrywa się jej w dojrzałej tkance mięśniowej [16,80].

Pośród innych cząsteczek adhezyjnych odgrywających rolę w miogenezie warto zwrócić uwagę na N-CAM, który współwystępuje z M-kadheryną. W nisko zróżnicowanych mioblastach występuje on głównie pod postacią izoform mających zakotwiczone domeny przezbłonowe, podczas gdy w miarę różnicowania i tworzenia się miotub zaczynają przeważać izoformy związane z błoną jedynie poprzez cząsteczkę glikozylofosfatydyloinozytolu. Mogą one być szybko usuwane z powierzchni komórek pod wpływem fosfolipazy D. Zmiana wzorca ekspresji N-CAM zależy od sygnałów przekazywanych z udziałem jonów  $Ca^{2+}$  i kinazy C [60,73,80].

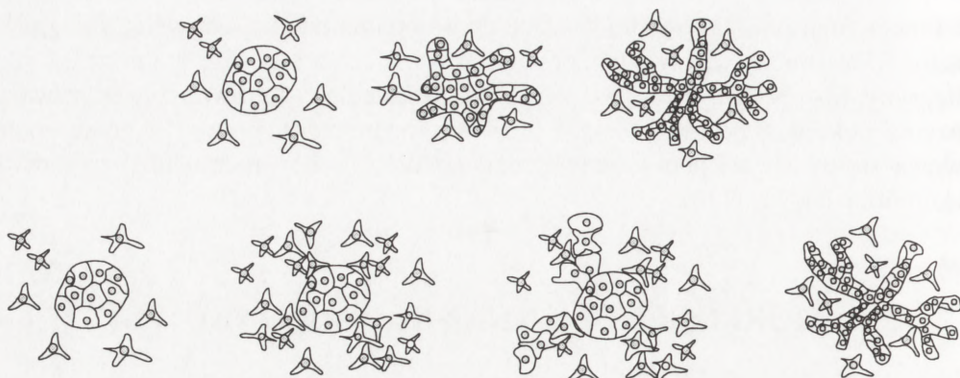
Proces fuzji mioblastów prowadzący do powstania miotub jest wciąż słabo poznany. Uczestniczą w nim wymienione powyżej cząsteczki adhezyjne, takie jak integryny, M- i N-kadheryny, N-CAM i V-CAM, natomiast główną rolę odgrywają enzymy pokrewne dezintegrynom i fertylinie, meltryny  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Z tego powodu zwraca się uwagę na podobieństwo fuzji mioblastów do procesu fuzji plemnika z komórką jajową [110].

## 5. MORFOGENEZA TKANKI NABŁONKOWEJ

Najczęściej mięsz narządów zbudowanych z tkanki nabłonkowej powstaje poprzez rozrastanie się i rozgałęzianie się skupisk nabłonka, co zachodzi pod wpływem czynników wzrostu produkowanych przez otaczającą mezenchymę, dającą początek łącznotkankowemu zrębowi narządu. Taki proces jest nazywany rozgałęziającą morfogenezą nabłonków (*branching epithelial morphogenesis*). Niekiedy jednak nabłonek powstaje w drodze transdyferencjacji, czyli poprzez przekształcanie się skupisk mezenchymy w tkankę nabłonkową i przyłączanie się tak powstałych struktur do istniejącego uprzednio nabłonka (rys. 2).

W rozwijającej się nerce, rozgałęzianie się istniejących skupisk tkanki nabłonkowej prowadzi jedynie do powstania moczowodów i kanalików zbiorczych, podczas gdy pozostałe elementy nabłonkowe miąższu nerki powstają wskutek przemiany tkanki mezenchymatycznej w nabłonkową. W regulowaniu rozwoju nerki uczestniczy szereg czynników wzrostu, takich jak HGF/SF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  i EGF. Wywołują one zmiany morfologiczne poprzez uruchamianie kaskad informatorów II rzędu i ekspresję genów *wnt-1*, *wnt-4* i *Pax-2*. Szczególne znaczenie dla formowania się połączeń między komórkami mezenchymy przekształcającymi się w nabłonek ma mobilizacja jonów  $Ca^{2+}$  i aktywacja kinazy zależnej od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny [33,34,92]. Działanie na izolowane zawiązki śródnerczy przeciwciałami anti-HGF/SF doprowadzało do zablokowania przeróżnicowania się fibroblastów mezenchymy w komórki nabłonkowe nefronów, wznagało apoptozę fibroblastów i zaburzało rozgałęziającą morfogenezę nabłonkowego pączka moczowodowego [108]. HGF/SF jest również czynnikiem warunkującym powstawanie gruczołów żołądkowych, zarówno w czasie rozwoju, jak i w czasie gojenia się ubytków błony śluzowej [100].

Przemiana mezenchymy w komórki nabłonkowe wytwarzające następnie struktury nefronów pozwala dokładnie śledzić pojawianie się poszczególnych elementów błony podstawnej. Komórki w pierw syntetyzują łańcuchy  $\beta$ 1-lamininy i  $\gamma$ 1-lamininy, a łańcuchy  $\alpha$ 1-lamininy pojawiają się dopiero wtedy, gdy ulegające przemianie komórki ulegają polaryzacji. Równocześnie zaczynają one produkować łańcuch  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-integryny oraz E-kadherynę. Użycie przeciwciał anti-laminina-1 lub anti- $\alpha$ 6 $\beta$ 1-



Rys. 2. Schemat przedstawiający dwa zasadnicze mechanizmy morfogenezy narządów nabłonkowych. Rząd górny przedstawia rozgałęziającą się morfogenezę nabłonków, zachodzącą w narządach takich jak np. wątroba, trzustka i płuca. Rząd dolny przedstawia transdiferencjację mezenchymy w nabłonek prowadzącą do wytworzenia nefronów

integryna powoduje poważne zaburzenie rozwoju kanalików nerkowych, co wskazuje na rolę oddziaływań pomiędzy tą integryną a lamininą-1 (zwłaszcza tzw. fragmentem E8 lamininy-1) w ich morfogenezie. Rozwój nerek można również zablokować przeciwciałami zaburzającymi wiązanie dystroglikanów z lamininą (poprzez tzw. fragment E3), co wskazuje na istnienie dodatkowych powiązań z macierzą pozakomórkową. Niejasna jest rola syndekanu-1, ale wydaje się, że również on może się wiązać z lamininą i odgrywa rolę w polaryzacji komórek nabłonka. Reasumując, istnieją w tej chwili dowody na istnienie co najmniej dwóch niezależnych układów receptorowych dla lamininy-1 w rozwijających się komórkach nabłonkowych – związany z integrynami  $\alpha 6$  i związany z kompleksem dystroglikanów. Możliwe jest, że wiązanie się z błoną podstawną dostarcza nie tylko sygnałów do prawidłowej proliferacji komórek nabłonkowych, lecz jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania dojrzałego nabłonka [30].

W pozostałych narządach o miąższu składającym się z komórek nabłonkowych, różnicują się one w przebiegu procesu zwanego "rozgałęziającą się morfogenezą nabłonków". Polega on na tym, iż początkowo występuje niewielka grupa komórek nabłonkowych otoczona grubą warstwą mezenchymy. Komórki nabłonkowe się rozrastają i wędrują, tak że wygląda to jak gdyby pierwotny zawiązek nabłonka wysyłał liczne rozgałęzienia do otaczającej mezenchymy. Proces ten wygląda w zasadzie jednakowo we wszystkich narządach (np. w wątrobie, płucach, trzustce) i zależy od komórek otaczającej mezenchymy.

W procesie morfogenezy narządów o miąższu nabłonkowym również znaczący jest udział oddziaływań pomiędzy wędrującymi komórkami nabłonka a macierzą pozakomórkową. W rozwijającej się śliniance podżuchwowej od bardzo wczesnych stadiów rozwoju występuje ekspresja integryny  $\alpha 6 \beta 1$  w błonie komórkowej komórek

nabłonkowych i lamininy-1 w błonie podstawnej nabłonka. Przeciwciała wiążące domenę E3 łańcucha  $\alpha 1$ -lamininy uniemożliwiają morfogenezę ślinianki, doprowadzając do przzerwania błony podstawnej nabłonka. Zastosowanie przeciwciał rozpoznających łańcuch  $\alpha 6$  integryny, powoduje brak różnicowania się komórek nabłonkowych przy zachowanej ciągłości błony podstawnej [30,43].

Wzrost przewodów śródnerczowych Wolffa zależy między innymi od oddziaływania komórek nabłonkowych z kwasem polisialowym związanym z N-CAM. Trawienie kwasu polisialowego blokuje dalszy wzrost przewodów Wolffa, podczas gdy usunięcie fibronektyny i witronektyny nie wywiera żadnego efektu [4].

Mniej poznane są mechanizmy oddziaływań pomiędzy rosnącymi nabłonkami a zrębem mezenchymatycznym, który również wytwarza składniki błon podstawnych. Wydaje się, że jednym z takich ważnych składników pochodzenia mezenchymatycznego jest nidogen, gdyż przeciwciała blokujące jego oddziaływanie z lamininą hamują rozwój zawiązków nerek i płuc. Również wydają się mieć znaczenie tenascyna-C i epimorfina [30].

Komórki zawiązka płuc, powstających z niego wtórnych rozgałęzień oskrzeli oraz nabłonek drzewa oskrzelowego dojrzałych płuc wykazują ekspresję E-kadheryny i Ep-CAM na bocznych powierzchniach komórek. W nabłonku pęcherzyków płucnych, Ep-CAM ulega ekspresji na powierzchni pneumocytów typu I i II, podczas gdy ekspresja E-kadheryny jest ograniczona do powierzchni podstawnobocznych pneumocytów typu II. W warunkach zmian chorobowych, takich jak włóknienie płuc dochodzi do inaktywacji E-kadheryny [44]. Pneumocyty typu II są uważane za komórki prekursorowe dla pneumocytów typu I, lecz mogą one ulegać wzajemnej odwracalnej transdiferencjacji [18]. Rozgałęziająca się morfogeneza nabłonka zawiązka płuc ściśle zależy od czynników produkowanych przez jego mezenchymę. Mezenchyma płuc jest w stanie zaindukować morfogenezę nabłonka pochodzącego z tchawicy i jego różnicowanie się w kierunku pneumocytów typu II [86]. Wzrost pączków tkanki nabłonkowej w przebiegu morfogenezy płuc wymaga ciągłego remodelowania błony podstawnej. Wchodzący w jej skład łańcuch  $\beta$  lamininy jest produkowany zarówno przez mezenchymę, jak i przez komórki nabłonkowe, podczas gdy łańcuch  $\gamma$  głównie przez nabłonek [49].

## 6. ROZWÓJ UKŁADU NERWOWEGO

Jednym z pierwszych markerów różnicowania się neuroektodermy jest uczestnicząca prawdopodobnie w procesie adhezji glikoproteina zawierająca epitop L5, który może występować na niektórych izoformach glikoproteiny L1, proteoglikanach i innych niezidentyfikowanych białkach. Przed gastrulacją ulega ona ekspresji w komórkach całego epiblastu, jednak podczas gastrulacji jej ekspresja zaczyna się

ograniczać do obszaru prospektywnej neuroektodermy pod wpływem HGF/SF produkowanego w węźle Hensena i dyfundującego do sąsiadującego obszaru epiblastu [91]. Oddziaływania pomiędzy ulegającymi różnicowaniu neuronami i komórkami glejowymi są bardzo skomplikowane i zależą od bardzo dużej liczby różnych cząsteczek adhezyjnych.

### 6.1. Kadheryny

Chociaż N-kadheryna jest pojawiającą się już w komórkach neuroektodermy kadheryną charakterystyczną dla komórek układu nerwowego i promującą wzrost neurytów, to w układzie nerwowym ekspresji ulega również wiele innych kadheryn (co najmniej 20), których rola zdaje się polegać na wyodrębnianiu szlaków nerwowych i funkcjonalnych grup neuronów. Już w stadium wczesnej płytki nerwowej na komórkach neuroektodermy pojawia się F-kadheryna, która następnie występuje przede wszystkim w regionie odgraniczającym neuroektodermę od ektodermy, prawdopodobnie zapobiegając mieszaniu się tych dwóch typów komórek [23]. W rozwijającym się rdzeniu kręgowym wyodrębnianie się szlaków nerwowych zależy od ekspresji N-, E- i T-kadheryny, zaś w obrębie pokrywy od ekspresji N- i R-kadheryny. W korzeniach grzbietowych nerwów rdzeniowych, T-kadheryna jest specyficznym markerem subpopulacji włókien czuciowych, które nie wykazują ekspresji ani N- ani E-kadheryny. T-kadheryna uczestniczy w odpowiednim ukierunkowaniu wzrastających aksonów tworzących spoidła rdzenia kręgowego, a jej ekspresja zanika, gdy struktury te są już w pełni wykształcone [62,74,76]. T-kadheryna jest wyjątkową kadheryną, gdyż zakotwicza się w błonie komórkowej poprzez glikozylowaną resztę fosfatydyloinozytolu. Odgrywa też znaczącą rolę we wrastaniu zakończeń nerwów czuciowych do zawiązków kończyn i znajdowaniu przez neuryty właściwej drogi do odpowiednich grup włókien mięśniowych. W początkowym okresie T-kadheryna występuje na wszystkich włóknach nerwowych oraz w mezenchymie obszarów przez które nie przebiegają szlaki nerwowe. Pod tym względem jej rozmieszczenie jest przeciwstawne do rozmieszczenia N-kadheryny, która pobudza wzrost neurytów na obwód [26]. N-kadherynę zlokalizowano w obrębie szczylin synaptycznych zarówno pomiędzy niektórymi neuronami, jak i w płytkach motorycznych, w związku z czym uważa się, że może ona odgrywać rolę w formowaniu i utrzymaniu synaps [111].

### 6.2. Integryny

W macierzy międzykomórkowej rozwijającego się ośrodkowego układu nerwowego występują m.in. laminina, witronektyna, trombospondyna i tenascyna. Różnicujące się komórki układu nerwowego oddziałują z tymi cząsteczkami głównie przy udziale integryn z rodziny  $\beta 1$ . Ekspresja łańcucha  $\beta 1$  jest stała i utrzymuje



się na wysokim poziomie w ośrodkowym układzie nerwowym, podczas gdy ekspresja łańcuchów  $\alpha$  ulega ciągłym zmianom. Integryna  $\alpha 6$  pojawia się w obrębie neuroektodermy, po czym jej ekspresja ogranicza się do wykształcających się neuronów spoidłowych i ruchowych oraz plakody ocznej i usznej, jak również do subpopulacji komórek grzebienia nerwowego w obrębie tyłomózgowia, z których powstaną komórki Schwanna niektórych nerwów czaszkowych (VII, VIII i X). W miarę kształtowania się rdzenia kręgowego ekspresja łańcucha  $\alpha 6$  wzrasta na całym jego obszarze, by ponownie zmniejszyć się, aż do zupełnego zaniku poza brzuszными korzeniami nerwów rdzeniowych. Zaburzenie ekspresji łańcucha  $\alpha 6$  za pomocą plazmidów produkujących antysensowne mRNA powoduje blok rozwoju w stadium przed utworzeniem cewy nerwowej lub ciężkie wady rozwojowe do anencefalii włącznie. Z kolei łańcuch  $\alpha 1$  ulega intensywnej ekspresji w warstwach komórkowych mózgu, po czym zanika zupełnie wraz z ich dojrzewaniem. Łańcuch  $\alpha 1$  również występuje w rdzeniu kręgowym, gdzie w odróżnieniu od  $\alpha 6$  koncentruje się w korzeniach grzbietowych nerwów rdzeniowych [10,50].

### 6.3. Cząsteczki z nadrodziny immunoglobulin

Cząsteczki adhezyjne należące do nadrodziny Ig również ulegają ekspresji w rozwijającym się układzie nerwowym. Jak wiadomo, można podzielić je na trzy klasy:

- 1) zawierające jedynie domeny Ig;
- 2) zawierające także domeny fibronektyny typu III;
- 3) zawierające domeny homologiczne do innych białek [11].

Cząsteczki klasy I uczestniczą przede wszystkim we wzroście neurytów i obejmują np. Thy1, DM-GRASP, LAMP, telencefalinę i CD4. Thy1 i DM-GRASP stymulują wzrost różnych populacji neurytów, a odpowiednie przeciwciała blokują ten proces. Na przykład oddziałyujący homofilowo DM-GRASP (*Dorsal funiculus and ventral Midline expressed immunoGlobulin-like Restricted Axonal Surface Protein*) produkowany przez neurony współczulne, rząskowe i czuciowe, stymuluje ich wzrost, podczas gdy nie wywiera wpływu na neurony pokrywowe, międzymózgowiowe i siatkówkowe, które go nie produkują. Uczestniczy on w wyodrębnianiu się i wzroście niektórych szlaków nerwowych [12,20]. DM-GRASP ulega ekspresji kolejno w różnych grupach neuronów, w pierw w jądrze śródmiażdżowym Cajala międzymózgowia, którego wypustki osiowe współtworzą pęczek podłużny pośrodkowy, następnie pojawia się w szlakach spoidła nadwzrokowego i w zstępującym korzeniu jądra śródmózgowiowego nerwu trójdzielnego, w szlakach oliwkomózdżkowych i w części komórek Purkiniego [14,15]. Co ciekawe, okazało się że ludzki DM-GRASP (zlokalizowany na 3q13.1-13.2) występuje także na aktywowanych leukocytach (ALCAM – *activated leukocyte-cell adhesion molecule*) i jest ligandem dla CD6 limfocytów [7]. LAMP (*limbic system associated membrane protein*) zawiera

trzy domeny immunoglobulinowe i kotwiczy się w błonie komórkowej poprzez fosfatydyloinozitol. LAMP ulega ekspresji na neuronach związanych z układem limbicznym i uczestniczy w wytwarzaniu się specyficznych połączeń pomiędzy przegrodą a hipokampem [70,116]. Telencefalina przypomina swoją budową ICAM-1 i ICAM-3. Ulega ona ekspresji na ciałach komórek nerwowych i dendrytach (ale nie na aksonach) w obrębie tyłomózgowia i jest prawdopodobnie ligandem dla integrzyn komórek glejowych. Gwałtowny wzrost ekspresji telencefaliny następuje w okresie okołoporodowym i wiąże się z intensywnym rozwojem dendrytów i wytwarzaniem synaps przez neurony tyłomózgowia [115]. Glikoproteina CD4 została znaleziona po raz pierwszy na pomocniczych limfocytach T, gdzie współdziałaływuje z klasą II MHC komórek prezentujących antygen, jednak rola CD4 w układzie nerwowym nie jest wyjaśniona, zwłaszcza że ulega tu ona alternatywnemu splicingowi, w wyniku którego ekspresji ulega jedynie 2/3 karboksyterminalne cząsteczki CD4 z limfocytów T. Niewątpliwa jest natomiast rola CD4 w umożliwianiu zakażenia komórek nerwowych wirusem HIV, co prowadzi w konsekwencji do rozwoju zespołu otępieniowego w przebiegu AIDS (*AIDS dementia complex*) [11,65].

Inne cząsteczki adhezyjne tej klasy, takie jak Po, glikoproteina związana z mieliną MAG (*myelin associated glycoprotein*) i białko mieliny komórek Schwanna (SMP) ulegają ekspresji na mielinujących komórkach obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego uczestnicząc w oddziaływaniu pomiędzy aksonami a komórkami glejowymi odgrywając kluczową rolę w inicjowaniu procesu mielinizacji. Glikoproteina Po uczestniczy zarówno w homofilowej adhezji między komórkami, jak i w regeneracji i wzroście neurytów. Mutacje genu *Po* na locus 1q22-23 są charakterystyczne dla takich neuropatii, jak choroba Charcota-Marie-Tootha (typ 1B) oraz choroba Dejerine-Sottas. Bardzo podobne stany chorobowe pojawiają się także wskutek mutacji białka koneksonów koneksyny 32 lub obwodowego białka mieliny 22 (PMP22) [103]. MAG występuje na powierzchni oligodendrocytów i komórek Schwanna w dwóch izoformach, o większej i mniejszej masie cząsteczkowej zwanych odpowiednio L-MAG (większa) i S-MAG (mniejsza), ulegających fosforylacji pod wpływem kinazy C [114]. MAG wywiera zdecydowany wpływ hamujący na wzrost neurytów, co przyczynia się do braku ich regeneracji w ośrodkowym układzie nerwowym. W obwodowym układzie nerwowym inhibujący wpływ MAG jest przeciwważany przez stymulujący wzrost neurytów wpływ lamininy błony podstawnej komórek Schwanna [19]. Basygina/neurotelina ulega ekspresji w komórkach śródbłonna naczyń mózgowych odgrywając rolę w ustanowieniu bariery krew-mózg. Występuje ona także na powierzchni komórek Müllera pośrednicząc w ich oddziaływaniu z neuronami [11].

Przedstawicielami drugiej klasy cząsteczek adhezyjnych z nadrodziny Ig w ośrodkowym układzie nerwowym jest N-CAM, L1, kontaktyna, aksonina, DCC, Nr-CAM i in. N-CAM ma co najmniej 30 różnych izoform powstałych wskutek alternatywnego splicingu, zaś każda z nich ma swój własny wzór ekspresji w przebiegu rozwoju

i w dojrzałym układzie nerwowym. Ekspresja tej cząsteczki nie jest jednak ograniczona do ośrodkowego układu nerwowego, gdyż uczestniczy ona także np. w przyleganiu gonocytów do komórek Sertoliego w jądrze [67]. L1, które jest ligandem dla N-CAM, to duża glikoproteina o wielu funkcjach, uczestnicząca w adhezji, wzroście neurytów, wytwarzaniu ich pęczków i migracji neuroblastów. Gen dla L1 ulega alternatywnemu splicingowi – izoformy L1 o mniejszej masie występują także w komórkach nie należących do układu nerwowego (140, 80 kDa i inne), zaś izoforma o masie cząsteczkowej 200 kDa wyłącznie w neuronach [103]. W dojrzałym mózgu L1 występuje praktycznie we wszystkich jego rejonach, jednak w czasie rozwoju zmienia się ekspresja różnych izoform L1. Na przykład niektóre jądra podwzgórza wykazują dużą przewagę izoformy 80 kDa, podczas gdy w hipokampie i mózdzku zdecydowanie przeważa izoforma 200 kDa [54]. Liczne mutacje genu dla L1 w locum Xq28 położonym w bezpośrednim sąsiedztwie telomeru prowadzą do powstania poważnych nieprawidłowości rozwojowych ujawniających się u ludzi pod postacią trzech dziedzicznych zespołów chorobowych związanych z chromosomem X: wrodzonego wodogłowie spowodowanego zwężeniem wodociągu Sylwiusza, wrodzonego spastycznego porażenia połowiczego typu I i zespołu MASA (*Mental retardation, Aphasia, Shuffling gait, Adducted thumbs*). W przypadkach tych ciężkich rodzinnych schorzeń obserwuje się wrodzony brak ciała modzelowatego i/lub szlaków korowordzeniowych [25,42,85,82]. W związku ze wspólną etiologią proponuje się objąć te wszystkie zespoły chorobowe nazwą CRASH (*Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spastic paraplegia, Hydrocephalus*) [24]. Stwierdzono, iż ekspresja cząsteczek adhezyjnych takich jak L1 może zależeć od aktywności elektrycznej wzrastających neuronów, która tym samym moduluje układanie się neurytów w pęczki i obecność określonej liczby komórek Schwanna [38]. Co więcej, przeciwciała zaburzające wiązanie L1/N-CAM zmniejszały długoterminową potencjację w neuronach hipokampa, tak więc przypisuje się tym cząsteczkom rolę w uczeniu się i pamięci [53]. Zaburzenia adhezji zależnej od układu L1/N-CAM mogą leżeć u podstaw niektórych postaci schizofrenii [71].

Bardzo ciekawy jest gen *dcc*, zidentyfikowany w pierw przy badaniach raka okrężnicy (*Deleted in Colon Cancer* – zdeletowany w raku okrężnicy). Gen *dcc* jest zaliczany do antyonkogenów (genów supresorowych nowotworów), a jego produkt jest występującą w powiązaniu z błoną komórkową cząsteczką adhezyjną. Jego ekspresja zachodzi w wielu regionach mózgu, gdzie stymuluje wzrost neurytów [11].

Aksonina jest glikoproteina zawierającą sześć domen immunoglobulinowych i cztery domeny fibronektyny III, kodowaną przez gen *TAX-1* zlokalizowany na chromosomie 1 (1q32.1) [47]. Oddziaływanie pomiędzy aksoniną rosnących aksonów spoidłowych i Nr-CAM komórek glejowych blaszki brzusznej cewy nerwowej jest niezbędne do przejścia aksonów przez linię pośrodkową ciała. Zakłócenie tych interakcji za pomocą specyficznych przeciwciał powoduje wrastanie aksonów do

struktur ipsilateralnych zamiast do kontralateralnych jak również zapobiega pierwszym etapom wytwarzania osłonki mielinowej [90,93].

Kontaktyna (F3, F11) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 130 kDa zakotwiczoną w błonie poprzez fosfatydyloinozitol, odpowiedzialną za oddziaływanie neuronów z tenascyną [77,117]. Gen dla kontaktyny jest zlokalizowany na chromosomie 12q11-q12 [5]. Związanie kontaktyny z tenascyną prowadzi do aktywacji kinazy tyrozynowej Fyn z rodziny kinaz Src [118]. Drugim poza kontaktyną receptorem dla tenascyny na neuronach jest proteoglikan glypikan, również zakotwiczony poprzez fosfatydyloinozitol. Oddziaływanie neuronów z tenascyną odpowiada za wiele procesów rozwojowych w ośrodkowym układzie nerwowym [104].

Trzecia grupa cząsteczek adhezyjnych zaliczanych do nadrodziny immunoglobulin obejmuje m.in. receptory dla specyficznych czynników neurotroficznych (neurotrofin), będące produktami protoonkogenów *trk* ( $p140^{trkA}$ ,  $p145^{trkB}$ ,  $p145^{trkC}$ ), neureguliny i ulegający sekrecji neurokan, pokrewny proteoglikanom tkanki łącznej [11]. Neurotrofiny obejmują rodzinę pokrewnych białek, takich jak czynnik wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*), mózgowo pochodny czynnik neurotroficzny (BDNF, *brain derived neurotrophic factor*), neurotrofina-3, neurotrofina-4 (zwana także 5) i neurotrofina-6. Neurotrofiny są produkowane głównie w obwodowym, lecz także w ośrodkowym układzie nerwowym, a ich wydzielanie się zwiększa pod wpływem pobudzenia receptorów glutaminianowych [55]. Receptorem dla neurotrofin są bądź to pokrewne receptorom dla TNF białko p75NGFR o małym powinowactwie i niskiej specyficzności, bądź to będące kinazami tyrozynowymi produkty protoonkogenów *trk* o wysokim powinowactwie i dużej specyficzności.  $p140^{trkA}$  jest receptorem dla NGF,  $p145^{trkB}$  dla BDNF i neurotrofiny 4 a  $p145^{trkC}$  dla neurotrofiny 3 [2]. Poza specyficznym wiązaniem neurotrofin, białka Trk oddziałują także z różnymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez swoje domeny immunoglobulinowe [98]. Neuregulina występuje na powierzchni neuronów ruchowych i skupia się w obrębie połączeń nerwowo-mięśniowych. Neuregulina pobudza proliferację komórek Schwanna oraz indukuje syntezę receptora dla acetylocholinyl włókien mięśniowych poprzecznie prążkowanych poprzez wiązanie się ze swoim ligandem będącym produktem protoonkogenu *erbB* [41]. Myszy transgeniczne pozbawione genu neureguliny obumierają z ciężkim niedorozwojem serca, zaburzonym rozwojem komórek Schwanna i nieprawidłowościami zwojów nerwów czaszkowych. Podobny fenotyp wykazują myszy transgeniczne pozbawione genów dla receptorów dla neureguliny, *erbB4* i *erbB2* [27,52,57]. Neurokan jest wydzielanym przez neurony proteoglikanem bogatym w siarczan chondroityny, który wiąże N-CAM i Ng-CAM wywierając na neurony silny wpływ regulujący wzrost neurytów. Podobnie działają inne słabiej scharakteryzowane proteoglikany tkanki nerwowej, takie jak proteoglikan 6B4 regulujący wzrost włókien kiciastych w mózdku lub związane z błonami growthcan o masie 140 kDa pojawiający się przejściowo

w czasie wytwarzania synaps [66]. Z kolei komórki glejowe wykazują na swojej powierzchni ekspresję innego proteoglikanu bogatego w siarczan chondroityny zwanego fosfokanem. Fosfokan wiąże N-CAM i Ng-CAM regulując adhezję neuronów i ich wypustek do komórek glejowych [59].

Cząsteczki adhezyjne z klasy Ig mogą zarówno oddziaływać homofilowo ze sobą (np. L1 jednej komórki wiąże się z L1 drugiej), jak i heterofilowo z innymi cząsteczkami (np. aksonina-1 wiąże się albo homofilowo ze sobą albo heterofilowo z L1, podczas gdy L1 może się wiązać także heterofilowo z lamininą lub z N-CAM). Poza tym, cząsteczki z klasy Ig niekiedy oddziałują ze sobą także w obrębie błony komórkowej tej samej komórki. Wiązanie się cząsteczek z tej grupy ze swoimi ligandami wywołuje zwykle przekazywanie do komórki specyficznych sygnałów za pomocą układów informatorów II rzędu. Związanie się L1 i N-CAM ze swoimi ligandami wywołuje zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie  $Ca^{2+}$ , pH i produktów przemiany trójfosforanu inozytoli. Ciekawe jest, że odrębne populacje neuronów wykazują niekiedy odmienne bądź wręcz przeciwstawne reakcje na ten sam bodziec pochodzący od cząsteczek adhezyjnych [11].

Warto wspomnieć również o grupie występujących zarówno w macierzy zewnątrzkomórkowej jak i związanych z błoną komórkową białek ulegających ekspresji w różnych obszarach neuroektodermy i mezodermy zwanych semaforinami (kolapsynami). Ich kontakt z wzrastającym końcem neurytu zapobiega jego dalszemu wzrostowi w kierunku występowania tej cząsteczki w tkankach. Semaforiny wyodrębniają więc terytoria tkankowe niedostępne dla wzrastających neurytów. Na przykład zależne od neurotrofiny 3 neurony zlokalizowane w brzusznej części rdzenia kręgowego wydzielają semaforinę III (kollapsynę), która uniemożliwia wzrost wypustek zależnych od NGF-u komórek czuciowych, kierujących się do korzeni grzbietowych [56,72,109]. Receptorem dla semaforin są niezidentyfikowane białka błonowe, inicjujące kaskadę sygnalizacyjną w której uczestniczy białko CRMP-62 (*collapsin response mediator protein, mass 62 kDa*) oraz białko G [29]. Zidentyfikowano u myszy białko błonowe zawierające domenę semaforiny oraz domeny immunoglobulinopodobne nazwane M-Sema-F, które można więc zaliczyć do nadrodziny Ig [37].

## 7. MIGRACJA KOMÓREK GRZEBIENI NERWOWYCH

Komórki grzebieni nerwowych migrują z grzbietowej strony cewy nerwowej wzdłuż określonych szlaków w różne regiony ciała zarodka. Wiąże się to ze zmianą ich fenotypu z nabłonkowego w mezenchymatyczny, co odbywa się pod wpływem fosforylacji różnych białek regulatorowych i strukturalnych [63]. W obrębie tułowia wędrują one brzusznie pomiędzy somitami wytwarzając neurony czuciowe, komórki

Schwanna, autonomiczne neurony pozazwojowe, komórki satelitarne zwojów obwodowych i niektóre spośród komórek układu APUD, jak również wędrują grzebietowo pod ektodermę przekształcając się w melanocyty. Komórki grzebieni nerwowych w części dogłowej zarodka rozprzestrzeniają się jeszcze bardziej wchodząc w skład tkanki łącznej właściwej, chrząstek i kości głowy. Kontrola kierunku ruchu komórek grzebieni nerwowych zależy od czynników wydzielanych przez otaczające tkanki oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej [9,10]. Na przykład duży agregujący proteoglikan wersikan obecny w obrębie kaudalnych sklerotomów, mezenchymie podścielającej tylnoboczne obszary ektodermy, mezenchymie perinotochordalnej i w obrębie obręczy biodrowej zapobiega migracji komórek grzebieni nerwowych w te obszary prawdopodobnie blokując ich oddziaływanie z fibronektyną, lamininą i kolagenem typu I [51]. Komórki wywodzące się z grzebieni nerwowych nie będące neuronami stosunkowo łatwo ulegają transdyferencjacji do komórek neuronalnych pod wpływem odpowiednich czynników. Na przykład izolowane z tarczycy i hodowane *in vitro* komórki C ulegają przekształceniu pod wpływem NGF-u w neurony serotonergiczne [17].

Badania nad eksplantatami grzebieni nerwowych wykazały, iż komórki te są w stanie wędrować wzdłuż wielu substratów m.in. wzdłuż fibronektyny, lamininy, witronektyny oraz kolagenu typów I, IV i VI. Komórki grzebieni nerwowych oddziałują z podłożem poprzez specyficzne integryny, np.  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  i  $\alpha 8\beta 1$  oddziałują z fibronektyną,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  i  $\alpha 8\beta 1$  oddziałują z witronektyną,  $\alpha 1\beta 1$  z lamininą. W miarę migracji i różnicowania się ómórek grzebieni nerwowych nasilają się różnice w ich własnościach adhezyjnych, związane ze zmianą ekspresji poszczególnych łańcuchów integryn [10,84].

Kolonizacja zarodkowego jelita przez pochodzące z grzebieni nerwowych komórki prekursorowe splotów Meissnera i Auerbacha zachodzi przy współdziałaniu NCAM i L1. Postępuje ona w kierunku doogonowym od przełyku do odbytnicy. Bardzo istotny w różnicowaniu się komórek splotów Meissnera i Auerbacha jest receptor *c-met*, wiążący HGF wydzielany przez otaczające tkanki. Dość często zdarzają się zaburzenia kolonizacji jelit przez komórki prekursorowe z grzebieni nerwowych i zaburzenia ich różnicowania związane z nieprawidłowościami adhezji międzykomórkowej. U człowieka odcinkowy brak wykształconych splotów Meissnera i Auerbacha prowadzi do choroby Hirschsprunga. Locus tego schorzenia w przypadkach rodzinnych jest położony w pobliżu protoonkogenu *c-met* [87,106].

## LITERATURA

- [1]ALFANDARI D, WHITTAKER CA, DESIMONE DW, DARRIBERE T. Integrin alpha v subunit is expressed on mesodermal cell surfaces during amphibian gastrulation. *Dev Biol* 1995; **170**: 249–261.

- [2] BARBACID M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 148–155.
- [3] BEHRENDTSEN O, ALEXANDER CM, WERB Z. Cooperative interactions between extracellular matrix, integrins and parathyroid hormone-related peptide regulate parietal endoderm differentiation in mouse embryos. *Development*. 1995; **121**: 4137–4148.
- [4] BELLAIRS R, LEAR P, YAMADA KM, RUTISHAUSER U, LASH JW. Posterior extension of the chick nephric (Wolffian) duct: the role of fibronectin and NCAM polysialic acid. *Dev Dyn* 1995; **202**: 333–342.
- [5] BERGLUND EO, RANSCHT B. Molecular cloning and in situ localization of the human contactin gene (CNTN1) on chromosome 12q11-q12. *Genomics*. 1994; **21**: 571–582.
- [6] BLADT F, RIETHMACHER D, ISENMANN S, AGUZZI A, BIRCHMEIER C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995; **376**: 768–771.
- [7] BOWEN MA, PATEL DD, LI X, MODRELL B, MALACKO AR, WANG WC, MARQUARDT H, NEUBAUER M, PESANDO JM, FRANCKE U. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 1995; **181**: 2213–2220.
- [8] BRINKMANN V, FOROUTAN H, SACHS M, WEIDNER KM, BIRCHMEIER W. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1573–1586.
- [9] BRONNER-FRASER M. Patterning of the vertebrate neural crest. *Perspect Dev Neurobiol* 1995; **3**: 53–62.
- [10] BROWN K.E., YAMADA K.M. the role of integrins during vertebrate development. *Sem Dev Biol* 1996; **6**: 69–77.
- [11] BURDEN-GULLEY S.M., LEMMON V. Ig superfamily adhesion molecules in the vertebrate nervous system: binding partners and signal transduction during axon growth. *Sem Dev Biol* 1995; **6**: 79–87.
- [12] BURNS FR, VON KANNEN S, GUY L, RAPER JA, KAMHOLZ J, CHANG S. DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron* 1991; **7**: 209–220.
- [13] CAMPBELL S, SWANN HR, SEIF MW, KIMBER SJ, APLIN JD. Cell adhesion molecules on the oocyte and preimplantation human embryo. *Hum Reprod* 1995; **10**: 1571–1578.
- [14] CHEDOTAL A; POURQUIE O; SOTELO C. Initial tract formation in the brain of the chick embryo: selective expression of the BEN/SC1/DM-GRASP cell adhesion molecule. *Eur J Neurosci* 1995; **7**: 198–212.
- [15] CHEDOTAL A, POURQUIE O, EZAN F, SAN CLEMENTE H, SOTELO C. BEN as a presumptive target recognition molecule during the development of the olivocerebellar system. *J Neurosci* 1996; **16**: 3296–3310.
- [16] CIFUENTES-DIAZ C, NICOLET M, ALAMEDDINE H, GOUDOU D, DEHAUPAS M, RIEGER F, MUGE RM. M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis. *Mech Dev* 1995; **50**: 85–97.
- [17] CLARK MS, LANIGAN TM, PAGE NM, RUSSO AF. Induction of a serotonergic and neuronal phenotype in thyroid C-cells. *J Neurosci* 1995; **15**: 6167–6178.
- [18] DANTO SI, SHANNON JM, BOROK Z, ZABSKI SM, CRANDALL ED. Reversible trans-differentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995; **12**: 497–502.
- [19] DAVID S, BRAUN PE, JACKSON DL, KOTTIS V, MCKERRACHER L. Laminin overrides the inhibitory effects of peripheral nervous system and central nervous system myelin-derived inhibitors of neurite growth. *J Neurosci Res* 1995; **42**: 594–602.
- [20] DEBERNARDO AP, CHANG S. Native and recombinant DM-GRASP selectively support neurite extension from neurons that express GRASP. *Dev Biol* 1995; **169**: 65–75.

- [21]DERMAN MP, CUNHA MJ, BARROS EJ, NIGAM SK, CANTLEY LG. HGF-mediated chemotaxis and tubulogenesis require activation of the phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol* 1995; **268**: F1211–F1217.
- [22]DESIMONE DW. Adhesion and matrix in vertebrate development. *Curr Op Cell Biol* 1994; **6**: 747–751.
- [23]ESPESETH A, JOHNSON E, KINTNER C. *Xenopus* F-cadherin, a novel member of the cadherin family of cell adhesion molecules, is expressed at boundaries in the neural tube. *Mol Cell Neurosci* 1995; **6**: 199–211.
- [24]FRANSEN E, SCHRANDER-STUMPEL C, VITS L, COUCKE P, VAN CAMP G, WILLEMS PJ. X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the LICAM gene. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 2255–2256.
- [25]FRANSEN E, LEMMON V, VAN CAMP G, VITS L, COUCKE P, WILLEMS PJ. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 1995; **3**: 273–284.
- [26]FREDETTE BJ, RANSCHT B. T-cadherin expression delineates specific regions of the developing motor axon-hindlimb projection pathway. *J Neurosci* 1994; **14**: 7331–7346.
- [27]GASSMANN M, CASAGRANDA F, ORIOLI D, SIMON H, LAI C, KLEIN R, LEMKE G. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 1995; **378**: 390–394.
- [28]GEORGE EL, GEORGES-LABOUESSE EN, PATEL-KING RS, RAYBURN H, HYNES RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 1993; **119**: 1079–1091.
- [29]GOSHIMA Y, NAKAMURA F, STRITTMATTER P, STRITTMATTER SM. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 1995; **376**: 509–514.
- [30]GULLBERG D, EKBLOM P. Extracellular matrix and its receptors during development. *Int J Dev Biol* 1995; **39**: 845–854.
- [31]GULLBERG D, SJOBERG G, VELLING T, SEJERSEN T. Analysis of fibronectin and vitronectin receptors on human fetal skeletal muscle cells upon differentiation. *Exp Cell Res* 1995; **220**: 112–123.
- [32]HAEGEL H, LARUE L, OHSUGI M, FEDOROV L, HERRENKNECHT K, KEMLER R. Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 1995; **121**: 3529–3537.
- [33]HAMMERMAN MR. Growth factors in renal development. *Semin Nephrol* 1995; **15**: 291–299.
- [34]HAY ED, ZUK A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis* 1995; **26**: 678–690.
- [35]HENS MD, DESIMONE DW. Molecular analysis and developmental expression of the focal adhesion kinase pp125<sup>FAK</sup> in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1995; **170**: 274–288.
- [36]ILLCD, FURUTA Y, KANAZAWA S, TAKEDA N, SOBUE K, NAKATSUJIN, NOMURA S, FUJIMOTO J, OKADA M, YAMAMOTO T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 1995; **377**: 539–544.
- [37]INAGAKI S, FURUYAMA T, IWAHASHI Y. Identification of a member of mouse semaphorin family. *FEBS Lett* 1995; **370**: 269–272.
- [38]ITOH K, STEVENS B, SCHACHNER M, FIELDS RD. Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* 1995; **270**: 1369–1372.
- [39]ITOH K, SOKOL SY. Heparan sulfate proteoglycans are required for mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* 1994; **120**: 2703–2711.



- [40] JASPERS M, WU RR, VAN DER SCHUEREN B, CASSIMAN JJ. Localization of alpha 4m integrin at sites of mesenchyme condensation during embryonic mouse development. *Differentiation* 1995; **59**: 79–86.
- [41] JO SA, ZHU X, MARCHIONNI MA, BURDEN SJ. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature* 1995; **373**: 158–161.
- [42] JOUET M, MONCLA A, PATERSON J, MCKEOWN C, FRYER A, CARPENTER N, OLMBERGE, WADELIUS C, KENWRICK S. New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; **56**: 1304–1314.
- [43] KADOYA Y, KADOYA K, DURBEEJ M, HOLMVALL K, SOROKIN L, EKBLÖM P. Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin alpha 6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *J Cell Biol* 1995; **129**: 521–534.
- [44] KASPER M, BEHRENS J, SCHUH D, MÜLLER M. Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury. *Histochem Cell Biol* 1995; **103**: 281–286.
- [45] KINTNER C. Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* 1992; **69**: 225–236.
- [46] KOSTROMINOVA TY, TANZER ML. Rodent myoblast interactions with laminin require cell surface glycoconjugates but not laminin glycosyl groups. *J Cell Biochem* 1995; **57**: 163–172.
- [47] KOZLOV SV, GIGER RJ, HASLER T, KORVATSKA E, SCHORDERET DF, SONDEREGGER P. The human TAX1 gene encoding the axon-associated cell adhesion molecule TAG-1/axonin-1: genomic structure and basic promoter. *Genomics* 1995; **30**: 141–148.
- [48] L'ECUYER TJ, TOMPACH PC, MORRIS E, FULTON AB. Transdifferentiation of chicken embryonic cells into muscle cells by the 3' untranslated region of muscle tropomyosin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7520–7524.
- [49] LALLEMAND AV, RUOCCO SM, GAILLARD DA. Synthesis and expression of laminin during human foetal lung development. *Anat Rec* 1995; **242**: 233–241.
- [50] LALLIER TE, WHITTAKER CA, DESIMONE DW. Integrin  $\alpha 6$  expression is required for early nervous system development in *Xenopus laevis*. *Development* 1996; **122**: 2539–2554.
- [51] LANDOLT RM, VAUGHAN L, WINTERHALTER KH, ZIMMERMANN DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 1995; **121**: 2303–2312.
- [52] LEE KF, SIMON H, CHEN H, BATES B, HUNG MC, HAUSER C. Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 1995; **378**: 394–398.
- [53] LETHL A, LAURENT JP, FIGUROV A, MULLER D, SCHACHNER M. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 1994; **372**: 777–779.
- [54] LILJELUND P, GHOSH P, VAN DEN POL AN. Expression of the neural axon adhesion molecule L1 in the developing and adult rat brain. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32886–32895.
- [55] LINDHOLM D. Role of neurotrophins in preventing glutamate induced neuronal cell death. *J Neurol* 1994; **242**: S16–S18.
- [56] MESSERSMITH EK, LEONARDO ED, SCHATZ CJ, TESSIER-LAVIGNE M, GOODMAN CS, KOLODKIN AL. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 1995; **14**: 949–959.
- [57] MEYER D, BIRCHMEIER C. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 1995; **378**: 386–390.
- [58] MIETTINEN PJ, EBNER R, LOPEZ AR, DERYNCK R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 1994; **127**: 2021–2036.

- [59]MILEV P, FRIEDLANDER DR, SAKURAI T, KARTHIKEYAN L, FLAD M, MARGOLIS RK, GRUMET M, MARGOLIS RU. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1703–1715.
- [60]MUKASA R, UMEDA M, ENDO T, KOBATA A, INOUE K. Characterization of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NCAM on mouse skeletal muscle cell line C2C12: the structure of the GPI glycan and release during myogenesis. *Arch Biochem Biophys* 1995; **318**: 182–190.
- [61]MYOKAI F, WASHIO N, ASAHARA Y, YAMAAIT, TANDA N, ISHIKAWA T, AOKI S, KURIHARA H, MURAYAMA Y, SAITO T. Expression of the hepatocyte growth factor gene during chick limb development. *Dev Dyn* 1995; **202**: 80–90.
- [62]NATHKE IS, HINCK L, NELSON, WJ. The cadherin/catenin complex: connections to multiple cellular processes involved in cell adhesion, proliferation and morphogenesis. *Sem Dev Biol* 1995; **6**: 89–95.
- [63]NEWGREEN DF, MINICHELLO J. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in the onset of neural crest cell migration are separable and inducible by protein kinase inhibitors. *Dev Biol* 1995; **170**: 91–101.
- [64]NIRANJAN B, BULUWELA L, YANT J, PERUSINGHE N, AHERTON A, PHIPPARD D, DALE T, GUSTERSON B, KAMALATI T. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Development* 1995; **121**: 2897–2908.
- [65]OMRI B, CRISANTI P, ALLIOT F, MARTY MC, RUTIN J, LEVALLOIS C, PRIVAT A, PESSAC B. CD4 expression in neurons of the central nervous system. *Int Immunol* 1994; **6**: 377–385.
- [66]OOHIRA A. Proteoglycans in the developing brain. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 1995; **15**: 171–176.
- [67]ORTH JM, JESTER WF. NCAM mediates adhesion between gonocytes and Sertoli cells in cocultures from testes of neonatal rats. *J Androl* 1995; **16**: 389–399.
- [68]PATAPOUTIAN A, WOLD BJ, WAGNER RA. Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle. *Science* 1995; **270**: 1818–1821.
- [69]PEPPER MS, SORIANO JV, MENOUD PA, SAPPINO AP, ORCI L, MONTESANO R. Modulation of hepatocyte growth factor and c-met in the rat mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Exp Cell Res* 1995; **219**: 204–210.
- [70]PIMENTA AF, ZHUKAREVA V, BARBE MF, REINOSO BS, GRIMLEY C, HENZEL W, FISCHER I, LEVITT P. The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron* 1995; **15**: 287–297.
- [71]POLTORAK M, KHOJA I, HEMPERLY JJ, WILLIAMS JR, EL-MALLAKH R, FREED WJ. Disturbances in cell recognition molecules (N-CAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia. *Exp Neurol* 1995; **131**: 266–272.
- [72]PÜSCHEL AW, ADAMS RH, BETZ H. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 1995; **14**: 941–948.
- [73]RAFUSE VF, LANDMESSER L. Contractile activity regulates isoform expression and polysialylation of NCAM in cultured myotubes: involvement of Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C. *J Cell Biol* 1996; **132**: 969–983.
- [74]RANSCHT B. Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Op Cell Biol* 1994; **6**: 740–746.
- [75]RAO MS, REDDY JK. Hepatic transdifferentiation in the pancreas. *Semin Cell Biol* 1995; **6**: 151–156.
- [76]REDIES C. Cadherin expression in the developing vertebrate CNS: from neuromeres to brain nuclei and neural circuits. *Exp Cell Res* 1995; **220**: 243–256.

- [77]REID RA, BRONSON DD, YOUNG KM, HEMPERLY JJ. Identification and characterization of the human cell adhesion molecule contactin. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; **21**: 1–8.
- [78]REUTER U, CHAMPION C, KAIN HL. Transdifferentiation of human monocytes into fibroblast-like cells in vitro. *Ger J Ophthalmol* 1995; **4**: 182–187.
- [79]ROLETTO F, GALVANI AP, CRISTIANI C, VALSASINA B, LANDONIO A, BERTOLERO F. Basic fibroblast growth factor stimulates hepatocyte growth factor/scatter factor secretion by human mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 1996; **166**: 105–111.
- [80]ROSE O, ROHWEDDEL J, REINHARDT S, BACHMANN M, CRAMER M, ROTTER M, WOBUS A, STARZINSKI-POWITZ A. Expression of M-cadherin protein in myogenic cells during prenatal mouse development and differentiation of embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 1994; **201**: 245–259.
- [81]ROSENBERG L. In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 1995; **4**: 371–383.
- [82]RUIZ JC, CUPPENS H, LEGIUS E, FRYNS JP, GLOVER T, MARYNEN P, CASSIMAN JJ. Mutations in LI-CAM in two families with X linked complicated spastic paraplegia, MASA syndrome, and HSAS. *J Med Genet* 1995; **32**: 549–552.
- [83]SCHMIDT C, BLADT F, GOEDECKE S, BRINKMANN V, ZSCHIESCHE W, SHARPE M, GHERARDI E, BIRCHMEIER C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; **373**: 699–702.
- [84]SCHNAPP LM, HATCH N, RAMOS DM, KLIMANSKAYA IV, SHEPPARD D, PYTELA R. The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23196–23202.
- [85]SCHRANDER-STUMPEL C, HWELER C, JONES M, SOMMER A, STEVENS C, TINSCHERT S, ISRAEL J, FRYNS JP. Spectrum of X-linked hydrocephalus (HSAS), MASA syndrome, and complicated spastic paraplegia (SPG1): Clinical review with six additional families. *Am J Med Genet* 1995; **57**: 107–116.
- [86]SHANNON JM. Induction of alveolar type II cell differentiation in fetal tracheal epithelium by grafted distal lung mesenchyme. *Dev Biol* 1994; **166**: 600–614.
- [87]SHIMOTAKE T, IWAI N, YANAGIHARA J, DEGUCHI E, FUSHIKI S. Impaired proliferative activity of mesenchymal cells affects the migratory pathway for neural crest cells in the developing gut of mutant murine embryos. *J Pediatr Surg* 1995; **30**: 445–447.
- [88]SIMONNEAU L, KITAGAWA M, SUZUKI S, THIERY JP. Cadherin 11 expression marks the mesenchymal phenotype: towards new functions for cadherins? *Cell Adhes Commun* 1995; **3**: 115–130.
- [89]SNELL WJ, WHITE JM. The molecules of mammalian fertilization. *Cell* 1996; **85**: 629–637.
- [90]STOECKLI ET, LANDMESSER LT. Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play different roles in the *in vivo* guidance of chick commissural neurons. *Neuron* 1995; **14**: 1165–1179.
- [91]STREIT A, STERN CD, THURY C, IRELAND GW, APARICIO S, SHARPE MJ, GHERARDI E. A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development* 1995; **121**: 813–824.
- [92]STUART RO, NIGAM SK. Development of the tubular nephron. *Semin Nephrol* 1995; **15**: 315–326.
- [93]SUTER DM, POLLERBERG GE, BUCHSTALLER A, GIGER RJ, DREYER WJ, SONDE-REGGER P. Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1067–1081.
- [94]SUTHERLAND AE, CALARCO PG, DAMSKY CH. Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1331–1348.
- [95]SUZUKI HR, SOLURSH M, BALDWIN HS. Relationship between fibronectin expression during gastrulation and heart formation in the rat embryo. *Dev Dyn* 1995; **204**: 259–277.

- [96]SZE LY, LEE KK, WEBB SE, LIZ, PAULIN D. Migration of myogenic cells from the somites to the fore-limb buds of developing mouse embryos. *Dev Dyn* 1995; **203**: 324–336.
- [97]TAKEBAYASHI T, IWAMOTO M, JIKKO A, MATSUMURA T, ENOMOTO-IWAMOTO M, MYOUKAI F, KOYAMA E, YAMA AIT, MATSUMOTO K, NAKAMURA T. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes. *J Cell Biol* 1995; **129**: 1411–1419.
- [98]TANNAHILL L, KLEIN R, SCHACHNER M. The neurotrophin receptors TrkA and TrkB are inhibitory for neurite outgrowth. *Eur J Neurosci* 1995; **7**: 1424–1428.
- [99]TSONIS PA, WASHABAUGH CH, DEL RIO-TSONIS K. Transdifferentiation as a basis for amphibian limb regeneration. *Semin Cell Biol* 1995; **6**: 127–135.
- [100]TSUJI S, KAWANO S, TSUJII M, FUSAMOTO H, KAMADA T. Roles of hepatocyte growth factor and its receptor in gastric mucosa. A cell biological and molecular biological study. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 1132–1139.
- [101]TURPEENIEMI-HUJANEN T, FEINBERG RF, KAUPPILA A, PUISTOLA U. Extracellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events. *Fertil Steril* 1995; **64**: 132–138.
- [102]UEHARA Y, MINOWA O, MORI C, SHIOTA K, KUNO J, NODA T, KITAMURA N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; **373**: 702–705.
- [103]UYEMURA K, TAKEDA Y, ASOU H, HAYASAKA K. Neural cell adhesion proteins and neurological diseases. *J Biochem (Tokyo)* 1994; **116**: 1187–1192.
- [104]VAUGHAN L, WEBER P, D'ALESSANDRI L, ZISCH AH, WINTERHALTER KH. Tenascin-contactin/F11 interactions: a clue for a developmental role? *Perspect Dev Neurobiol* 1994; **2**: 43–52.
- [105]WANG Y, SELDEN C, FARNAUD S, CALNAN D, HODGSON HJ. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is expressed in human epithelial cells during embryonic development; studies by in situ hybridisation and northern blot analysis. *J Anat* 1994; **185**: 543–551.
- [106]WATANABE Y, ITO T, HARADA T, TAKAHASHI M, KOBAYASHI S, OZAKI T, NIMURA Y. Expression of ret proto-oncogene products in the hypoganglionic segment of the small intestine of congenital aganglionosis rats. *J Pediatr Surg* 1995; **30**: 641–645.
- [107]WINKLB AUER R. Mesoderm cell migration in the vertebrate gastrula. *Sem Dev Biol* 1994; **5**: 91–99.
- [108]WOOLF AS, KOLATSI-JOANNOU M, HARDMAN P, ANDERMARCHER E, MOORBY C, FINE LG, JAT PS, NOBLE MD, GHERARDI E. Roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol* 1995; **128**: 171–184.
- [109]WRIGHT DE, WHITE FA, GERFEN RW, SILOS-SANTIAGO I, SNIDER WD. The guidance molecule semaphorin III is expressed in regions of spinal cord and periphery avoided by growing sensory axons. *J Comp Neurol* 1995; **361**: 321–333.
- [110]YAGAMI-HIROMASA T, SATO T, KURISAKI T, KAMIJO K, NABESHIMA Y, FUJISAWA-SEHARA A. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 1995; **377**: 652–656.
- [111]YAMAGATA M, HERMAN JP, SANES JR. Lamina-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 1995; **15**: 4556–4571.
- [112]YANG JT, RAYBURN H, HYNES RO. Embryonic mesodermal defects in  $\alpha 5$  integrin-deficient mice. *Development* 1993; **119**: 1093–1105.
- [113]YANG Y, SPITZER E, MEYER D, SACHS M, NIEMANN C, HARTMANN G, WEIDNER KM; BIRCHMEIER C, BIRCHMEIER W. Sequential requirement of hepatocyte growth factor and neuregulin in the morphogenesis and differentiation of the mammary gland. *J Cell Biol* 1995; **131**: 215–226.

- [114]YIM SH, FARRER RG, QUARLES RH. Expression of glycolipids and myelin-associated glycoprotein during the differentiation of oligodendrocytes: comparison of the CG-4 glial cell line to primary cultures. *Dev Neurosci* 1995; **17**: 171–180.
- [115]YOSHIHARA Y, MORI K. Telencephalin: a neuronal area code molecule? *Neurosci Res* 1994; **21**: 119–124.
- [116]ZHUKAREVA V, LEVITT P. The limbic system-associated membrane protein (LAMP) selectively mediates interactions with specific central neuron populations. *Development* 1995; **121**: 1161–1172.
- [117]ZISCH AH, D’ALESSANDRI L, RANSCHT B, FALCHETTO R, WINTERHALTER KH, VAUGHAN L. Neuronal cell adhesion molecule contactin/F11 binds to tenascin via its immunoglobulin-like domains. *J Cell Biol* 1992; **119**: 203–213.
- [118]ZISCH AH, D’ALESSANDRI L, AMREIN K, RANSCHT B, WINTERHALTER KH, VAUGHAN L. The glypiated neuronal cell adhesion molecule contactin/F11 complexes with src-family protein tyrosine kinase Fyn. *Mol Cell Neurosci.* 1995; **6**: 263–279.
- [119]ZUK A, HAY ED. Expression of beta 1 integrins changes during transformation of avian lens epithelium to mesenchyme in collagen gels. *Dev Dyn* 1994; **201**: 378–393.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 23.12.1996 r.*

*Przyjęto: 17.03.1997 r.*

*Adres autora: ul. Chalubińskiego 5, 02-004 Warszawa*



## INAKTYWACJA CHROMOSOMU X (AKTUALNE DONIESIENIA)

### X CHROMOSOME INACTIVATION (CURRENT VIEWS)

Alina WOJDA

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

*Streszczenie:* W 1961 roku Mary Lyon opisała, występujący we wszystkich żeńskich komórkach somatycznych ssaków proces inaktywacji jednego z pary chromosomów X. Inaktywacja ta, czyli transkrypcyjne wyciszenie ma na celu wyrównanie dawki większości genów sprzężonych z chromosomem X między organizmami żeńskimi (46,XX) i męskimi (46,XY). Na skutek inaktywacji nieaktywny chromosom X nabywa cech, które odróżniają go od aktywnego chromosomu X i chromosomów autosomowych. Różnice te dotyczą czasu replikacji, stopnia metylacji, acetylacji i kondensacji oraz poziomu ekspresji licznych genów. W procesie inaktywacji najważniejszą rolę przypisuje się centrum inaktywacji chromosomu X, które inicjuje inaktywację. Następnymi etapami są rozprzestrzenianie i utrwalanie inaktywacji. Podstawy molekularne wymienionych trzech etapów inaktywacji nie są jeszcze dokładnie poznane. Jednakże ostatnie wyniki badań z zastosowaniem metod biologii molekularnej wnoszą nowe informacje dotyczące mechanizmów inaktywacji, konsekwencji jej zaburzeń spowodowanych aberracjami chromosomu X i jej wpływu na fenotyp.

*Słowa kluczowe:* inaktywacja, centrum inaktywacji (XIC), XIST, pozycyjny efekt różnorodności (PEV), region pseudoautosomowy (PAR)

*Summary:* In females during the early mitotic divisions one of the chromosomes X undergoes inactivation. The inactive chromosome differs from the active one in many features like replication timing, methylation, acetylation, degree of condensation and expression of various genes. The aim of the inactivation process of the one of the X chromosome is dosage compensation of genes between males possessing only one X chromosome and females possessing two chromosomes.

The molecular mechanisms of the inactivation process are not yet sufficiently elucidated. However, the last results about the inactivation process give some new informations about consequences of inappropriate inactivation causing absence of the X chromosome or X chromosome aberrations and influence on the phenotype, lethality including.

*Key words:* Inactivation, X inactivation center (XIC), X inactive specific transcript (XIST), position effect of variegation (PEV), pseudoautosomal region (PAR).

## WSTĘP

U wielu gatunków, także u ssaków, osobniki żeńskie mają dwa chromosomy X, męskie jeden chromosom X. Różnica ta ma krytyczne znaczenie w procesie determinacji płci. Jednakże geny sprzężone z chromosomem X kodują wiele białek, których poziom musi być zrównoważony u kobiet i mężczyzn, musi zatem ulec zrównoważeniu poziom ekspresji tych genów między osobnikami żeńskimi i męskimi. W żeńskich komórkach somatycznych człowieka zrównoważenie dawki genów zlokalizowanych w chromosomie X między kobietami (46,XX) i mężczyznami (46,XY) zachodzi drogą losowej inaktywacji, czyli "transkrypcyjnego wyciszenia", jednego z pary chromosomów X pochodzenia matczynego lub ojcowskiego. W ten sposób u osobników obu płci geny zlokalizowane w chromosomie X ulegają ekspresji tylko w jednym, aktywnym chromosomie X [2, 18].

Konsekwencją losowej inaktywacji chromosomu X jest występujący u kobiet mozaicyzm komórkowy, czyli obecność w żeńskim organizmie dwóch populacji komórek różniących się zawartością aktywnego chromosomu X pochodzenia matczynego lub ojcowskiego. Jedna populacja komórek somatycznych żeńskich wykazuje ekspresję genów sprzężonych z chromosomem X pochodzących od matki, druga pochodzących od ojca. Stąd kobiety, z letalnymi dla osobników męskich mutacjami genów sprzężonych z chromosomem X wykazują w mniejszym stopniu ich ekspresję niż mężczyźni. Tłumaczy się to w ten sposób, że komórki, w których ekspresji ulega prawidłowy allel dostarczają wystarczająco dużo produktów genowych do korekcji skutków mutacji w komórkach, w których ekspresji ulega gen patologiczny. Alternatywnie komórki z aktywnym chromosomem X zawierającym zmutowany gen mogą ulegać eliminacji [17,27].

Obecność dwóch aktywnych chromosomów X w komórkach somatycznych żeńskich człowieka jest letalna podczas embriogenezy [22]. Natomiast brak kompensacji dawki poszczególnych tylko genów powoduje zaburzenia fenotypowe u kobiet [16]. Proces kompensacji dawki genów sprzężonych z chromosomem X nie zachodzi u osobników mających tylko jeden chromosom X, czyli u mężczyzn i kobiet o kariotypie 45,X

Inaktywacja jednego z chromosomów płci, zjawisko nie występujące w chromosomach autosomowych, jest powodem odmiennego od autosomów zachowywania się chromosomów płci zarówno podczas podziałów mitotycznych, jak i mejotycznych. Podczas wczesnych mitotycznych podziałów zygoty w żeńskich komórkach somatycznych człowieka obydwa chromosomy X są aktywne, to znaczy ulegają replikacji równocześnie z chromosomami autosomowymi.

Po zróżnicowaniu komórek blastocysty na trofoblast i węzeł zarodkowy chromosom X pochodzenia ojcowskiego ulega inaktywacji. Inaktywacja ta jest jednak nietrwała i po 12 dniach w komórkach trofoblastu, a po 16 dniach w komórkach



węzła zarodkowego nieaktywny chromosom X ulega reaktywacji po czym zachodzi proces tak zwanej lionizacji, czyli losowa inaktywacja jednego z dwóch chromosomów X, pochodzenia matczynego lub ojcowskiego [9,13,14,20]. Jest to inaktywacja trwała. Raz zinaktywowany chromosom X pozostaje nieaktywny we wszystkich komórkach potomnych [22]. Nieaktywny chromosom X widoczny jest na obrzeżu jądra interfazowego jako skondensowana grudka chromatyny, tak zwane ciało Barra [22].

W komórkach rozrodczych człowieka podczas oogenezy i spermatogenezy proces inaktywacji chromosomu X przebiega inaczej niż w komórkach somatycznych. W premejotycznych oogoniach jeden z dwóch chromosomów X jest nieaktywny. Na początku mejozy, w stadium profazy ulega on reaktywacji i pozostaje aktywny do zakończenia oogenezy [23]. W premejotycznych spermatocytach [9] lub według innych autorów w mejotycznej profazie I [7] chromosom X ulega przejściowej inaktywacji i kondensacji i tym samym formuje wraz z chromosomem Y pęcherzyk płci [7,8]. W pęcherzyku płci chromosomy X i Y ulegają koniugacji w regionach pseudoautosomowych (PAR), w których sekwencje DNA chromosomów X i Y są homologiczne [25]. Niehomologiczne regiony chromosomów X i Y nie ulegają koniugacji. Zapobiega to rekombinacji między niehomologicznymi, czyli specyficznymi tylko dla chromosomu X lub Y sekwencjami DNA [3,11,21].

Wybór chromosomu X mającego pozostać aktywnym oraz liczba chromosomów X mających pozostać aktywnymi dokonywany jest we wczesnej embriogenezie [9,13,19,22,29].

## MECHANIZMY PROCESU INAKTYWACJI

Inaktywacja chromosomu X jest procesem złożonym, dotąd jeszcze niezupełnie poznanym. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy można wyodrębnić następujące etapy tego procesu:

- zapoczątkowanie inaktywacji we wczesnej embriogenezie,
- rozprzestrzenienie inaktywacji na cały chromosom X,
- utrwalanie inaktywacji

A) **Zapoczątkowanie inaktywacji we wczesnej embriogenezie.** Podstawy molekularne mechanizmów zapoczątkowujące inaktywację nie są dokładnie znane, jednak w literaturze opisanych jest kilka hipotez i sugestii zasługujących na uwagę.

Inicjacja inaktywacji jest regulowana przez cis - inaktywator XIST (z ang. *inactive specific transcript*), czyli gen XIST znajdujący się w chromosomie ulegającym procesowi inaktywacji. Locus XIST zmapowano w regionie Xq13.2 [8,9,29] wewnątrz segmentu Xq13 chromosomu X, zwanym centrum inaktywacji – XIC (z

ang. *X inactivation center*) [27]. Region ten ulega ekspresji tylko w nieaktywnym chromosomie X i produkuje funkcjonalny mRNA pozostający w jądrze komórkowym, w pobliżu ciała Barra. Prawdopodobnie łączy się on z chromosomem X i zmieniając strukturę jego chromatyny powoduje inaktywację chromosomu [8,10,13,15].

Według innej hipotezy, inicjacja inaktywacji jednego z pary chromosomów X jest regulowana przez drugi chromosom X na zasadzie interakcji między regionami XIC obu chromosomów X. Wskutek czego jeden z elementów XIC przyjmuje konformację umożliwiającą ekspresję locus XIST w drugim chromosomie. Interakcja ta zachodzi tylko wtedy, gdy oba centra inaktywacji znajdują się na dwóch różnych chromosomach X. Stąd inaktywację obserwuje się tylko wówczas, gdy w komórce jest więcej niż jeden chromosom X i co najmniej dwa chromosomy X posiadają centra inaktywacji. Proces ten zwany jest poprzecznym efektem inaktywacji [23,25,27].

Aktywne regiony genomu wymagają acetylacji histonu H4, jednego z czterech histonów wchodzących w skład nukleosomów chromosomów. Zahamowanie acetylacji histonu H4 jednego z chromosomów X prowadzi do inaktywacji tego chromosomu [5,24].

Liczba aktywnych chromosomów X w komórce kontrolowana jest przez produkty genów autosomowych. Zatem w prawidłowych komórkach diploidalnych człowieka (46,XX oraz 46,XY) tylko jeden chromosom X jest aktywny. Dotyczy to także osobników o nieprawidłowej, zwiększonej, trisomicznej liczbie chromosomów płci np: 47,XXX i 47,XXY, w których także tylko jeden chromosom X jest aktywny. W przypadku poliploidii, w żeńskich komórkach triploidalnych człowieka, 69,XXX na skutek zwiększonej ilości produktów genów autosomowych, dwa chromosomy X są aktywne, natomiast w męskich 69,XXY oba chromosomy X są aktywne. W komórkach, w których wystąpiła trisomia chromosomów płci, dla zachowania aktywności dwóch chromosomów X w genomie musiałby istnieć dodatkowy gen autosomowy powodujący aktywację dodatkowego chromosomu X. W organizmach diploidalnych liczba aktywnych i nieaktywnych chromosomów X zależy więc od proporcji chromosomów płci w stosunku do chromosomów autosomowych (X:A). Autosomowy gen, przypuszczalny kandydat odpowiedzialny za utrzymanie aktywności chromosomu X u człowieka, znajduje się na chromosomach pary 1, 9 lub 19 [6,19,22,23,27].

B) **Rozprzestrzenianie inaktywacji na cały chromosom X.** Mechanizmem odpowiedzialnym za rozprzestrzenianie inaktywacji na cały chromosom X może być pozycyjny efekt różnorodności PEV (z ang. *position effect variegation*), polegający na utracie przez geny aktywności w wyniku ich przesunięciu w sąsiedztwo heterochromatyny, czyli ich heterochromatynizacji [23].

Rozprzestrzenienie inaktywacji z regionu XIST zachodzi także dzięki metylacji przez metylotransferazę reszt cytozyny w obrębie loci ulegających inaktywacji.

Nadmierna metylacja reszt cytozynowych prowadzi do inaktywacji informacji genetycznej w zmetylowanym segmencie DNA. Jest ona wiernie przekazywana podczas mitotycznych podziałów komórkowych, ponieważ zmetylowane miejsca na zasadzie sprzężenia zwrotnego utrzymują stałą aktywność metylotransferazy [27]. Loci nie ulegające inaktywacji nie podlegają hipermetylacji.

C) **Utrwalanie inaktywacji.** Ponieważ proces metylacji zachodzi późno w procesie hamowania transkrypcji prawdopodobnie pełni tylko rolę pomocniczą w stosunku do innych mechanizmów rozprzestrzeniających inaktywację. Być może jest potrzebny do jej utrzymania i odpowiada za wiernie przekazywanie procesu inaktywacji podczas mitozy [4,12,15,23,27].

Metylacja i kondensacja, powodujące zmianę struktury chromatyny, są prawdopodobnie spowodowane przez ten sam czynnik, który powoduje heterochromatyzację fakultatywną chromosomu X [23]. Heterochromatyzacja fakultatywna polega na zwiększeniu stopnia kondensacji chromatyny jednego z pary chromosomów i jego unieczynnieniu pod względem aktywności w syntezie RNA.

Do utrzymania inaktywacji przyczynia się prawdopodobnie konformacja ciałek Barra, w których telomery nieaktywnego chromosomu X znajdują się bardzo blisko siebie [19]. Zmiana struktury nieaktywnego chromosomu X jest raczej wtórną modyfikacją niż powodem inaktywacji [7].

Istnieje także hipoteza sugerująca, iż początkowo inaktywacji ulega cały chromosom X, po czym sama metylacja nie jest utrzymywana w sposób ciągły, lecz skokowo przechodzi z jednego locus na następny [7,20].

W procesie utrwalania inaktywacji nie bierze udziału centrum inaktywacji [6].

## **GENY ZLOKALIZOWANE NA NIEAKTYWNYM CHROMOSOMIE NIE ULEGAJĄCE PROCESOWI INAKTYWACJI**

Procesowi inaktywacji nie ulega cały materiał genetyczny chromosomu X. Część genów zachowuje aktywność transkrypcyjną. Są to geny mające swoje homologi na chromosomie Y.

W regionach pseudoautosomowych chromosomu X PAR1: Xpter→Xp22.32 i PAR2: Xqter→Xq28 znajdują się geny wykazujące sekwencje identyczne z sekwencjami zlokalizowanymi w chromosomie Y: Ypter→Yp11.2 i Yqter.

W pozycji Xp22.3 znajdują się geny:

XG – determinujący grupę krwi,

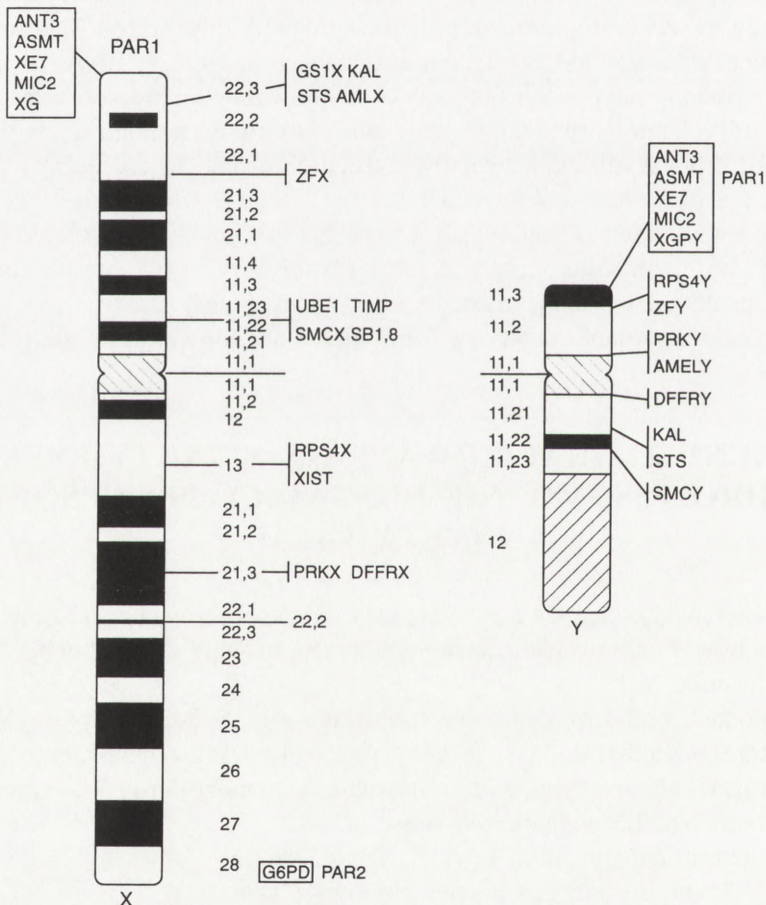
MIC2 – kodujące antygen powierzchniowy CD99,

ANT3 – kodujący translokazę ADP/ATP,

ASMT – acetyloserotoninę N-metylotransferazy.

W pozycji Xq28 znajduje się gen G6PD aktywny tylko w kosmówce.

Sekwencje homologiczne wykryto także poza regionami pseudoautosomowymi. Na granicy regionu pseudoautosomowego zlokalizowane są geny: AMELX – kodujący amelogeninę, STS – kodujący sulfatazę sterydową, KAL1 – geny odpowiedzialne za zespół Kallmana. W pozycji Xp22.1 znajduje się gen ZFX kodujący czynnik transkrypcyjny z domeną typu "palce cynkowe". W pozycji Xp11.2 zlokalizowano gen UBE1(A1S9T) kodujący enzym E1 aktywujący ubiquitynę (gen ten nie ma homologu na chromosomie Y), TIMP1 – kodujący tkankowy inhibitor nukleoproteinazy 1, SMCX (XE 169X), a także zachowujący aktywność, ale nie mający homologu na chromosomie Y gen SB1.8 o nieznannej funkcji. W pozycji Xq13 znajduje się gen RPS4X kodujący białko rybosomalne S4, w pozycji Xq13.2 zlokalizowany jest opisany wcześniej gen XIST, a w pozycji Xq21.3 gen dla białka



Rys. 1. Lokalizacja genów homologicznych dla chromosomów X i Y człowieka: PAR1 – region pseudoautosomowy 1, PAR2 – region pseudoautosomowy 2, wg [1,8]

kinazy PRKX. i DFFRX odpowiedzialny za fenotyp zespołu Turnera. Funkcja pozostałych genów dotąd jest nieznana. Oprócz XIST wymienione wyżej geny ulegają ekspresji z aktywnego i nieaktywnego chromosomu X i/lub chromosomu Y. Są to geny homologiczne, funkcjonalnie równoważne, organizowane jako potencjalnie aktywna chromatyna i nie reagujące na sygnał do inaktywacji lub ulegające inaktywacji jednak nie mogące jej utrzymać [20,29]. Brak tych genów powoduje różnorodne zaburzenia fenotypowe u kobiet [16,20,26,27,28,30,31,32].

## ZABURZENIA W PROCESIE INAKTYWACJI

Aberracje chromosomu X powodują zaburzenia w procesie inaktywacji. Delecja XIC jest przyczyną braku inaktywacji chromosomu X.

W przypadku translokacji między chromosomem X i chromosomem autosomowym, gdy translokowany fragment chromosomu X zawiera XIC następuje utrata aktywności chromosomu X. Gdy translokowany fragment chromosomu X nie obejmuje XIC chromosom X zachowuje aktywność. Natomiast gdy translokacja następuje po procesie inaktywacji, chromosom X pozostaje nieaktywny.

W przypadku translokacji zrównoważonej między chromosomem X, a autosomem inaktywacji ulega drugi z pary, prawidłowy chromosom X.

Chromosomy X ulegające innym aberracjom ale zachowujące XIC ulegają inaktywacji [4,23,14].

## PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów inaktywacji chromosomu X ma duże znaczenie dla zrozumienia zależności między fenotypem, a kariotypem. Pozwala na poznanie genów biorących udział w tworzeniu określonych cech fenotypowych. Wyjaśnienie procesów inaktywacji jest szczególnie ważne dla lekarzy klinicystów do właściwej interpretacji wyników badań kariotypów u pacjentów, u których stwierdzono aberracje chromosomów płci oraz u nosicieli chorób sprzężonych z płcią.

## LITERATURA

- [1] AFFARA N, BISHOP C, BROWN W, COOKE H, DAVEY P, ELLIS N, GRAVWS JM, JONES M, MITCHELL M, RAPPOLD G, TYLER-SMITH C, YEN P, LAU YFC. Report of the second international workshop on Y chromosome mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet*. 1996;73: 33–76
- [2] AGULNIK AI, MITHEL MJ, MATTEIMG, BARSANIG, AVNER PA, LERNER JL, BISHOP CE. A novel X gene with a widely transcribed Y-linked homologue escapes X-inactivation in mouse and human. *Hum Mol Genetics* 1994; 3: 879–884.

- [3] ANGEL RR. Meiosis I in human oocytes. *Cytogenet Cell Genet.* 1995; **69**: 266–272.
- [4] BARDONI B, ZANARIA E, GUIOLI S, FLORIDIA G, TONINI G, FERRANTE E, CHIU-MELLO G, McCABE ERB, FRACCARO M, ZUFFARDI O, CAMERINO. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet* 1994; **7**: 491–501.
- [5] BELYAEV ND, KOEHANE AM, TURNER BM. Differential underacetylation of histones H2A, H3 and H4 on the inactive X chromosome in human female cells. *Hum Genet.* 1996; **97**: 573–578.
- [6] BROWN CI, WILLARD HF. The human X inactivation centre is not required for maintenance of X chromosome inactivation. *Nature* 1994; **368**: 154–156.
- [7] DISTECHE CHM. Escape from X inactivation in human and mouse. *Trends Genet.* 1995; **11**: 17–22.
- [8] GOLDMAN MA. The silence of the X. *Nature Genet.* 1992; **2**: 169–170.
- [9] GUSTASHAW KM, ZURCHER V, DICKERMAN LH, STALLARD R, WILLARD HF. Partial X chromosome trisomy with functional disomy of Xp due to failure of X inactivation. *Am J Hum Genet.* 1994; **53**: 39–45.
- [10] HAAF T, WERNER P, SCHMID M. 5 azadeoxycytidine distinguishes between active and inactive X chromosome condensation. *Cytogenet Cell Genet.* 1993; **63**: 160–168.
- [11] HANDEL MA, PARK C, KOT M. Genetic control of sex-chromosome inactivation during meiosis. *Cytogenet Cell Genet.* 1994; **66**: 83–88.
- [12] HANSEN RS, GARTLER SM, SCOTT CR, CHEN SH, LAIRD CD. Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 571–578.
- [13] HARRISON KB, WARBURTON D. Preferential X chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet.* 1986; **46**: 163–168.
- [14] HEARD E, AVNER P. Role play in X-inactivation. *Hum Mol Genet.* 1994; **3**: 1481–1485.
- [15] HENDRICKS RW, CHEN ZY, HINDS H, SCHURMAN RKB, CRAIG IW. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the ornithine decarboxylase A gene. *Hum Mol Gene.* 1992; **1**: 187–194.
- [16] HSU LYF. Phenotype/karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. *Am J Hum Genet.* 1994; **53**: 108–140.
- [17] KAY GF, BARTON SC, SURNAI MA, RASTON S. imprinting and X chromosome counting mechanisms determine XIST expression in early mouse development. *Cell* 1994; **97**: 639–650.
- [18] KELLY RL, KURODA MI. Equality for X chromosomes. *Science* 1995; **270**: 1607–1610.
- [19] KORMAN BORTOLOTTO MH, WOODS CG, GREEN SH, WEBB T. X-inactivation in girls with Rett syndrome. *Clin Genet.* 1992; **42**: 296–301.
- [20] LAHN BT, MA N, BREG R, STRATTON R, SURTI U, PAGE DC. Xq-Yq interchange resulting in supernormal X-linked gene expression in severely retarded males with 46,XYq-karyotype. *Nature Genet.* 1994; **8**: 243–250.
- [21] LATOS-BIELEŃSKA A, VOGEL W. Demonstration of replication patterns in the last premeiotic S-phase of male Chinese hamsters after BrdU pulse labeling. *Chromosoma* 1992; **101**: 279–283.
- [22] LYON MF. Epigenetic inheritance in mammals. *Trends Genet.* 1993; **9**: 123–127.
- [23] MIGEON BR. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetics consequences. *Trends Genet.* 1994; **10**: 230–234.
- [24] MOENS PB. Histones H1 and H4 of surface-spread meiotic chromosomes. *Chromosoma* 1995; **104**: 169–174.
- [25] MOHANDAS TK, SPEED RM, PASSAGE MB, YEN PH, CHANDLEY AC, SHAPIRO LJ. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am J Hum Genet.* 1992; **51**: 526–533.
- [26] MUSCATELLI F, LENA D, MATTEI MG, FONTES M. A male with two contiguous

- inactivation centers on a single X chromosome: study of X inactivation and XIST expression. *Hum Mol Genet.* 1992; **1**: 115–119.
- [27] NORRIS DP, PATEL D, KAY GF, PENNY GD, BROCKDORF N. Evidence that random and imprinted XIST expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* 1994; **77**: 41–51.
- [28] O'REILLY AJ, AFFARANA, SIMPSON E, CHANDLER, GOULMY E, FERGUSON-SMITH MA. A molecular deletion map of the Y chromosome long arm defining X and autosomal homologous regions and the localisation of the HYA locus to the proximal region of the Yq euchromatin. *Hum Mol Genet.* 1992; **1**: 379–385.
- [29] PENNY GD, KAY GF, SHEARDOWN A, RASTAN S, BROCKORFF N. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. *Nature* 1996; **379**: 131–137.
- [30] SCHNEIDER-GADICKA A, BEER-ROMERO P, BROWN LG, NUSSBAUM R, PAGE DC. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant and escapes X inactivation. *Cell* 1989; **57**: 1247–1258.
- [31] THERMANE, LAXORA R, SUSMANN B. The critical region on the human Xq. *Hum Genet.* 1990; **85**: 455–461.
- [32] WOLF U, FRACCARA M, MAYEROVA A, HECHT T, ZUFFARDI O, HAMEISTER H. Turner syndrome patients are HY positive. *Hum Genet.* 1980; **54**: 315–318.

*Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński.*

*Otrzymano: 24.07. 1995 r.*

*Przyjęto: 26.02. 1997 r.*

*Adres autora: 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32*

## REGULACJA PROCESU STEROIDOGENEZY W KOMÓRKACH LEYDIGA SSAKÓW. ROLA BIAŁKA StAR\*

### REGULATION OF STEROIDOGENESIS IN LEYDIG CELLS. THE ROLE OF StAR PROTEIN

Barbara BILIŃSKA

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

*Streszczenie:* W artykule została opisana regulacja procesu biosyntezy hormonów steroidowych w komórkach Leydiga jako reprezentanta komórek steroidogennych. Mechanizmy regulujące wolną odpowiedź są znane i dobrze udokumentowane, obecnie przedstawiono dane dotyczące białek będących potencjalnymi regulatorami szybkiego procesu steroidogenezy zachodzącego w odpowiedzi na stymulację hormonalną. Szczególną uwagę zwrócono na rolę białka StAR. Opisano również molekularny mechanizm jego działania w komórkach Leydiga.

*Słowa kluczowe:* steroidogeneza, komórka Leydiga, stymulacja hormonalna, białka regulatorowe, StAR

*Summary:* The aim of this review is to describe the regulation of steroidogenesis in Leydig cells. Regulatory mechanisms responsible for slow cellular response are well known, while the acute regulation still remains to be clarified. Putative regulatory proteins involved in steroidogenesis in Leydig cells are of main interest. The role and molecular mechanism of StAR protein is also shown.,

*Key words:* steroidogenesis, Leydig cell, hormonal stimulation, regulatory proteins, StAR

## WSTĘP

Gonada męska jest głównym źródłem androgenów produkowanych w ustroju samca. Hormony te wytwarzane są przez komórki Leydiga leżące w tkance in-

\*W artykule zostały wykorzystane czasopisma i wydawnictwa książkowe zakupione dzięki: 1) World Health Organizations – SMA Grant, Special Programme of Research Training in Human Reproduction, 2) Grant KBN 0389/PO4/95/08 Warszawa.





terstycjalnej jądra. W kanalikach nasiennych znajdują się komórki Sertoliego oraz komórki rozrodcze: spermatogonia, spermatocyty I i II rzędu, spermatydy oraz plemniki. Warstwę otaczającą kanalik tworzą komórki mioidalne. Morfologicznie, oba elementy strukturalne jądra stanowią dobrze wyodrębnione części [86, 87, 17], natomiast funkcjonalnie działają jako całość, androgeny bowiem są odpowiedzialne za inicjowanie i utrzymanie spermatogenezy [18, 92, 95]. W świetle najnowszych badań wiadomo, że w jądrze zachodzi nie tylko regulacja endokrynowa, ale mają miejsce liczne para- i autokrynowe oddziaływania między komórkami, zarówno w obrębie przedziału kanalikowego, interstycjalnego, jak i między nimi [13, 25, 26, 88, 94].

Głównym stymulatorem procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga jest hormon luteinizujący (LH), wydzielany przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej. Komórki Leydiga są docelowymi dla tego hormonu, wiążą go przez receptory błonowe i dzięki temu zdolne są do odpowiedzi na stymulację hormonalną. Oprócz LH, wiele hormonów, czynników wzrostu oraz lokalnie działających, nowo opisanych białek może działać bezpośrednio na komórki Leydiga prowadząc do przyspieszenia lub zahamowania podstawowej syntezy steroidów lub przez modulację działania LH wpływać na tempo steroidogenezy stymulowanej przez ten hormon. Egzogennie podane hormony wiążąc się ze specyficznym transbłonowym receptorem wywołują kaskadę reakcji enzymatycznych, w następstwie których dochodzi do odpowiedzi komórkowej, tj. do zwiększonej syntezy i sekrecji androgenów. W wyniku stymulacji przez LH komórka jest zdolna do odpowiedzi w ciągu kilku minut lub ma miejsce wolny proces trwający wiele godzin. Efekt ten wiąże się ze wzmożoną transkrypcją genów, wzmożoną translacją białek będących produktami danego genu np. kompleksu enzymatycznego cytochromów P450, włączonych w biosyntezę testosteronu [48].

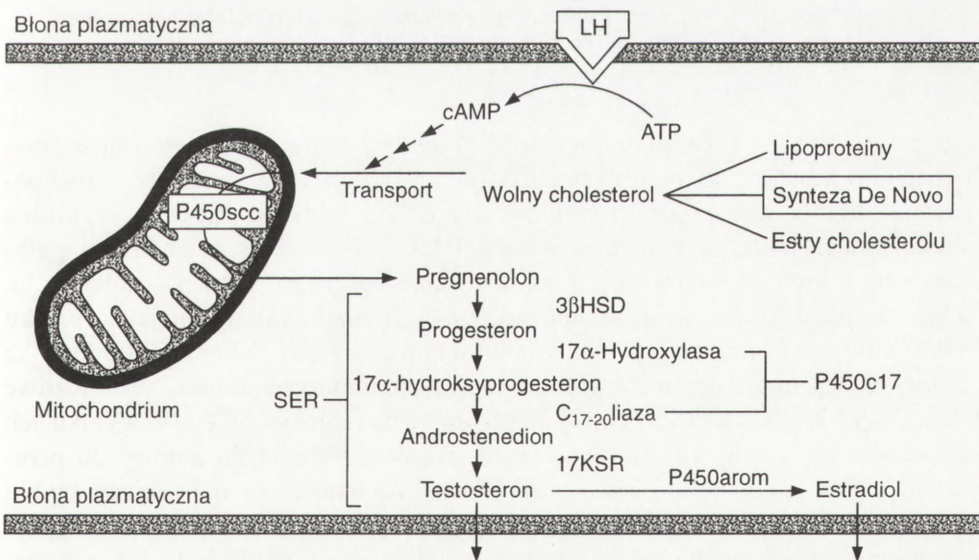
Przedmiotem zainteresowania w tym artykule będzie regulacja biosyntezy androgenów oraz czynniki, które mogą być za ten proces odpowiedzialne. Mechanizmy regulujące wolną odpowiedź komórki są dobrze poznane, udokumentowane i opisane od ponad 20 lat. Natomiast szybka, stała regulacja, która zachodzi w odpowiedzi na stymulację hormonalną w ciągu kilku minut, jest nadal nie w pełni wyjaśniona. Prawdopodobnie, mechanizmy leżące u podstawy tych wydarzeń są analogiczne dla wszystkich komórek steroidogennych, a komórki Leydiga są jedynie ich przedstawicielem.

## CHARAKTERYSTYKA PRZEBIEGU STEROIDOGENEZY

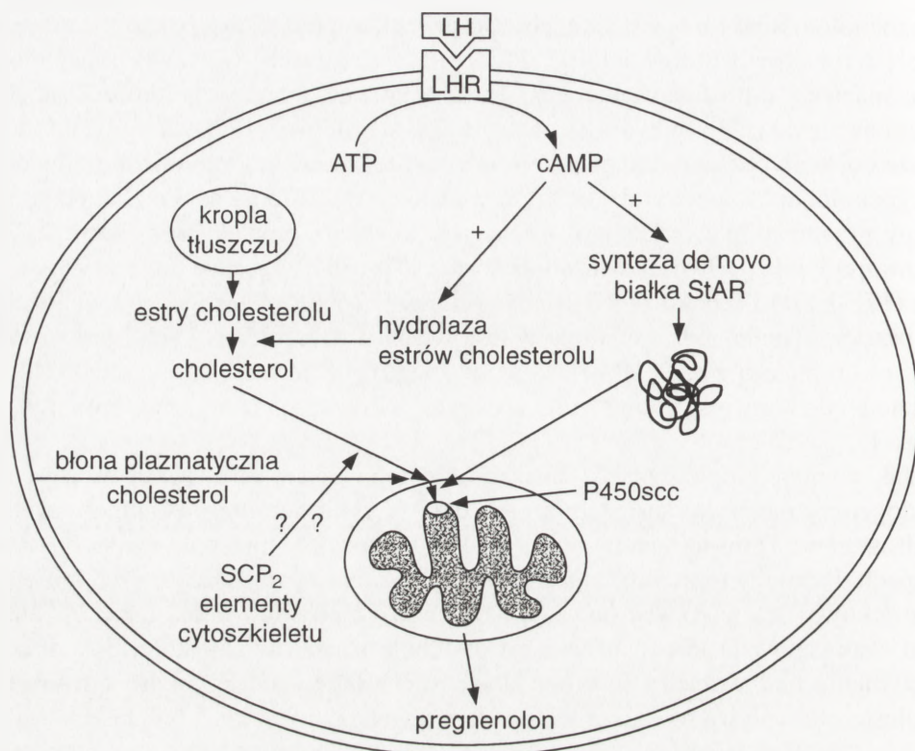
Biosynteza steroidów rozpoczyna się od enzymatycznego odszczepienia bocznego łańcucha cholesterolu (ang. *side chain cleavage* – scc), w wyniku czego powstaje

pregnenolon. Reakcja ta jest katalizowana przez kompleks enzymatyczny desmolazy cholesterolu (cytochromu  $P450_{scc}$ ), który jest ulokowany w wewnętrznej błonie oraz macierzy mitochondrialnej [28]. Ponadto, w mitochondriach komórek Leydiga znajduje się także  $3\beta$ -dehydrogenaza hydroksysteroidowa ( $17\beta$ -HSD), dzięki której może dojść do bezpośredniego przejścia cholesterolu w progesteron z pominięciem pregnenolonu. Enzym ten działa także we frakcji mikrosomalnej katalizując dalsze etapy przemian. We frakcji tej obecne jest również kompleks enzymatyczny cytochromu  $P450_{c17}$  (hydroksylaza/liaza) oraz  $17\beta$ -dehydrogenaza hydroksysteroidowa ( $17\beta$ -HSD) i reduktaza 17-ketosteroidowa ( $17$ -KSR), które są odpowiedzialne za przekształcenie androstendionu w testosteron. I wreszcie, aktywny jest również enzym, aromataza, z kompleksu enzymatycznego cytochromu  $P450_{arom}$ , dzięki której dochodzi do konwersji testosteronu w estradiol. Proces ten nosi nazwę aromatyzacji (rys. 1).

Jak wynika z powyższego opisu, do zainicjowania i utrzymania procesu steroidogenezy niezbędny jest stały zapas i dopływ cholesterolu, substratu do syntezy androgenów. Transport cholesterolu w komórkach Leydiga odbywa się w dwu etapach. Pierwszy to mobilizacja estrów cholesterolu z kropli lipidowych lub błony komórkowej oraz jego wędrówka do zewnętrznej błony mitochondrialnej. W etapie tym zaangażowana jest hydrolaza estrów cholesterolu, dzięki której dochodzi do otrzymania puli wolnego substratu do dalszych przemian. Szybkość formowania cholesterolu wpływa na dalsze tempo steroidogenezy i jest kluczowym zjawiskiem

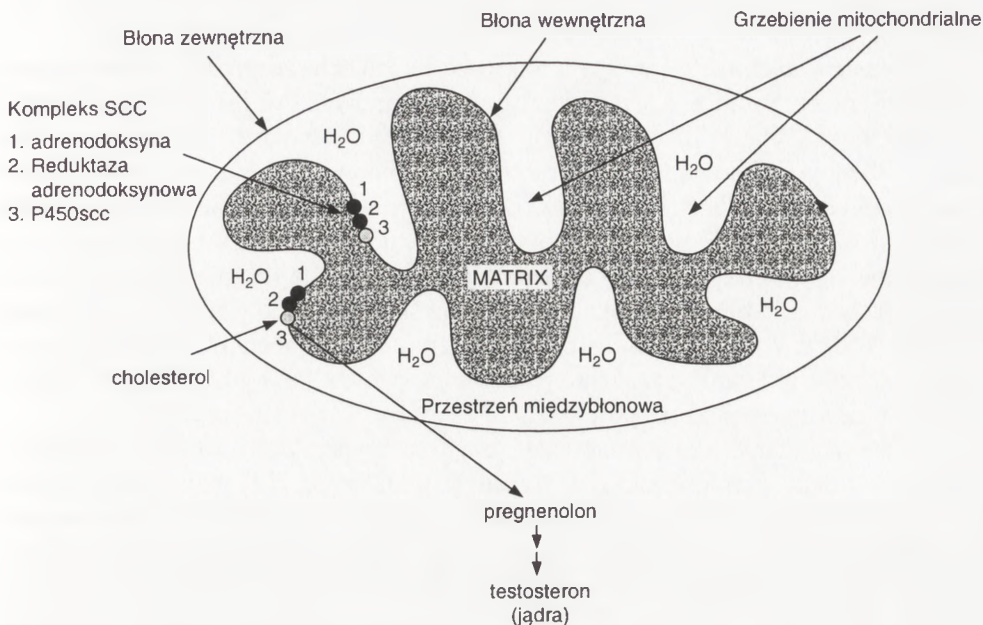


Rys. 1. Schemat procesu steroidogenezy stymulowanej przez LH w komórce Leydiga [wg 87]:  $P450_{scc}$ ,  $P450_{c17}$ ,  $P450_{arom}$  – kompleks enzymatyczny cytochromów P450,  $17\beta$ -HSD –  $17\beta$ -dehydrogenaza hydroksysteroidowa,  $17$ -KSR – reduktaza 17-ketosteroidowa



Rys. 2. Początkowy etap steroidogenezy przebiegający w odpowiedzi na stymulację hormonalną (opracowano wg [99], szczegóły w tekście): SCP<sub>2</sub> – białkowy nośnik steroli

tego procesu (rys. 2). Drugi etap to międzybłonowy transport cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej [101,102]. W macierzy mitochondrialnej działa kompleks enzymatyczny SCC, w skład którego wchodzi adredonoksyna oraz jej reduktaza wraz z P450<sub>scc</sub> (w błonie wewnętrznej mitochondrium), którego zadaniem jest odszczepienie bocznego łańcucha cholesterolu. W ten sposób powstaje pregnenolon (rys. 3) [84]. Dyfuzja cholesterolu jako związku hydrofobowego jest niezwykle wolnym i trudnym procesem. Pokonanie środowiska wodnego, wypełniającego międzybłonową przestrzeń mitochondrialną jest możliwe tylko dzięki specyficznym działającym enzymom kompleksu SCC. W wyniku ich aktywności utrzymany zostaje odpowiedni poziom cholesterolu gotowy do przekształcenia w pregnenolon. Musi więc istnieć mechanizm umożliwiający szybki transport cholesterolu wówczas, gdy w wyniku stymulacji hormonalnej następuje wzrost syntezy steroidów przez komórki Leydiga. Na podstawie badań z zastosowaniem hydroksylowanych analogów cholesterolu stwierdzono jego czasową niezdolność do odszczepiania bocznego łańcucha pomimo obecności aktywnego enzymu



Rys. 3. Mitochondrialny etap steroidogenezy w komórce Leydiga [wg 99], szczegóły w tekście

P450<sub>scc</sub>. Najprawdopodobniej jest to zabezpieczenie przed nadmiernym tworzeniem się pregnenolonu i w konsekwencji dalszych steroidów, wówczas gdy nie dochodzi do stymulacji hormonalnej [30,100,101]. Badania te stanowią dalszy krok w zrozumieniu zawłości mechanizmów odpowiedzialnych za transport cholesterolu. Tak więc regulacja steroidogenezy zachodzi pod kontrolą zespołu czynników ułatwiających transport cholesterolu z ich magazynów do zewnętrznej i dalej do wewnętrznej błony mitochondrialnej.

## ROLA TRANSLACJI, TRANSKRYPCJI I FOSFORYLACJI BIAŁKA W PRZEBIEGU STEROIDOGENEZY

Ze względu na szczególną rolę hormonów steroidowych zaangażowanych w homeostazę ustrojową i funkcje reprodukcyjne, zainteresowanie wyjaśnieniem mechanizmów regulujących proces ich powstawania jest wciąż duże. Wiadomo, iż w czasie steroidogenezy zachodzącej w wyniku odpowiedzi na stymulację hormonami

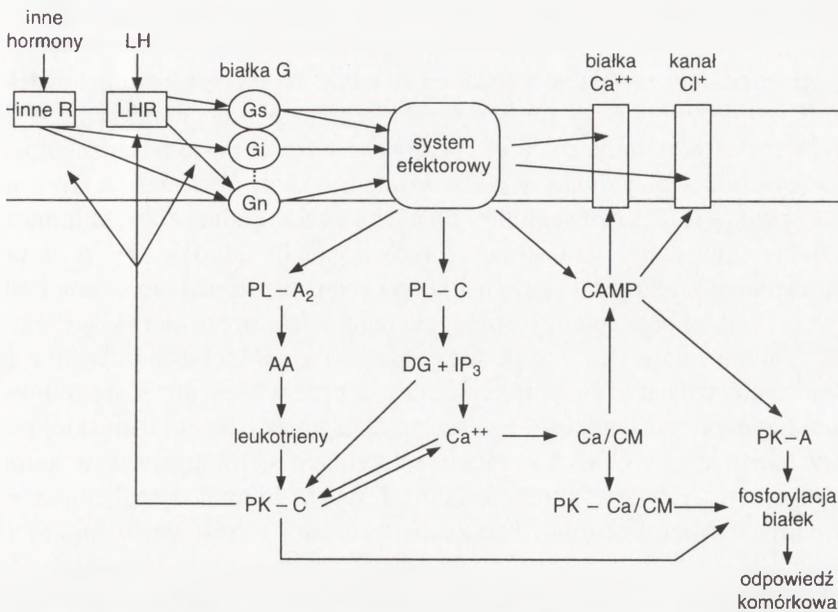
tropowymi we wszystkich komórkach steroidogennych dochodzi do powstania nowego białka, bez którego biosynteza hormonów byłaby niemożliwa [34,35].

Stevens i Lambeth [97], opisują w swych badaniach, że produkcja adrenokortykoidów przez komórki kory nadnerczy pod wpływem ACTH może być zablokowana przez zahamowanie translacji. Wynika stąd jednoznacznie, że proces ten jest niezbędny do prawidłowego przebiegu steroidogenezy. Zastosowanie cykloheksimidu (inhibitora syntezy białek) przyczyniło się do wyjaśnienia konieczności translacji w procesie biosyntezy hormonów steroidowych. Na tej podstawie sformułowano wniosek, że produkcja steroidów jest zależna od gwałtownie powstającego i wysoce labilnego białka, które pojawia się w odpowiedzi na stymulację ACTH, FSH czy LH. Wyniki badań Schulstera i współpracowników [90,91] prowadzą do stwierdzenia, że zarówno hodowle pierwotne, jak i guzów komórek nadnerczy i Leydiga wykazują powyższą zależność.

Kolejnym zadaniem była odpowiedź, czy transkrypcja *de novo* jest także niezbędna w czasie steroidogenezy. Doświadczenia Garrena [38] mające na celu potwierdzenie tego założenia prowadzono przy użyciu aktynomycyny D. Zahamowanie transkrypcji pod wpływem tego związku pozostaje bez wpływu na przebieg steroidogenezy w komórkach kory nadnerczy szczura. Vernikos Danielis i Hall [114] w swoich badaniach również obserwowali brak wpływu aktynomycyny D na stymulowaną przez ACTH produkcję adrenokortykoidów. Kontynuując badania uznali jednak, że krótkotrwała (w przeciwieństwie do długotrwałej) stymulacja wymaga syntezy mRNA. Wyniki kolejnych badań [90,32] nie potwierdziły powyżej przedstawionej hipotezy, nie znaleziono bowiem żadnego mechanizmu, który byłby odpowiedzialny za szybką aktywację i syntezę mRNA.

Dalsze badania prowadzone były w celu oceny konieczności fosforylacji w steroidogenezie. Jak wiadomo, w wyniku odpowiedzi komórek na działanie LH czy ACTH dochodzi do wzrostu aktywności cykazy adenylanowej, dalej do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP oraz aktywacji kinazy białkowej A, która odpowiedzialna jest za fosforylację białka. Do fosforylacji dochodzi również poprzez kinazę białkową C za pośrednictwem wtórnego przekaźnika przenoszenia sygnału, jakim jest diacylglicerol (DAG) (rys. 4) [48,86].

Badania na liniach komórkowych guza nadnerczy Y-1 [39, 99,] pozbawionych aktywnej kinazy białkowej A dowodzą, że brak aktywnego enzymu prowadzi do zahamowania lub zablokowania procesu steroidogenezy. Wprowadzenie do tej linii komórkowej funkcjonalnie czynnej kinazy białkowej A prowadzi do przywrócenia aktywności steroidogennej komórek guza [82, 115]. W świetle powyższych danych wydaje się oczywiste, że fosforylacja dotychczas nie zidentyfikowanego białka jest niezbędna do pełnej aktywności steroidogennej komórek.



Rys. 4. Pleiotropowe działanie LH na komórkę docelową [wg 48]: R – receptor, AA – kwas arachidonowy, PK-A – kinaza białkowa A, PK-C – kinaza białkowa C, PL-A – fosfolipaza A, PL-C – fosfolipaza C, DG – diacylglicerol, IP<sub>3</sub> – inozytolotrójfosforan, CM – kalmodulina

## ROLA ELEMENTÓW CYTOSZKIELETU W PRZEBIEGU STEROIDOGENEZY. CYTOARCHITEKTURA KOMÓREK LEYDIGA

W ostatnich latach poświęcono wiele uwagi udziałowi i roli elementów cytoszkieletu w procesie biosyntezy hormonów steroidowych [10,11,42,43,44]. Badania na różnych układach modelowych dostarczyły dowodów, że morfologiczne zmiany zachodzące w komórkach pod wpływem stymulacji hormonalnej są wynikiem reorganizacji mikrotubul, filamentów pośrednich i mikrofilamentów i powiązane są z produkcją steroidów [12,14,15,23,24,40,41,83]. Dalszych dowodów na udział cytoszkieletu w steroidogenezie dostarczyło zastosowanie środków rozbijających elementy cytoszkieletu (kolchicina, winblastyna i nokodazol oraz cytochalazyna B i D) odpowiedzialnych odpowiednio za depolimeryzację mikrotubul i zahamowanie funkcji mikrofilamentów [21,22,27,68,89,107].

W wyniku działania wyżej opisanych środków bariera między organellami komórkowymi zaangażowanymi w proces steroidogenezy ulega eliminacji (organelle bowiem nie są ułożone przypadkowo w cytoplazmie); krople lipidów i mitochondria zbliżają się do siebie zajmując głównie obszar okołojądrowy w komórce; transport

cholesterolu z jego magazynów do mitochondriów zostaje ułatwiony i przyspieszony [2,4,5,6,7,16]. Tym samym dochodzi do wzrostu produkcji steroidów [12,14,89].

Do tej pory nie uzyskano żadnego dowodu na zaangażowanie białek cytoszkieletu w międzybłonowy transport cholesterolu w mitochondriach. W świetle obecnych badań przyjmuje się więc możliwość włączenia się poszczególnych elementów cytoszkieletu jedynie w początkowy transport cholesterolu, tj. z miejsca jego magazynowania do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Dzięki temu zapewniony byłby stały dopływ substratu do tych organelli. Wydaje się, że w procesie tym uczestniczy białko SCP<sub>2</sub>, czyli białkowy nośnik steroli, co z kolei sugeruje możliwość włączenia się peroksysomów w regulację procesu steroidogenezy (patrz rys. 2). Ostatnio, na podstawie powyższych danych, Mendis-Handagama [65,66] postuluje zaangażowanie się peroksysomów w proces biosyntezy steroidów w komórkach Leydiga oraz ciała żółtego szczura. Również badania Bilińskiej i Litwina [19] przemawiają za rolą tych organelli w regulacji steroidogenezy w komórkach Leydiga myszy. W tych ostatnich badaniach dzięki immunocytochemicznej lokalizacji enzymów peroksysomowych zaobserwowano wzrost liczby mikrociał pod wpływem LH, korelujący z wysoką aktywnością hormonalną komórek. Z kolei, postępujący spadek ich ilości podczas trwania hodowli wiąże się z utratą zdolności steroidogennych przez komórki Leydiga [60].

Bardzo interesujące są wyniki dalszych badań Almahbobi i Halla [3,4,5,6,8] dotyczące roli filamentów pośrednich w regulacji steroidogenezy. Na podstawie wielu doświadczeń autorzy ci twierdzą, że filamenty pośrednie są najściślej związane z kroplami lipidów i mitochondriami. Wykazują oni istnienie wyspecjalizowanych połączeń między mitochondriami a filamentami pośrednimi [7].

Pod wpływem rozbicia filamentów akrylamidem, wimentyna (ale także i tubulina) otacza szczelnie krople lipidów, zmniejszając tym samym odległość między nimi a mitochondriami, co w rezultacie prowadzi do wzmożonej steroidogenezy [93]. Znaczenie tego zjawiska jest duże, zwłaszcza gdy bierze się pod uwagę konieczność utrzymania stałego poziomu substratu w zewnętrznej błonie mitochondrialnej przy szybkim tempie steroidogenezy.

## **BIAŁKA BĘDĄCE POTENCJALNYMI REGULATORAMI PROCESU STEROIDOGENEZY**

Jak już wcześniej wykazano powstanie białek *de novo* (tj. translacja) jest niezbędne do szybkiej produkcji steroidów. W związku z tym w kolejnym rozdziale zostaną omówione białka, które wydają się być zaangażowane w regulację steroidogenezy.



## I. Białkowy nośnik steroli (SCP<sub>2</sub>)

Białko to (ang. *sterol carrier protein-2*) jest dobrze poznane [108,109,110] i scharakteryzowane [31,111]. Jego rola w transporcie cholesterolu z kropli lipidów do zewnętrznej błony mitochondrialnej została opisana w poprzednim rozdziale. SCP<sub>2</sub> jest białkiem o masie cząsteczkowej 13 kDa, występującym w dużej ilości w wątrobie oraz tkankach steroidogennych. Według Mendis-Handagamy [67] uczestniczy ono również w przemianach lanosterolu w cholesterol oraz działa jako niespecyficzny nośnik lipidów [112]. Ponadto, SCP<sub>2</sub> reguluje transport fosfolipidów, fosfatydylocholiny oraz fosfatydyloetanoaminy w wątrobie szczura. W ludzkich fibroblastach białko to jest zdolne do przenoszenia cholesterolu z gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) do błony komórkowej [81]. Wyniki kolejnych badań świadczą o zdolności SCP<sub>2</sub> do wiązania i transportu steroli między organellami wewnątrzkomórkowymi, co jest istotne w regulacji steroidogenezy. Ponadto, w komórkach nerki małpy (COS-7), wykazano kolokalizację enzymów kompleksu SCC i SCP<sub>2</sub> przy równoczesnym wzroście steroidogenezy [116]. Wyniki te stanowią poparcie wyżej przedstawionej roli białka SCP<sub>2</sub>. Na podstawie badań Ohba i współpracowników [69] stwierdzono, że gen *SCP* koduje dwa produkty: białko 58 kDa (SCP<sub>x</sub>), które wykazuje homologię do tiolazy (enzymu związanego z β-oksydacją lipidów w peroksosomach) oraz białko 15,3 kDa, które w peroksosomach przekształca się w 13 kDa białko SCP<sub>2</sub>. Oba transkrypty zlokalizowane są w peroksosomach, które jak wiadomo mogą być miejscem syntezy cholesterolu [51,64,69]. Synteza SCP<sub>2</sub> pozostaje pod wpływem ACTH w nadnerczach, natomiast w komórkach Leydiga, w obecności LH obserwuje się szybki transport SCP<sub>2</sub> z frakcji mikrosomalnej do mitochondriów [112]. Redystrybucję tego białka w odpowiedzi na stymulację estradiolem obserwowano również w komórkach ciała żółtego szczura [63,67]. Według Mendis-Handagamy prawdopodobnie SCP<sub>2</sub> ułatwia wykorzystanie cholesterolu pochodzenia peroksosomowego. Podsumowując, SCP<sub>2</sub> jest białkiem z całą pewnością związanym z wewnątrzkomórkowym transportem cholesterolu [50,85]. Jednakże dodatkowe badania poziomu SCP<sub>2</sub> pod wpływem cykloheksaimidu wykłuczyły go z grupy potencjalnych regulatorów stałej produkcji steroidów, ponieważ zależność białka regulatorowego od inhibitora jego syntezy została wcześniej udowodniona.

## II. Polipeptydowy aktywator steroidogenezy (SAP)

Polipeptyd ten (ang. *steroidogenesis activator polypeptide*) o masie 2,2 kDa wykryto w szczurzych komórkach nadnerczy [77], a nieco później oczyszczono kolejny, 3,2 kDa, pochodzący z guza komórek Leydiga, MA-10 [78]. Jak dotąd, cząsteczki tego typu zostały zidentyfikowane jedynie w komórkach steroidogennych. Poziom SAP wyraźnie wzrasta po stymulacji hormonalnej, co więcej jest ono wrażliwe na cykloheksaimid [36,75,76]. Dodanie SAP do wyizolowanych mitochon-

driów wywołuje zależny od dawki wzrost produkcji steroidów, co wskazuje na jego rolę w regulacji steroidogenezy. Można przypuszczać, że bierze ono udział w przenoszeniu cholesterolu do mitochondrium, jednak zaangażowanie SAP w transport wewnątrzmitochondrialny jest mało prawdopodobne, nie znaleziono bowiem do dziś przekonujących dowodów na poparcie takiej hipotezy.

### III. Białkowy induktor steroidogenezy (SIP)

Białko to (ang. *steroidogenesis inducing protein*) zostało częściowo oczyszczone z płynu pęcherzykowego ludzkich jajników; wykazano, iż jest ono zdolne do stymulacji produkcji testosteronu w ludzkich, szczurzych, mysich i chemicznych komórkach Leydiga. Jego masa właściwa wynosi 60 kDa [52]. Stwierdzono również, że SIP przez stymulację proliferacji komórek wywiera także wpływ na niedojrzałe komórki Leydiga i nadnerczy. Dalsze badania nad zaangażowaniem SIP w regulację steroidogenezy prowadzono na komórkach Leydiga guza MA-10. Stwierdzono niezależność działania SIP od cAMP, wykazano natomiast wzrost aktywności kinazy tyrozynowej, co wskazuje, że w regulacji steroidogenezy w komórkach Leydiga działa więcej niż jedna droga przenoszenia sygnału (patrz rys. 4) [5]. Oznacza to również, że szlak prowadzący przez wtórny przekaźnik, jakim jest cAMP, może być zastąpiony przez inny [53]. Wyniki powyższych badań wskazują także na ewentualne włączenie się opisanego białka w regulację steroidogenezy, jednakże nadal brakuje przekonujących dowodów, iż SIP jest związany z szybką regulacją steroidogenezy.

### IV. Obwodowy receptor benzodiazepiny (PBR)

PBR (ang. *peripheral benzodiazepine receptor*) jest nazywany również mitochondrialnym (*mitochondrial benzodiazepine receptor* – MBR). Zarówno białko o masie 18 kDa, jak i jego wewnątrzkomórkowy ligand, czyli inhibitor wiążący diazepam (DPI) (ang. *diazepam binding protein*) są znanymi regulatorami kanałów chlorkowych, działającymi przez receptor GABA w centralnym układzie nerwowym [70, 96, 113]. Badania z zastosowaniem radioaktywnego diazepamu doprowadziły do stwierdzenia obecności receptorów wiążących benzodiazepinę nie tylko w centralnym systemie nerwowym, ale i w tkankach obwodowych [75]. Stąd nazwa "*peripheral*" obwodowy receptor benzodiazepiny [113,1]. Dzięki dalszym badaniom Papadopoulosa i współpracowników [37,73] PBR wykryto w zewnętrznej błonie mitochondrialnej komórek Leydiga szczura. Wprawdzie PBR jest białkiem obecnym we wszystkich typach komórek, ale wykrycie go w dużym stężeniu w błonie mitochondrialnej komórek steroidogennych oraz obserwacja wzrostu produkcji steroidów w komórkach Leydiga guza MA-10 lub nadnerczy Y-1 w odpowiedzi na ligand PBR sugerują udział tego białka w stymulacji steroidogenezy. Papadopoulos

postuluje jego rolę w regulacji kanałów jonowych, co przyczyniałoby się do ułatwienia transportu cholesterolu [1,20,56]. Wyniki dalszych badań [9,61,62,71,72] wskazują, że PBR wyizolowany z mitochondriów tkanek steroidogennych jest kompleksem 3 białek: 18 kDa PBR, 32 kDa VDAC [ang. *voltage dependent anion carrier*] oraz 30 kDa ANC [ang. *adenine nucleotide carrier*].

## V. Białkowy regulator steroidogenezy (StAR)

Jest to białko (ang. *steroidogenesis acute regulatory protein*), któremu w ostatnich latach poświęcono wiele uwagi. Po raz pierwszy wykryto je w komórkach kory nadnerczy stymulowanych przez ACTH [55,79,80], stosując dwukierunkową elektroforezę żelową z użyciem jodowanych białek. Synteza tego szczególnego białka wykazywała wiele podobieństw z kinetyką syntezy kortykosteronu. Białko to jest nieobecne w szczurzych adipocytach, co sugeruje specyficzną ekspresję jedynie w komórkach steroidogennych. Prowadząc badania nad mechanizmami regulującymi ekspresję genu kodującego powyższe białko, wyizolowano i zsekwencjonowano gen StAR, myszy i człowieka [30,105]. Sekwencja białka StAR jest wysoce konserwatywna, wykryto bowiem 85–88% identyczności w przypadku myszy i człowieka i około 90% u innych badanych gatunków, takich jak owca czy krowa [29].

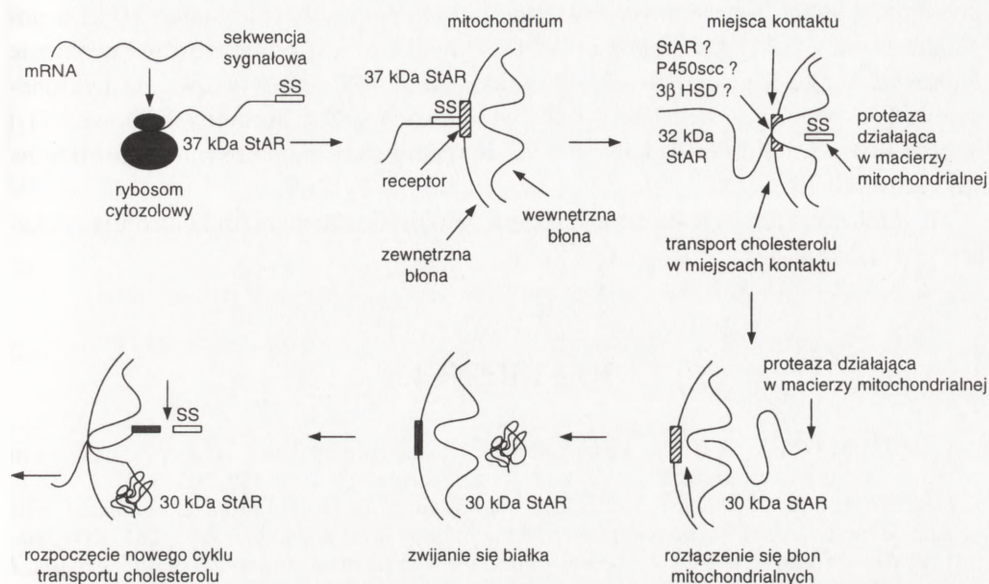
Pomimo iż mechanizmy przenoszenia i obróbki białka StAR wymagają jeszcze wielu wyjaśnień, wewnątrz mitochondrialna jego obecność została niezbicie wykazana przy zastosowaniu technik immunocytochemicznych ze złotem koloidalnym [54]. Istnienie białka stwierdzono wokół wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz w macierzy mitochondrialnej. Białko StAR jest syntetyzowane we frakcji cytozolowej i przechodzi do mitochondrium, gdzie zachodzi jego obróbka. Powstanie steroidogenicznie aktywnej formy StAR z cytozolowego prekursora i odszczepienie sekwencji sygnałowej w mitochondrium ma duże znaczenie funkcjonalne dla tego białka [45]. Zdolność jego do stymulowania produkcji steroidów została potwierdzona w systemie *in vitro*. Białko to dodane do mitochondriów guza komórek Leydiga, MA-10, wywołuje zależny od dawki i czasu, wzrost syntezy pregnenolonu [33]. Rezultatu takiego nie osiągnano dodając jedynie adrenodoksynę. W najnowszych pracach Sugawara i jego współpracownicy [104] wykazują, że StAR może stymulować metabolizm cholesterolu w komórkach nerki małpy, COS-1, kotransfekowanych w celu uzyskania ekspresji tylko jednego z enzymów mitochondrialnych CYP-27, tj. cholesterol-27-hydroksylazy. Fakt ten wskazuje, że białko StAR działa niezależnie od kompleksu enzymów cytochromu P450<sub>sc</sub>. Zarówno powyższe wyniki, jak i wcześniej opisana ekspresja mRNA dla StAR w ludzkich, płodowych i dorosłych komórkach nerki, przemawiają za szeroką rolą tego białka w metabolizmie cholesterolu. W kolejnych eksperymentach udowodniono, iż białko StAR staje się aktywne po fosforylacji [39,99,103].

Jednym z wielu dowodów przemawiających za rolę StAR były badania kliniczne związane z zespołem nadnerczowo-płciowym (ZNP) określanym w nazewnictwie anglosaskim jako wrodzony przerost nadnerczy (*congenital adrenal hyperplasia*, CAH), a manifestującym się zaburzeniem syntezy kortykosteroidów przez komórki kory nadnerczy. Przypuszczano, że z powodu braku enzymów kompleksu SCC nie dochodzi do przekształcenia cholesterolu w pregnenolon [46]. Na podstawie kolejnych badań twierdzono, że gen kodujący białka kompleksu SCC, a więc adrenodoksynę, jej reduktazę i P450<sub>SCC</sub> wykazują prawidłową ekspresję. Stało się więc oczywiste, że defekt związany jest z dostarczaniem cholesterolu do kompleksu enzymów. Co więcej, okazało się, że poprzednio omawiane białka, takie jak SCP<sub>2</sub>, SAP, SIP, PBR i jego ligand DPI są również obecne w komórce [58]. Tak więc uważano, że dochodzi do zaburzenia ekspresji białka StAR, a co za tym idzie nieprawidłowego funkcjonowania nadnerczy [106]. Dziś wiadomo, że w 98% występowanie zespołu nadnerczowo-płciowego jest wywołane niedoborem 21-hydroksylazy steroidowej. Jest to jeden z najlepiej poznanych defektów enzymatycznych w procesie syntezy hormonów steroidowych.

Biorąc jednak pod uwagę wszystkie dane dotyczące białka StAR, można stwierdzić, że jest ono kluczowym białkiem w regulacji steroidogenezy, spełnia bowiem wszystkie warunki stawiane nowotworzonym białkom w wyniku stymulacji hormonalnej. Równocześnie, jest odpowiedzialne za regulację przejścia cholesterolu z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej (patrz rys. 2).

## MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA StAR

Na podstawie najnowszych badań zaproponowano następujący model działania StAR w komórce steroidogennej (rys. 5) [98,99,100,101,102,103]. W wyniku odpowiedzi komórki na stymulację hormonalną rozpoczyna się synteza (translacja) 37 kDa prekursora białka StAR we frakcji cytoplazmatycznej. Prekursor ten dzięki obecności sekwencji sygnałowej przenoszony jest do macierzy mitochondrialnej, w której działa aktywna proteaza, odcinająca tę sekwencję [59]. Pomiędzy błonami tworzą się miejsca kontaktu, z którymi białko StAR najprawdopodobniej jest związane. Dzięki formowaniu się miejsc kontaktu cholesterol transportowany jest od zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej [49,84]. Przeniesienie cholesterolu jest możliwe jedynie dzięki fizycznemu kontaktowi błon mitochondrialnych [99] lub jak sugeruje Papadopoulos [20,71], dzięki tworzeniu się hydrofobowego kanału "przeprowadzającego" cholesterol przez przestrzeń między błonami. Dziś wiadomo, że cholesterol, który w obecności StAR osiągnie wewnętrzną błonę mitochondrialną, może być szybko konwertowany do pregnenolonu w wyniku działania kompleksu enzymów SCC. Dzięki najnowszym odkryciom, wiadomo także, że



Rys. 5. Molekularny mechanizm działania białka StAR w komórce Leydiga (opracowano wg [101] i uproszczono): We frakcji cytoplazmatycznej komórki Leydiga dochodzi do syntezy 37 kDa prekursora białka StAR i jego przeniesienia do macierzy mitochondrialnej, w której działa aktywna proteaza. Powstaje kolejny prekursor białka StAR o masie 32 kDa. Pomiedzy błonami mitochondrialnymi tworzą się miejsca kontaktu, dzięki którym cholesterol jest transportowany do wnętrza mitochondrium. Po rozdzieleniu się błon transport cholesterolu jest zatrzymany. W wyniku dalszej obróbki powstaje białko 30 kDa, które ulega zwijaniu. Następnie, rozpoczyna się nowy cykl transportu cholesterolu

enzymy kompleksu SCC oraz StAR są ściśle powiązane z miejscami międzybłonowego kontaktu. Co więcej, wyniki dalszych badań pokazują [28], że  $P450_{SCC}$  może być wzbogacony w miejscach kontaktu o  $3\beta$ -HSD i dzięki temu cholesterol osiagając wewnętrzną błonę może opuścić mitochondrium jako progesteron bez przejścia w pregnenolon. Tym samym wyjaśniono mechanizm znanego wcześniej zjawiska bezpośredniego formowania się progesteronu w mitochondrium. Po dalszej obróbce, powstaje białko o masie 30 kDa, a błony mitochondrialne rozdzielają się ponownie, uniemożliwiając dalszy transport cholesterolu [33]. Stąd też wydaje się oczywiste, że szybka synteza i obróbka białka StAR jest niezbędna do zapewnienia ciągłego wewnątrzbłonowego transportu cholesterolu. W innych pracach [34,47,98,100] autorzy udowadniają, że okres półtrwania 37 i 32 kDa prekursorów jest bardzo krótki, wyjaśniają więc dlaczego produkcja hormonów steroidowych zanika przy braku szybkiej syntezy prekursorów StAR.

Podsumowując, można stwierdzić, że wcześniej prezentowane białka, takie jak:  $SCP_2$ , SAP, SIP, PBR, z pewnością przyczyniają się do wzrostu produkcji hormonów steroidowych, ale żadne z nich nie spełnia wszystkich warunków, jakim musi od-

powiadać regulator steroidogenezy. Warunki te spełnia jedynie białko 30 kDa pochodzące od 37 i 32 kDa prekursorów. I tak: białko to jest syntetyzowane w okresie odpowiadającym czasowi trwania steroidogenezy (1), jest wrażliwe na cykloheksomid, a więc jego translacja jest stymulowana przez hormony tropowe (2) i obecne w mitochondrium, gdzie odbywa się regulowany etap biosyntezy hormonów steroidowych (3).

W najbliższej przyszłości do wyjaśnienia pozostaje mechanizm kontrolujący ekspresję i funkcję genu kodującego StAR.

## REFERENCES

- [1] AMSTERDAM A, SUH BS. An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 503–510.
- [2] ALMAHBOBI G. Adhesion of intermediate filaments and lipid droplets in adrenal cells studied by field emission scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 1995; **281**: 387–390.
- [3] ALMAHBOBI G, HALL PF. The role of intermediate filaments in adrenal steroidogenesis. *J Cell Sci* 1990; **97**: 679–687.
- [4] ALMAHBOBI G, HALL PF. Visualization of cytoskeleton-organelles association: an approach to study the cell function. *J Comp-Assisted Microsc* 1993; **5**: 7–10.
- [5] ALMAHBOBI G, WILIAMS LJ, HALL PF. Attachment of steroidogenic lipid droplets to intermediate filaments in adrenal cells. *J Cell Sci* 1992; **101**: 383–393.
- [6] ALMAHBOBI G, WILIAMS LJ, HALL PF. Attachment of mitochondria to intermediate filaments in adrenal cells: relevance to the regulation of steroid synthesis. *Exp Cell Res* 1992; **200**: 361–369.
- [7] ALMAHBOBI G, WILIAMS LJ, HAN X-G, HALL PF. Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 209–216.
- [8] ALMAHBOBI G, KORN M, HALL PF. Calcium/calmodulin induces phosphorylation of vimentin and myosin light chain and cell rounding in cultured adrenal cells. *Eur J Cell Biol* 1993 **63**: 307–315.
- [9] ANTKIEWICZ-MICHALUK L, MUKHIN AG, GUIDOTTI A, KREUGER KE. Purification and characterization of a protein associated with peripheral-type benzodiazepine binding sites. *J Biol Chem* 1988 **263**: 17317–17321.
- [10] BENZE'EV A, AMSTERDAM A. Regulation of cytoskeletal proteins involved in cell contact formation during differentiation of granulosa cells on extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 **83**: 2894–2898.
- [11] BENZE'EV A, KOHEN F, AMSTERDAM A. Gonadotropin-induced differentiation of granulosa cells is associated with the coordinated regulation of cytoskeletal proteins involved in cell-contact formation. *Differentiation* 1987 **34**: 222–235.
- [12] BILIŃSKA B. Visualization of the cytoskeleton in Leydig cells *in vitro*. The effect of luteinizing hormone and cytoskeletal disrupting drugs. *Histochemistry* 1989 **93**: 105–110.
- [13] BILIŃSKA B. Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków. *Post Biol Kom* 1992 **19**: 205–221.
- [14] BILIŃSKA B. LH as a modulator of cytoskeleton arrangement and steroidogenic function in Leydig cells *in vitro*. *Folia Histochem Cytobiol* 1992 **30**: 35–38.
- [15] BILIŃSKA B. Do Sertoli cells influence the microfilament organization of Leydig cells in co-culture? *Eur J Histochem* 1993 **37**: 27–31.

- [16] BILIŃSKA B. Staining with ANS fluorescent dye reveals distribution of mitochondria and lipid droplets in cultured Leydig cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1994 **32**: 21–24.
- [17] BILIŃSKA B. Rola komórek podporowych Sertoliego w organizacji i funkcji jądra. *Prace Fizjol Rocznic Nauk-Dydakt WSP* 1994 **155**: 1–16.
- [18] BILIŃSKA B. Biosynteza i metabolizm testosteronu oraz jego działanie w gonadzie męskiej. *Endokrynol Pol* 1995 **46**: 365–378.
- [19] BILIŃSKA B, LITWIN JA. Immunocytochemical demonstration of peroxisomes in cultured Leydig cells: a decrease in testosterone secretion precedes reduction of peroxisomes. *Eur J Histochem* 1995 **39**: 273–280.
- [20] BOUJARD N, GAILLARD J-L, PAPADOPOULOS V. Acute action of choriogonadotropin on Leydig tumor cells: induction of a higher affinity benzodiazepine-binding site related to steroid biosynthesis. *Endocrinology* 1994 **135**: 1576–1583.
- [21] BRUNSWIG-SPICKENHEIER B, BILIŃSKA B, STOKŁOSOWA S. The effect of microtubule-disrupting drugs on morphology, progesterone and prorenin secretion of bovine cultured ovarian theca cells. *Acta Histochem* 1996 **98**: 389–398.
- [22] CARNEGIE JA, TSANG BK. Microtubules and the calcium-dependent regulation of rat granulosa cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1987; **36**: 1007–1015.
- [23] CARNEGIE JA, TSANG BK. The cytoskeleton and rat granulosa cell steroidogenesis: Possible involvement of microtubules and microfilaments. *Biol Reprod* 1988 **38**: 100–108.
- [24] CARNEGIE JA, DARDICK I, TSANG BK. Microtubules and the gonadotropic regulation of granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1987; **120**: 819–828.
- [25] CARREAU S. Cell-cell interactions in the mammalian testis. W: GnRH, GnRH analogs, Gonadotropins and Gonadal Peptides (P Bouchard, A Caraty, HJT Coeling-Bennink, SN Pawlou wyd). Parthenon Press, England, 1993; 507–522.
- [26] CARREAU S. Paracrine control of human Leydig cells and Sertoli cell functions. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**: 111–119.
- [27] CHEN TT, MASSEY PJ, CLAUDIE MR. The inhibitory action of taxol on granulosa cell steroidogenesis is reversible. *Endocrinology* 1994; **134**: 2178–2183.
- [28] CHERRADI N, DEFAYE G, CHAMBEZ EM. 1994 Characterization of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondria. *Endocrinology* 134, 1358–1364.
- [29] CLARK BJ, WELLS J, KING SR, STOCCO DM. The purification, cloning, and expression of a novel LH-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 1994; **269**: 28134–28322.
- [30] CLARK BJ, SOO SC, CARON KM, IKEDA Y, PARKER KL, STOCCO DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 1346–1355.
- [31] COLLES SM, WOODFORD JK, MONCECCHI D, MYERS-PAYNE SC, MCLEAN LR, BILLHEIMER JT, SCHROEDER F. Cholesterol interaction with recombinant human sterol carrier protein-2. *Lipids* 1995; **30**: 795–803.
- [32] COOKE BA, JANSZEN FHA, VAN DRIEL MJA, VAN DER MOLEN HJ. Evidence for the involvement of lutropin-independent RNA synthesis in Leydig cell steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 1979; **14**: 181–189.
- [33] EPSTEIN LF, ORME-JOHNSON NR. Regulation of steroid hormone biosynthesis: identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19739–17745.
- [34] FERGUSON JJ. Puromycin and adrenal responsiveness to adrenocorticotrophic hormone. *Biochim Biophys Acta* 1962; **57**: 616–617.
- [35] FERGUSON JJ. Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J Biol Chem* 1963; **238**: 2754–2759.

- [36] FRUSTACI J, MERTZ LM; PEDERSEN RC. Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the guinea pig adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 1989; **64**: 137–143.
- [37] GARNIER M, DIMCHEW AB, BOUJARD N, PRICE JM, MUSTO NA, PAPADOPOULOS V. *In vitro* reconstruction of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol Pharmacol* 1993; **45**: 201–211.
- [38] GARRIN LD, NEY RL, DAVIS WW. Studies on the role of protein synthesis in the regulation of corticosterone production by ACTH *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965; **53**: 1443–1450.
- [39] GRIFFIN-GREEN E, ORME-JOHNSON NR. Inhibition of steroidogenesis in rat adrenal cortex cells by a threonine analog. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; **40**: 421–429
- [40] HALL PF. Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. W: *The Physiology of Reproduction*, Second Edition, (E Knobil, JD Neill, wyd), Raven Press, Ltd., New York, 1994; 1335–1362.
- [41] HALL PF. The roles of microfilaments and intermediate filaments in the regulation of steroid synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; **55**: 601–605.
- [42] HALL PF, ALMAHBOBI G. The role of cytoskeleton in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; **43**: 769–777.
- [43] HALL PF, CHARPONIER C, NAKAMURA M, GABBIANI G. The role of microfilaments in the response of adrenal tumor cells to ACTH. *J Biol Chem* 1979; **254**: 9080–9084.
- [44] HALL PF, NAKAMURA M, MROTEK JJ. The actions of various cytochalasins on mouse adrenal cells in the relation to trophic stimulation of steroidogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1981; **676**: 338–344.
- [45] HARTUNG S, RUST W, BALVERS M, IVELL R. Molecular cloning and *in vivo* expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **215**: 646–653.
- [46] HAUFFA PT, MILLER WL, GRUMBACH MM, CONTE FA, KAPLAN SL. Congenital adrenal hyperplasia due to deficient cholesterol side-chain cleavage activity (20,22-desmolase) in a patient treated for 18 years. *Clin Endocrinol* 1985; **23**: 481–493.
- [47] HWANG ST, WACHTER C, SCHATZ G. Protein import into the yeast mitochondrial matrix: a new translocation intermediate between the two mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 21083–21089.
- [48] HUHTANIEMI I, TOPPARI J. Regulation hormonale de la spermatogenese. *Andrologie* 1996; **6**: 63–74.
- [49] JEFCOATE CR, MCNAMARA BC, ARTEMENKO I, YAMAZAKI T. Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450<sub>scc</sub> in steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; **43**: 751–767.
- [50] JOHNSON WI, REINHART MP. Lack of requirement for sterol carrier protein-2 in the intracellular trafficking of lysosomal cholesterol. *J Lipid Res* 1994; **35**: 563–573.
- [51] KELLER GA, SCALLEN TJ, CLARKE D, MAHER PA, KRISANS SK, SINGER SJ. Subcellular localization of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes: its primary localization to peroxisomes. *J Cell Biol* 1989; **108**: 1353–1361.
- [52] KHAN SA, KECK C, GUDERMAN T, NIESCHLAG E. Isolation of a protein from human ovarian follicular fluid which exerts major stimulatory effect *in vitro* on steroid production of testicular, ovarian and adrenal cells. *Endocrinology* 1990; **126**: 3043–3052.
- [53] KHAN SA, DORRINGTON JH, MORAN J. Steroidogenesis inducing protein stimulates protein-tyrosine kinase activity in Leydig cells. *Endocrinology* 1993; **132**: 109–114.
- [54] KING SR, RONEN-FUHRMAN T, TIMBERG R, CLARK BJ, ORLY J, STOCCO DM. Steroid production after *in vitro* transcription, translation, and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1995; **136**: 5165–5176.
- [55] KRUEGER RJ, ORME-JOHNSON NR. Acute adrenocorticotrophic hormone stimulation of adrenal corticosteroidogenesis. *J Biol Chem* 1983; **258**: 10159–10167.



- [56] KRUEGER RJ, PAPADOPOULOS V. Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15015–15022.
- [57] KUPCZYK P, SAWINSKI P, TRZECIAK WH. Diagnostyka molekularna zespołu nadnerczowo-płciowego. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 355–372.
- [58] LIN D, CHANG YJ, STRAUSS III JF, MILLER WL. The human peripheral benzodiazepine receptor gene: cloning and characterization of alternative splicing in normal tissues and in a patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Genomics* 1993; **18**: 643–650.
- [59] LIND, SUGAWARA T, STRAUSS III JF, CLARK BJ, STOCODM, SAENGER P, ROGOL A, MILLER WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995; **267**: 1828–1831.
- [60] LITWIN JA, BILINSKA B. Morphological heterogeneity of peroxisomes in cultured mouse Leydig cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1995; **33**: 255–258.
- [61] McENERY MW, SNOWMAN A, TRIFILETTI RR, SNYDER SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 **89**: 3170–3174.
- [62] McENERY MW, DAWSON TM, VERMA A, GURLEY D, COLOMBINI M, SNYDER SH. Mitochondrial voltage-dependent anion channel: immunochemical and immunohistochemical characterization in rat brain. *J Biol Chem* 1993; **268**: 23289–23296.
- [63] McLEAN MP, PURYEAR TK, KHAN I, AZHAR S, BILLHEIMER JT, ORLY J, GIBORI G. Estradiol regulation of sterol carrier protein-2 independent of cytochrome P450 side-chain cleavage expression in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1989; **125**: 1337–1344.
- [64] MENDIS-HANDAGAMA SMLC, ZIRKIN BR, SCALLEN TJ, EWING LL. Studies on peroxisomes of the adult rat Leydig cells. *J Androl* 1990; **11**: 270–278.
- [65] MENDIS-HANDAGAMA SMLC, WATKINS PA, GELBER SJ, SCALLEN TJ, ZIRKIN BR, EWING LL. Luteinizing hormone causes rapid and transient changes in rat Leydig cell peroxisome volume and intraperitoneal sterol carrier protein-2 content. *Endocrinology* 1990; **127**: 2947–2954.
- [66] MENDIS-HANDAGAMA SMLC, WATKINS PA, GELBER SJ, SCALLEN TJ. Leydig cell peroxisomes and sterol carrier protein-2 in luteinizing hormone deprived rats. *Endocrinology* 1992; **131**: 2839–2845.
- [67] MENDIS-HANDAGAMA SMLC, ATEN RF, WATKINS PA, SCALLEN TJ, BERHMAN HR. Peroxisomes and sterol carrier protein-2 in luteal cell steroidogenesis: a possible role in cholesterol transport from lipid droplets to mitochondria. *Tissue Cell* 1995; **27**: 483–490.
- [68] MROTEK JJ, HALL PF. The influence of cytochalasin B on the response of adrenal tumor cells to ACTH and cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 1975 **64**: 891–896.
- [69] OHBA T, RENNERT H, PFEIFER SM, HE Z, YAMAMOTO R, HOLT JA, BILLHEIMER JT, STRAUSS III JF. The structure of the human sterol carrier protein x/sterol carrier protein-2 gene (SCP2). *Genomics* 1994; **24**: 370–374.
- [70] PAPADOPOULOS V. Peripheral-type benzodiazepine /diazepam binding inhibitor receptor/ biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 1993; **14**: 222–240.
- [71] PAPADOPOULOS V, BROWN AS. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995; **53**: 103–110.
- [72] PAPADOPOULOS V, BERKOVICH A, KRUEGER KE, COSTA E, GUIDOTTI A. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 1991; **129**: 1481–1488.
- [73] PAPADOPOULOS V, BOUJARD N, IKONOMOVIC MD, FERRARA P, VIDIC B. Topography of the Leydig cell mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **104**: R5–R10.

- [74] PAROLA AL, YAMAMURA HI, LAIRD HE. Minireview: peripheral-type benzodiazepine receptors. *Life Sci* 1993; **52**: 1329–1342.
- [75] PEDERSEN RC. Polypeptide activators of cholesterol side-chain cleavage. *Endocr Res* 1984; **10**: 533–561.
- [76] PEDERSEN RC. Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the rat ovary and testis. *J Steroid Biochem* 1987; **27**: 731–735.
- [77] PEDERSEN RC, BROWNIE AC. Cholesterol side-chain cleavage in the rat adrenal cortex: isolation of a cycloheximide-sensitive activator peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 1882–1886.
- [78] PEDERSEN RC, BROWNIE AC. Steroidogenesis activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science* 1987; **236**: 188–190.
- [79] PON LA, EPSTEIN LF, ORME-JOHNSON NR. Acute cAMP stimulation of a protein similar to that detected in adrenal cortex and corpus luteum. *Endocr Res* 1986; **12**: 429–446.
- [80] PON LA, HARTIGAN JA, ORME-JOHNSON NR. Acute ACTH regulation of adrenal corticosteroid biosynthesis: rapid accumulation of a phosphoprotein. *J Biol Chem* 1986; **261**: 13309–13316.
- [81] PUGLIELLI L, RIGOTTI A, GRECO AV, SANTOS MJ, NERVI F. Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18723–18726.
- [82] RAE PA, GUTMAN NS, TSAO J, SCHIMMER BP. Mutations in cyclic AMP-dependent protein kinase and corticotropin (ACTH)-sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 1896–1900.
- [83] RAY P, SCROTT CA. Stimulation of steroid synthesis by normal rat adrenocortical cells in response to microtubular agents. *Endocrinology* 1978; **103**: 1281–1288.
- [84] REINHART MP. Intracellular sterol trafficking. *Experientia* 1990; **46**: 599–611.
- [85] RENNERT H, PURYEAR TK, KHAN I, AZHAR S, BILLHEIMER JT, STRAUSS III JF. Regulated expression of sterol carrier protein-2 in the ovary: a key role for cyclic AMP. *Biochemistry* 1991; **47**: 11280–11285.
- [86] ROMMERTS FFG. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. W: Testosterone action, deficiency, substitution (E Nieschlag, HM Behre, red). Springer, Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1990; 1–22.
- [87] RUSSELL LD. Mammalian Leydig cell structure. W: The Leydig cell (AH Payne, MP Hardy, LD Russell, red) Cache River Press, Vienna II, 1996; 58–71.
- [88] SAEZ JM. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr Rev* 1994; **15**: 574–626.
- [89] SALTARELLI D, LLOSA-HERMIER P, TERTRIN-CLARY C, HERMIER C. Effects of antimicrotubular agents in cAMP production and in steroidogenic response of isolated rat Leydig cells. *Biol Cell* 1984; **52**: 259–266.
- [90] SCHULSTER D. Corticosteroid and ribonucleic acid synthesis in isolated adrenal cells: inhibition by actinomycin D. *Mol Cell Endocrinol* 1974; **1**: 55–64.
- [91] SCHULSTER D, RICHARDSON MC, PALFREYMAN JW. The role of protein synthesis in adrenocorticotrophin action: effects of cycloheximide and puromycin on the steroidogenic response of isolated adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* 1974; **2**: 17–29.
- [92] SHARPERM. Intratesticular control of spermatogenesis. *Clin Endocrinol* 1990; **33**: 787–807.
- [93] SHIVER TM, SACKETT DL, KNIPLING L, WOLF J. Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production. *Endocrinology* 1992; **131**: 201–207.
- [94] SKINNER MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 1991; **12**: 45–77.
- [95] SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. Paracrine factors relevant to regulation of spermatogenesis – a review. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 1–14.

- [96] SPRENGEL R, WERNER P, SEEBURG PH, MUKHIN AG, SANTI MR, GRAYSON DR, GUIDOTTI A, KRUEGER KE. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 20415–20421.
- [97] STEVENS VL, XUT T, LAMBETH JD. Cholesterol trafficking in steroidogenic cells reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a pre-steroidogenic pool. *J Biochem* 1993; **216**: 557–563.
- [98] STOCCO DM. Acute regulation of steroidogenesis in Leydig cells. W: The Leydig cell (AH Payne, MP Hardy, LD Russell, red) Cache River Press, Vienna II, 1996; 415–429.
- [99] STOCCO DM, SODEMAN TC. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J Biol Chem* 1991; **266**: 19731–19738.
- [100] STOCCO DM, CLARK BJ. The requirement of phosphorylation on threonine residue in the acute regulation of steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; **46**: 337–347.
- [101] STOCCO DM, CLARK BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 1996; **17**: 221–244.
- [102] STOCCO DM, CLARK BJ. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol* 1996; **51**: 197–205.
- [103] STOCCO DM, KING S, CLARK BJ. Differential effects of dimethylsulfoxide on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells. *Endocrinology* 1995; **136**: 2993–2999.
- [104] SUGAWARA T, HOLT JA, DRISCOLL D, STRAUSS III JF, LIN D, MILLER WL, PATTERSON D, CLANCY KP, HART IM, CLARK BJ, STOCCO DM. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4778–4782.
- [105] SUGAWARA T, LIN D, HOLT JA, MARTIN KO, JAVITT NB, MILLER WL, STRAUSS III JF. Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 1995; **34**: 12506–12512.
- [106] TEE M, LIN D, SUGAWARA T, HOLT JA, GUIGUEN Y, BUCKINGHAM B, STRAUSS III JF, MILLER WL. T-A transversion 11 bp from a splice acceptor site in the human gene for steroidogenic acute regulatory protein causes congenital lipid adrenal hyperplasia. *Human Mol Gen* 1995; **4**: 2299–2305.
- [107] TEMPLE R, WOLFF J. Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents. *J Biol Chem* 1973; **248**: 2691–2698.
- [108] TRZECIAK WH, SIMPSON ER, SCALLEN TJ, VAHOUNY GV, WATERMAN MR. Studies on the synthesis of SCP-2 in rat adrenal cortical cells in monolayer culture. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3713–3720.
- [109] VAHOUNY GV, CHANDERBAHN R, NOLAN BJ, SCALLEN TJ. Cholesterol ester hydrolase and sterol carrier proteins. *Endocr Res* 1985; **10**: 473–505
- [110] VAHOUNY GV, CHANDERBAHN R, KHAROUBI A, NOLAN BJ, PASTUSZYN A, SCALLEN TJ. Sterol carrier and lipid transfer proteins. *Adv Lipid Res* 1987; **22**: 83–113.
- [111] VAHOUNY GV, DENNIS P, CHANDERBAHN R, FISKUM G, NOLAN BJ, SCALLEN TJ. Sterol carrier protein-2 (SCP2)-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 **122**: 509–515.
- [112] VAN AMERONGEN A, DEMEL RA, WESTERMAN J, WIRTZ KWA Transfer to cholesterol and oxysterol derivatives by the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2): a study on its mode of action. *Biochem Biophys Acta* 1989; **1004**: 36–43.
- [113] VERMA A, SNYDER SH. Peripheral type benzodiazepine receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1989; **29**: 307–322.

- [114] VERNIKOS-DANIELIS J, HALL PF. Inhibition of adrenocortical responsiveness to ACTH by actinomycin D *in vivo*. *Nature* 1965; **207**: 766.
- [115] WONG M, KROLCZYK AJ, SCHIMMER BP. The causal relationship between mutations in cAMP-dependent protein kinase and the loss of adrenocorticotropin-regulated adrenocortical functions. *Mol Endocrinol* 1992; **6**: 1614–1624.
- [116] YAMAMOTO R, KALLEN CB, BABALOLA GO, RENNERT H, BILLHEIMER JT, STRAUSS III JF. Cloning and expression of a cDNA encoding human sterol carrier protein-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 463–467.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 20.02.1997 r.*

*Przyjęto: 15.03.1997 r.*

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

## WPŁYW NOSICIELSTWA TRANSLOKACJI CHROMOSOMOWYCH WZAJEMNYCH NA POTOMSTWO CZŁOWIEKA

EFFECT OF RECIPROCAL CHROMOSOMAL TRANSLOCATION  
CARRIERSHIP ON HUMAN PROGENY

Alina T. MIDRO

Zakład Genetyki Klinicznej Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych Akademii  
Medycznej w Białymstoku

**Streszczenie:** Przyczyną wad wrodzonych u potomstwa nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych (TCW) jest głównie niezrównoważony kariotyp. Wady letalne prowadzą do poronień samoistnych. Obserwuje się różną częstość niezrównoważonych kariotypów w oocytach niepoddających się zapłodnieniu *in vitro*, w plemnikach, w płodach poronionych samoistnie, w diagnostyce prenatalnej I i II trymestru ciąży, wśród dzieci zmarłych w okresie okołoporodowym oraz dzieci żywo urodzonych z wadami i/lub dysmorfia. Trudności w przewidywaniu prawdopodobieństwa wystąpienia zaburzeń wynikają z unikatowości położenia punktów złamania translokacji, ograniczonej liczby danych empirycznych, co do przeżywalności płodów z poszczególnymi formami niezrównoważenia, różnych mechanizmów powstawania niezrównoważonych gamet u tego samego nosiciela TCW, małe liczebnie rodowody. Istotne jest wiarygodne rozpoznanie punktów złamań TCW zarówno w ich wykrywaniu, jak i prognozowaniu konsekwencji nosicielstwa TCW.

**Słowa kluczowe:** Translokacje chromosomowe wzajemne, wady wrodzone, poronienia samoistne, punkty złamania chromosomów.

**Summary:** Unbalanced karyotype is a main cause of congenital malformations among progeny of reciprocal chromosome translocation (RCT) carriers. Lethal malformations are responsible for spontaneous abortions. Different frequencies of unbalances are observed in oocytes failing to cleave after *in vitro* fertilization, spermatozoa, spontaneously aborted fetuses, prenatal diagnosis of I and II trimester, stillbirths and early deaths or malformed and dysmorphic live birth children. Difficulties in prediction of abnormalities probability of abnormality occurrence resulted from unique breakpoint positions, limited empiric data concerning survival fetuses with particular form of unbalances, different mechanisms of malsegregations in the same RCT carrier and low number of pedigree members. Correct interpretation of RCT breakpoint positions is essential as well for detection as for prediction of RCT carriership consequences.

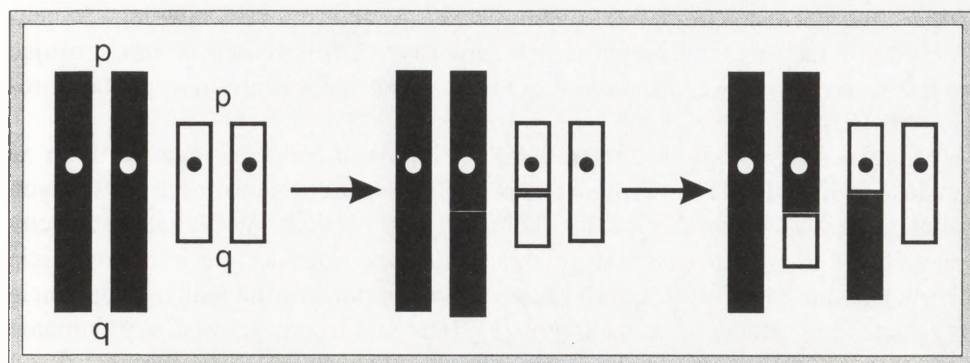
*Key words:*reciprocal chromosomal translocation, congenital malformation, spontaneous abortions, breakpoint of chromosome

Wśród nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych TCW można zaobserwować wysoką częstość występowania wad u potomstwa w jednych rodzinach, w innych natomiast liczne poronienia samoistne bądź obie patologie. Istnieją też rodziny mające tylko zdrowe potomstwo albo rodziny niepełodne. Powstaje pytanie, co decyduje o formach zaburzeń reprodukcji, które mogą wystąpić u nosicieli indywidualnych TCW, i jak je przewidzieć.

## 1. DEFINICJA TRANSLOKACJI CHROMOSOMOWEJ WZAJEMNEJ I SPOSÓB JEJ DIAGNOZOWANIA

Translokacje chromosomowe wzajemne (TCW) należą do strukturalnych aberracji chromosomów występujących u człowieka z częstością 1 : 1000. TCW występują zazwyczaj w kariotypie osób zdrowych i mogą być przekazywane z pokolenia na pokolenie. Tylko w wyjątkowych przypadkach translokacje wzajemne, wyglądające na zrównoważone, obserwuje się w kariotypie osób z chorobami mendelowskimi [89]. Należy dodać, że TCW mogą występować w pojedynczych komórkach bądź klonach komórkowych jako wyraz procesu nowotworowego, niestabilności chromosomowej lub działania genotoksycznego (klastogennego) środowiska zewnętrznego.

TCW powstają wskutek wzajemnej wymiany segmentów chromosomowych pomiędzy dwoma różnymi chromosomami. W wyniku wymiany powstają dwa (czasem więcej) chromosomy pochodne (*derivatives*). W skład chromosomu pochodnego wchodzi część chromosomu macierzystego z centromerem, połączona w punkcie złamania z częścią drugiego chromosomu (rys. 1). Przynależność chromosomu wyznacza centromer chromosomu macierzystego [59]. Zasady przemieszczeń odcinków chromosomowych sformułował Muller [57] opisując własności naturalnych zakończeń ramion chromosomowych nazwanych telomerami. Teoria Mullera zakłada, że telomery nie mogą łączyć się z innymi telomerami, ani też z powierzchniami chromosomów od strony ich naturalnego końca. To założenie potwierdzone badaniami współczesnych [32, 36] znajduje odbicie w praktyce cytogenetyki klinicznej przy interpretacji nieprawidłowości strukturalnych, w tym TCW. U osób z prawidłowym fenotypem translokację uważa się za wzajemną nawet wówczas, gdy punkt złamania jest położony na końcowym prążku chromosomu, a pod mikroskopem nie można zobaczyć przemieszczenia tak małego segmentu, jakim jest telomer. Telomery zawierają stałą sześcionukleotydową sekwencję (TTAGGG)<sub>n</sub>. Utrata telomeru powoduje degenerację chromosomu doprowadzając do śmierci komórki.



Rys. 1. Schemat powstawania translokacji chromosomowej wzajemnej (p – krótkie ramię, q – długie ramię); centromer wyznacza przynależność chromosomu po translokacji do danej pary homologicznej

Badania genetyki molekularnej wykazały, że z uwagi na powtarzalność sekwencji DNA telomerów może dochodzić do błędnej koniugacji podobnych segmentów i ich wymiany prowadzącej do translokacji TCW [60]. Położenie punktu złamania w okolicy telomerów jednego z chromosomów zaangażowanych w translokację cechuje około połowę translokacji zebranych przez Stengel-Rutkowski i wsp. [85] w Polskiej Kolekcji TCW [48,51] i w Litewskiej Kolekcji [68].

Segmenty chromosomowe ulegające wymianie w translokacjach różnią się wielkością i zawartością genetyczną. Praktycznie w każdym miejscu danego chromosomu w kariotypie człowieka może powstać złamanie i następnie wymiana różnych segmentów. Analiza położenia punktów złamania (pz) chromosomów zaangażowanych w dziedzicznych TCW dotychczas zdiagnozowanych u człowieka wskazuje na nieprzypadkowy rozkład tych punktów [18,87]. Podaje się różne preferencje: częstsze położenie pz na granicy między prążkami typu G i R [4], w miejscach kruchych [31], w prążkach z onkogenami [98], w prążkach G negatywnych, bogatych w sekwencje GC [43,93]. Podejrzewa się, że zmiany w stopniu metylacji mogą zwiększyć łamliwość DNA [58] i ułatwiać dostępność DNA do enzymów restrykcyjnych [2,88], co może mieć związek z mechanizmem złamań chromosomowych i translokacji wzajemnych.

Rozpoznanie cytogenetyczne TCW wymaga podania chromosomów, które biorą udział w translokacji, określenia położenia punktów złamania na obydwu chromosomach oraz metod barwienia, za pomocą których zidentyfikowano TCW. W cytogenetyce klinicznej zaleca się stosowanie metody GTG i RBG równocześnie. Ważne jest ustalenie stanu zrównoważenia lub niezrównoważenia kariotypu, a następnie sprawdzenie, czy translokacja jest aberracją nabytą (*de novo*) czy rodzinnie występującą oraz po kim jest odziedziczona – po ojcu lub po matce. Przynależność chromosomu pochodnego powstałego w wyniku translokacji wyznacza centromer chromosomu macierzystego wg ISCN (1995) [37,59]. Trudności właściwego zakwa-

lifikowania powstają, gdy punkt złamania leży blisko centromeru. Najlepiej wówczas skorzystać z metod cytogenetyki molekularnej typu hybrydyzacji *in situ*, stosując swoiste sondy okolicy centromerów z unikalną sekwencją interesującego nas chromosomu [63].

Ocenę położenia punktów złamań chromosomów zaangażowanych w translokację metodami klasycznymi przeprowadza się na chromosomach barwionych techniką prążkową o rozdzielczości około 300–350 prążków. Wiarygodność oceny jest wyższa, gdy w miejscu złamania są dwa prążki różniące się intensywnością zabarwienia lub możliwe jest porównanie nadmiaru prążków na jednym segmencie przy jednakowym niedoborze na drugim. Można czasem sprecyzować, czy złamanie nastąpiło w obrębie ciemnego prążka, czy na granicy między dwoma prążkami jasnym i ciemnym. Jeżeli w wyniku translokacji połączą się dwa prążki chromosomowe o podobnym wysyceniu barwnika, to wówczas trudne jest rozstrzygnięcie, która ich część ulega przegrupowaniu.

Przykład translokacji chromosomowej przedstawiono na rysunku 2a. Barwienie prążkowe chromosomów prowadzono metodą GTG i RBG. Translokację wykryto u pacjentki badanej z powodu pięciu poronień samoistnych w Zakładzie Genetyki Klinicznej w Białymstoku. Na schemacie przedstawiono interpretację punktów złamania zgodnie z ISCN [37]. Zapis kariotypu: 46,XX,t(5;13)(q13;q34)pat,GTG,RGB.

Metody cytogenetyki molekularnej otworzyły nowe możliwości oceny położenia punktu złamania w translokacji [45,90,95,96]. Bardzo atrakcyjna jest metoda tzw. malowania chromosomów (*painting*), w której stosując bibliotekę genów określonego chromosomu jako sondę, można wywołać reakcję hybrydyzacji z tym chromosomem bezpośrednio na preparacie cytogenetycznym [27]. Wynik hybrydyzacji rozpoznaje się za pomocą technik fluorescencyjnych. Można zróżnicować segmenty konkretnego chromosomu, a tym samym ocenić położenie punktów złamań chromosomów w translokacji [78]. Stosując metody FISH, zwiększono rozdzielczość dotychczas stosowanych metod. Można wykrywać tzw. kryptotranslokacje, których segmenty ulegające wymianie nie mogły być uwidocznione przy klasycznych metodach prążkowych [22]. Należy dodać, że technika FISH ma też swoje ograniczenia. Jak się okazuje nie wszystkie biblioteki chromosomowe efektywnie wykrywają pochodne chromosomy po translokacji [64], np. w metodzie malowania chromosomów [41].

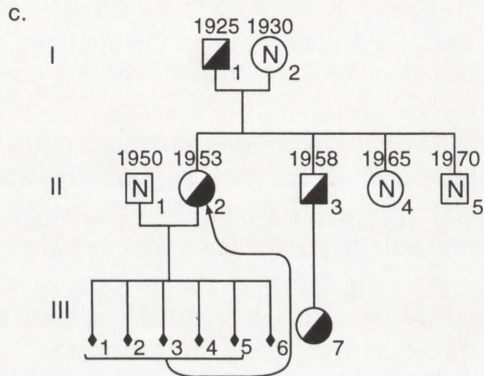
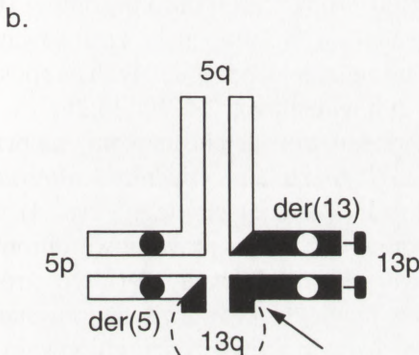
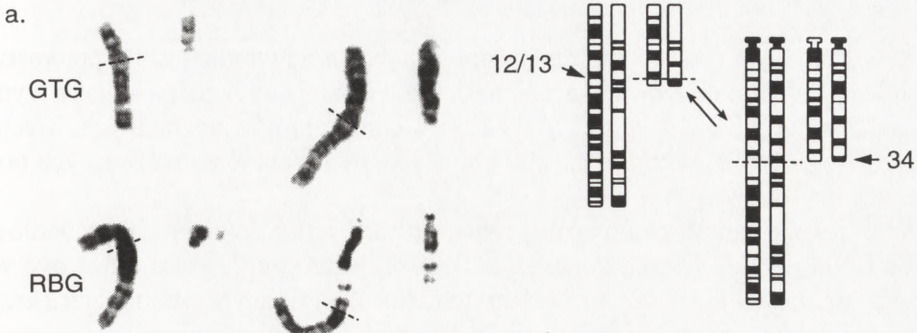
Rys. 2. Przykład karty ryzyka genetycznego: a – zestawienie chromosomów uczestniczących w translokacji wraz z homologami ze wskazaniem punktów złamania, wzór prążkowy GTG i RBG wg ISCN (1995) na chromosomach prawidłowych (zewewnętrzne) i chromosomach pochodnych (der) (wewnętrzne); zapis kariotypu pacjentki: t(5;13)(q12/13;q34)pat GTG, RBG; b – kwadriwalent mejozytyczny ze wskazaniem strzałką mechanizmu segregacji 3:1, który może doprowadzić do powstania nie zrównoważonego kariotypu u żywo urodzonego potomstwa; c – rodowód; d – oszacowanie ryzyka genetycznego urodzenia dziecka z niezrównoważonym kariotypem na podstawie dostępnych danych empirycznych wg modelu Stengel-Rutkowski i wsp. [85]



**Grupa niskiego ryzyka (< 5%)**

T (5;13)(q12/q13;q34)

Białystok, Polska Kolekcja TCW (P-33)



**1d. Prawdopodobieństwo nie zrównoważenia pojedynczego segmentu**

trisomia 5q12→qter\*\* (monosomia 13qter) lub  
 monosomia 5q12→qter\*\* (trisomia 13qter)  
 po segregacji 2 : 2 i rozdziale przyległym typu 1:

MAT/PAT : niepodwyższone

**2. Prawdopodobieństwo nie zrównoważenia pojedynczego segmentu**

trisomia 5q12→cen→pter\*\* (trisomia 13qter)  
 monosomia 5q12→cen→pter\*\* (monosomia 13qter)  
 po segregacji 3 : 1 (trisomia trzeciorzędowa):

MAT/PAT : niepodwyższone

**3. Prawdopodobieństwo trisomii wymiennej**

po segregacji 3 : 1:

MAT : < 0,2% (0/256) : 2 ~ 0,1%

PAT : brak danych

\*\* – nie obserwowano u żywo urodzonego potomstwa

CAŁKOWITA WARTOŚĆ:

MAT : 0,1%

PAT:niepodwyższone?

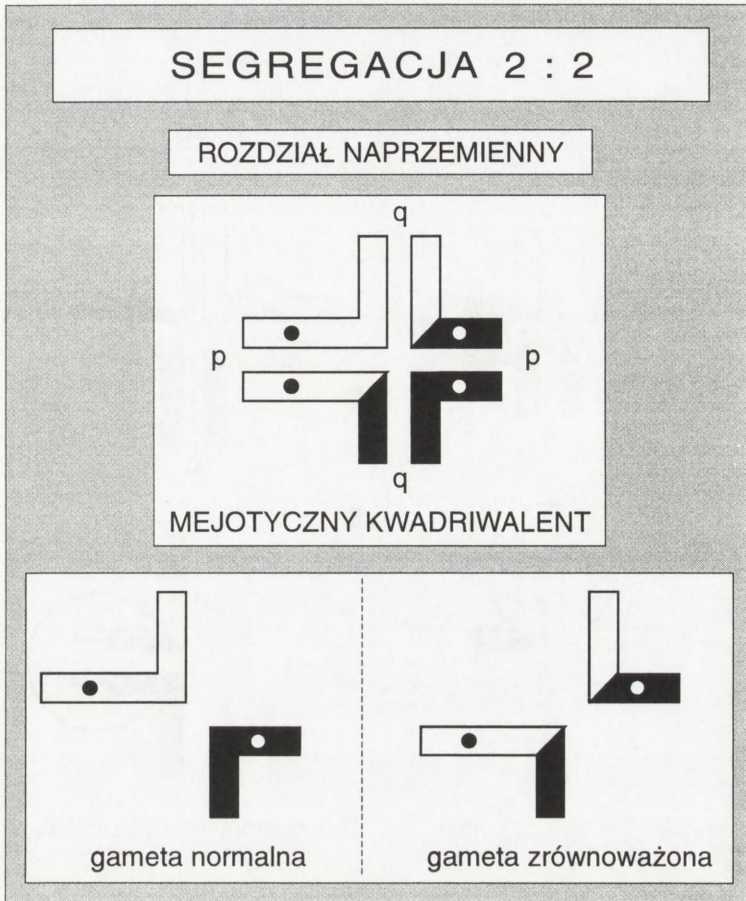
wskazanie do badania kariotypu : pięć poronień

## 2. POWSTAWANIE NIEZRÓWNOWAŻONYCH GAMET U NOSICIELI TCW

Powodem występowania poronień samoistnych i wad wrodzonych u potomstwa nosicieli TCW jest niezrównoważony kariotyp. Powstaje on najczęściej jako wynik odziedziczenia tylko jednego z rodzicielskich chromosomów pochodnych. Mechanizm przechodzenia poszczególnych chromosomów do komórek rozrodczych podczas mejozy jest złożony.

W leptotenie mejozy chromosomy zaangażowane w translokację oraz prawidłowe chromosomy homologiczne koniugując formują jedną grupę, która może być widoczna w pachytenie jako kwadriwalent (tetrada), czyli figura przypominająca krzyż [rys. 3]. Bardzo małe segmenty chromosomowe nie zawsze mogą koniugować, co powoduje utworzenie dwóch bivalentów lub grupy trzech chromosomów (trivalentu) i pojedynczego chromosomu (uniwalentu). Ostatnio przy zastosowaniu metody FISH udowodniono wpływ występowania chiazm śródramiennych na sposób rozchodzenia się chromosomów u nosicieli indywidualnych TCW [25,26].

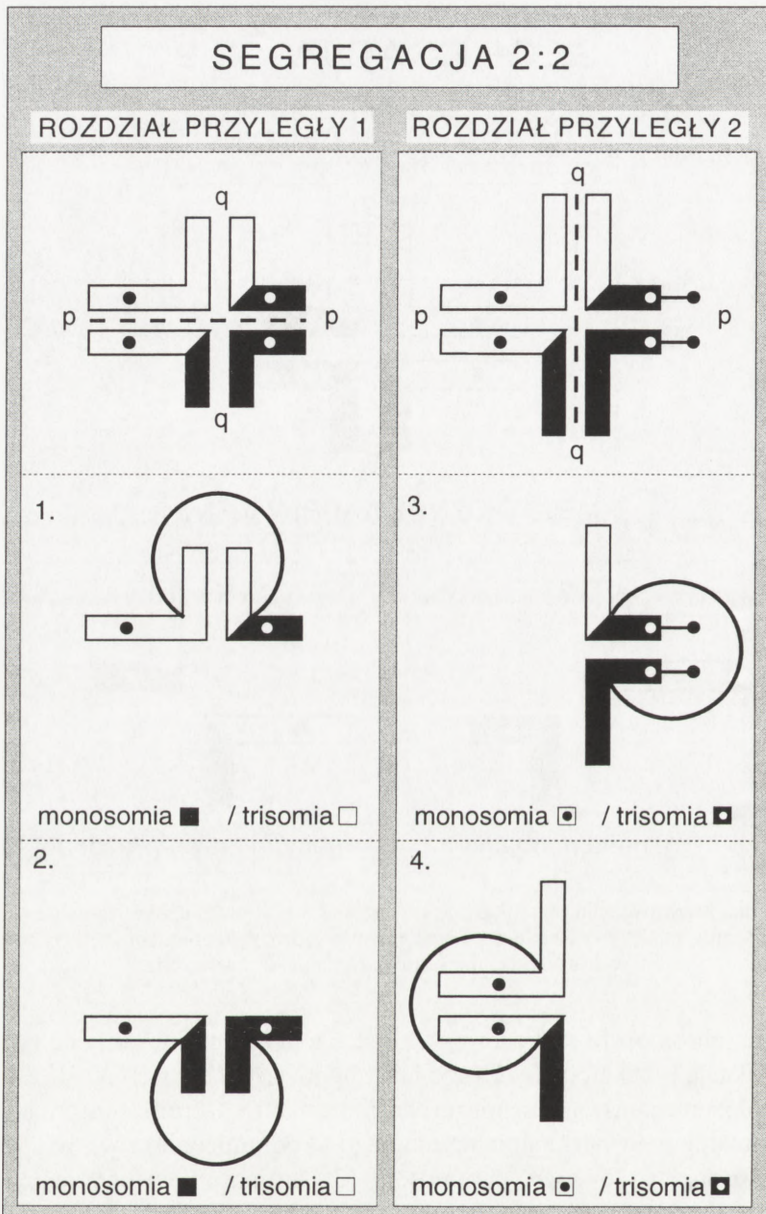
Do jednego bieguna wrzeczona mogą być przemieszczone chromosomy na przemian co drugi tzn. pierwszy i trzeci chromosom (rozdział naprzemienny – *alternate*, rys. 3) albo przechodzą chromosomy sąsiadujące (rozdział przyległy, rys. 4). Po rozdziale naprzemiennym jedna komórka potomna zawiera prawidłowe chromosomy, druga zaś dwa chromosomy zaangażowane w translokację (kariotyp zrównoważony, rys. 3). Rozdziały chromosomów przyległe prowadzą do powstania dwóch niezrównoważonych komórek, każda z jednym z dwóch przegrupowanych chromosomów powstałych w wyniku translokacji. Istotne jest, czy przemieszczone do komórki chromosomy sąsiedzkie mają centromery homologiczne (rozdział przyległy typu 2) czy niehomologiczne (rozdział przyległy typu 1). Najczęściej obserwowane niezrównoważenie kariotypu u żywo urodzonego potomstwa pochodzi w wyniku rozdziału przyległego typu 1 (monosomia jednego segmentu i trisomia drugiego) (podwójne niezrównoważenie kariotypu, rys. 4). Jeżeli punkt złamania na jednym z chromosomów biorących udział w translokacji jest położony albo na końcowym prążku ramion danego chromosomu, albo w okolicy centromerowej chromosomów akrocentrycznych, to niezrównoważenie kariotypu występuje jako monosomia lub trisomia pojedynczego segmentu tego z chromosomów, na którym punkt złamania jest położony śródramiennie (pojedyncze niezrównoważenie). Wyróżnienie pojedynczego i podwójnego niezrównoważenia kariotypu ma bardzo istotne znaczenie w określaniu ryzyka genetycznego w indywidualnych TCW. Na rysunku 5 przedstawiono schematycznie translokację prowadzącą do podwójnego niezrównoważenia kariotypu (rys. 5A), w której oba punkty złamania są położone śródramiennie oraz translokację ryzyka pojedynczego niezrównoważenia (rys. 5B), w której jeden punkt złamania leży śródramiennie (chromosom główny), a drugi



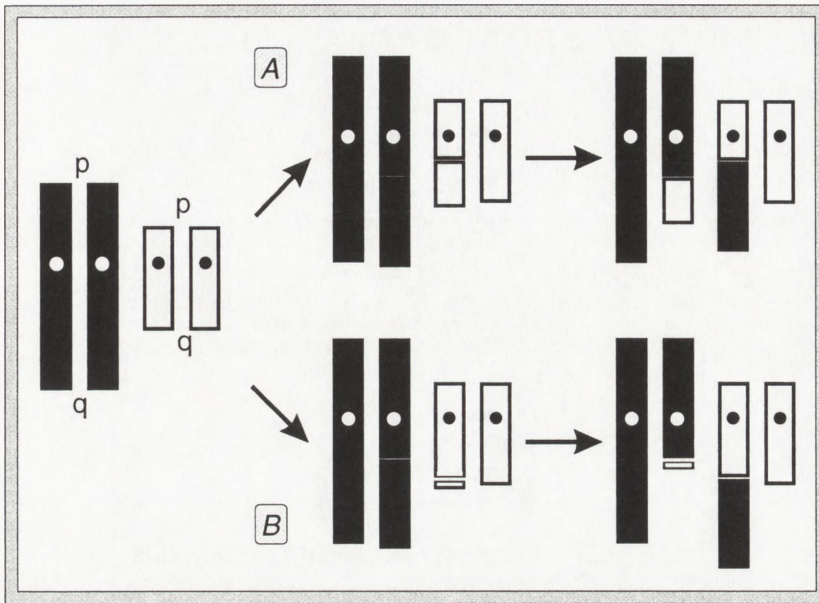
Rys. 3. Schemat kwadriwalentu meiotycznego utworzonego z chromosomów stranslokowanych i ich homologów; segregacja 2 : 2 – rozdział naprzemienny prowadzący do powstania gamety prawidłowej (lewa strona) i gamety zrównoważonej (prawa strona)

terminalnie (chromosom podrzędny). Translokacja zaprezentowana na rysunku 2A jest translokacją ryzyka pojedynczego niezrównoważenia kariotypu z uwagi na terminalne położenie punktu złamania na chromosomie 13. Chromosom 5 ma położenie punktu złamania wewnątrz ramienia długiego (śródramiennie) i wg w/w kryterium jest chromosomem głównym, chromosom 13 chromosomem podrzędnym.

Jeżeli rozchodzenie się chromosomów następuje w sposób symetryczny, czyli po dwa chromosomy z kwadriwalentu przemieszczają się do każdej komórki potomnej, to jest to forma segregacji typu 2 : 2. Powoduje powstanie równej liczby normalnych, zrównoważonych oraz niezrównoważonych gamet. Segregacja 2 : 2 jest najczęstszym sposobem segregacji czterech chromosomów pierścienia lub łańcucha i nie zmienia liczby chromosomów w gamecie.

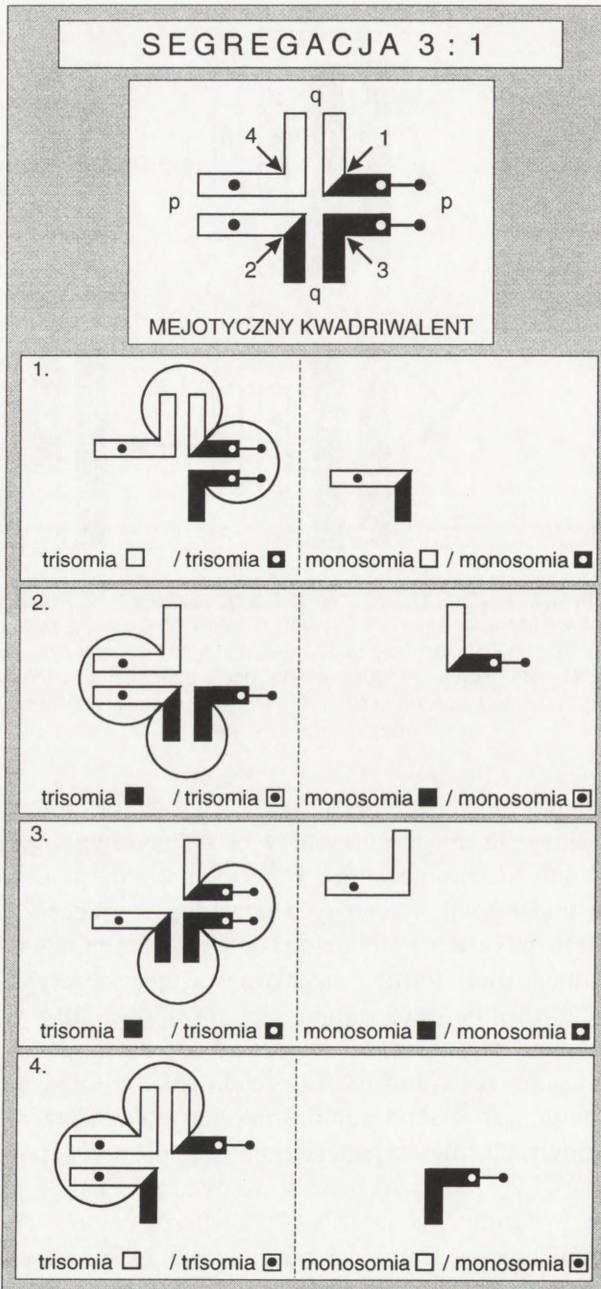


Rys. 4. Schemat rozchodzenia się chromosomów w wyniku segregacji 2 : 2 – rozdział przyległy typu 1 (lewa strona) – do komórki potomnej przechodzą chromosomy z centromerami niehomologicznymi i rozdział przyległy typu 2 (prawa strona) – do komórki potomnej przechodzą chromosomy z centromerami homologicznymi; 1–4 – różne kombinacje segmentów chromosomowych w nierównoważonych gametach po mejotycznej segregacji 2 : 2 i rozdziale przyległym typu 1 ( 1 i 2 ) oraz po rozdziale przyległym typu 2 (3 i 4); monosomii jednego segmentu towarzyszy trisomia drugiego (podwójne niezrównoważenie)



Rys. 5. Rodzaj translokacji chromosomowej wzajemnej w zależności od położenia punktów złamania: A – na obu chromosomach punkt złamania leży śródramiennie – translokacja ryzyka podwójnego niezrównoważenia kariotypu; B – na jednym z chromosomów punkt złamania leży terminalnie (chromosom podrzędny), na drugim śródramiennie (chromosom główny) – translokacja ryzyka pojedynczego niezrównoważenia kariotypu

Stosunkowo rzadko można zaobserwować niezrównoważenie kariotypu wynikające z nieprawidłowej liczby chromosomów po mejotycznej segregacji i wówczas potomstwo ma 45 lub 47 chromosomów w kariotypie. Powstanie aneuploidalnych gamet u nosicieli translokacji wzajemnych powoduje segregacja 3 : 1 w stadium anafazy I podziału mejotycznego lub nierozdzielenie w stadium anafazy II podziału mejotycznego. Istnieją dwie formy niezrównoważenia kariotypu po segregacji 3 : 1, a mianowicie trisomia (monosomia) trzeciorzędowa lub wymienna (rys. 6). Do trisomii trzeciorzędowej dochodzi wówczas, gdy do komórki potomnej przechodzą dwa chromosomy prawidłowe oraz jeden z dwóch chromosomów powstałych po translokacji, natomiast w monosomii komórka jest pozbawiona dwóch chromosomów prawidłowych i zawiera jeden chromosom pochodny powstały w wyniku translokacji (rys. 6)[1,2]. Podwójne niezrównoważenie kariotypu po segregacji 3 : 1 wyraża się w formie trisomicznej obydwu segmentów chromosomowych (podwójna trisomia) albo w formie monosomicznej tych segmentów (podwójna monosomia, rys. 6) [1,2]. Trisomia wymienna jest wówczas, gdy komórka potomna zawiera obydwa chromosomy pochodne, powstałe w wyniku translokacji i jeden z dwóch chromosomów prawidłowych homologicznych do chromosomów zaangażowanych w translokację (rys. 6) [3,4]. Niezrównoważenie kariotypu zazwyczaj



Rys. 6. Schemat rozchodzenia się chromosomów mejotycznych z kwadriwalentu w wyniku segregacji 3 : 1 i powstawanie różnych form niezrównoważenia: podwójnej trisomii (1,2) lub monosomii (1,2) trzeciorzędowej, gdy do komórki potomnej przechodzi jeden z dwóch chromosomów pochodnych oraz obydwu chromosomów prawidłowych oraz podwójnej trisomii (3,4) i monosomii (3,4) wymiennej, gdy do komórki potomnej przechodzą obydwu chromosomy pochodne oraz jeden chromosom prawidłowy

jest spowodowane dodatkowym materiałem genetycznym całego chromosomu prawidłowego homologicznego do chromosomów zaangażowanych w translokację (rys. 6) [3,4].

Innym sposobem rozchodzenia się czterech chromosomów z pierścienia (łańcucha) jest segregacja 4 : 0 i jej efekt był obserwowany tylko w plemnikach nosicieli TCW [12,65].

U nosiciela translokacji zrównoważonej powstanie gamet niezrównoważonych zależy od wielu czynników. Do nich należy zdolność do kompletnej asocjacji synaptycznej chromosomów zaangażowanych w translokację z chromosomami homologicznymi, rozpoznanie centromerów chromosomów homologicznych przez mikrotubule wrzecionka kariokinetycznego, następnie rodzaj chromosomów biorących udział w translokacji (ich wielkość, położenie centromerów, położenie punktów złamania, obecność organizatora jąderkowego, obecność chiazmy) oraz wydolność kontroli neurohormonalnej mejozy [1].

Jednym z mechanizmów, który wpływa na nieprawidłowe rozchodzenie się chromosomów homologicznych, jest przedwczesne rozdzielanie się bivalentów, zanim mikrotubule wrzecionka kariokinetycznego rozpoznają homologiczne kinetochory bivalentu. Tendencję do przedwczesnego oddzielenia się chromatyd mają uniwalenty, które u nosicieli TCW występują w zwiększonej liczbie [17,46]. Wprowadzenie technik molekularnych do badań organizacji chromosomów pozwoliło wyjaśnić, że zmniejszona częstość rekombinacji między chromosomami 21 jest czynnikiem prowadzącym do ich nierozdzielenia [61,75] wskazując na zaburzenia koniugacji jako główną przyczynę trisomii.

Od dawna wiadomo, że występowanie z. Downa zwiększa się u potomstwa matek w zaawansowanym wieku. Dodatkowy chromosom 21 jest pochodzenia matczynego w 94% [3]. Obserwacja Speeda [77] oocytów w mikroskopie elektronowym u kobiet z prawidłowym kariotypem i zwiększoną częstością błędów koniugacji w porównaniu do mężczyzn wyjaśnia, że błędy koniugacji chromosomów mogą być odpowiedzialne za tworzenie niezrównoważonych gamet u kobiet. Zaburzenie współdziałania hormonów z komórkami somatycznymi pęcherzyka mogą być jednym z czynników wpływających na przebieg mejozy doprowadzając do powstawania gamet z niezrównoważonym kariotypem u kobiet w starszym wieku [30]. Podobne mechanizmy mogą funkcjonować u matczynej nosicieli TCW, bowiem ich potomstwo z niezrównoważonym kariotypem po segregacji 3 : 1 obserwuje się częściej w zaawansowanym wieku [53,85]. Tylko w sporadycznych przypadkach stwierdza się ojcowskie pochodzenie niezrównoważonego kariotypu powstałego po segregacji 3 : 1 chromosomów rodzicielskich. Należy przypuszczać, że nie bez wpływu pozostaje tu zjawisko disomii jednorodzicielskiej ograniczające przeżycie płodów trisomicznych [40,42,92]. Należy dodać, że badania 65 rodzin z TCW wykazały tylko 1 przypadek disomii [6].

Bezpośrednia obserwacja chromosomów w plemnikach człowieka jest możliwa, gdy są one wprowadzone do komórek jajowych chomika [66]. U mężczyzn z prawidłowym kariotypem częstość aberracji chromosomowych wynosi od 1,9% do 15,8%, [11], u nosicieli TCW od 12,5–77%. Istnieje duża zmienność w częstości różnych kombinacji segmentów w niezrównoważonym kariotypie w plemnikach w poszczególnych badaniach i mogą powstawać nieprawidłowe gamety w wyniku każdego ze znanych mechanizmów segregacji i rozdziału chromosomów mejjotycznych. Wprowadzenie technik hybrydyzacji *in situ* z użyciem fluorescencji [7,28,35,97] znacznie rozszerzyło możliwości badań mechanizmów mejjotycznych, natomiast tzw. problem efektu interchromosomowego, czyli obecności dodatkowych aneuploidii z translokacjami nadal pozostaje nierozstrzygnięty. Bogactwo różnych kombinacji niezrównoważonego kariotypu w gametach obserwowano u każdego spośród trzydziestu dotychczas przebadanych nosicieli. Świadczy to, że nie ma ograniczeń w działaniu poszczególnych mechanizmów rozdziału i segregacji mejjotycznej.

### **3. NIEPŁODNOŚĆ U NOSICIELI TRANSLOKACJI CHROMOSOMOWYCH WZAJEMNYCH**

Obecność niezrównoważonego kariotypu w plemnikach ludzkich penetrujących oocyty chomicze, jak też w samych oocytach człowieka potwierdza wniosek z obserwacji na zwierzętach, że aberracje chromosomowe generalnie nie są przeszkodą w zapłodnieniu. Z drugiej strony wiadomo, że nie w każdym przypadku aberracji chromosomowej w oocycie lub plemniku dochodzi do zapłodnienia.

Do niepłodności mogą prowadzić translokacje, które zaburzają prawidłowy przebieg mejozy powodując zatrzymanie procesu w pachytenie II podziału. Poświęcono temu szereg prac poglądowych [17,74,91]. Są też polskie obserwacje [21]. Szczególnym rodzajem są translokacje angażujące chromosom X i autosom. U kobiet niepłodność jest związana z położeniem punktu złamania chromosomu X w tzw. regionie krytycznym [50,69,73]; mężczyźni są niepłodni [10,73]. Problem niepłodności u nosicieli translokacji angażujących chromosom Y u mężczyzn zależy prawdopodobnie również od położenia punktów złamania na chromosomie Y, bowiem obserwuje się mężczyzn płodnych, jak i niepłodnych z tego rodzaju translokacją [10,17].

### **4. TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE U PŁODÓW PORONIONYCH SAMOISTNIE**

Obecność aberracji chromosomowych w komórkach rozrodczych i wczesnych stadiach rozwoju człowieka wyjaśnić może wysoką częstość poronień samoistnych



ciąży, oszacowaną przez Millsa na 16% [55,76]. Badania Hertiga i Rocka [33,34] udowodniły, że 50% zarodków ludzkich nie mogło być zaimplantowanych w macicy wskutek zmian morfologicznych. Wprawdzie badania Hertiga nie dostarczyły bezpośrednio dowodu, że zmiany morfologiczne zarodków były wywołane aberracjami chromosomów, to jednak wiadomo, że aberracje chromosomów takie zmiany wywołują.

Badanie zarodków ludzkich uzyskanych metodą zapłodnienia pozaustrojowego, (uznanych za prawidłowe wg kryteriów morfologicznych) wykazały, że około 20% zarodków ma aberracje chromosomowe [1,47,67]. Głównie były to zmiany liczbowe chromosomów (kariotyp haploidalny, triploidalny lub mozaikowość). W zarodkach nosicieli TCW należy się spodziewać zwiększonej częstości niezrównoważonego kariotypu. Istnieją w tej chwili techniczne możliwości celowanej oceny niezrównoważenia w pojedynczej komórce metodą FISH zarówno w diagnostyce prekoncepcyjnej, jak też w wyniku pobrania jednej komórki z zarodka 8–16-komórkowego uzyskanego w programie zapłodnienia pozaustrojowego [29].

Częstość utraty płodu w ciążach rozpoznawanych klinicznie szacuje się na 12–15% [76]. Biorąc pod uwagę ciąży 7–12-tygodniowe rozpoznawane ultrasonograficznie podano, że częstość poronień samoistnych zależy od wieku pacjentki i najwyższy ich wskaźnik (tj. 4,5%) dotyczy kobiet powyżej 35 roku życia; 2,5% w grupie wieku 30–35, a wskaźnik 1,5% – u kobiet przed 30 rokiem życia [16]. Częstość utraty płodów w ciążach po 16 tygodniu szacuje się na 1% i w tym okresie zaawansowania ciąży przyczynami poronień są głównie nietrzymanie szyjki macicy, wady macicy i choroby matki [76].

Wyniki badań kariotypu płodów poronionych samoistnie wskazują na bardzo niską częstość występowania zmian strukturalnych chromosomów w porównaniu do częstości aberracji liczbowych. W materiale poronień rozumianych jako wydalenie samoistne jaja płodowego do okresu 28 tygodni [94] częstość ta wynosi 3–6% w porównaniu do częstości aberracji liczbowych rzędu 30–60%, przy czym większość aberracji jest obserwowana w tzw. poronieniach wczesnych określonych do 12 tygodnia wieku ciążowego lub jako materiał zawierający zarodek nie większy niż 30 mm w wymiarze ciemieniowo-krzyżowym, co odpowiada 10 tygodniom wieku rozwojowego.

Jak oszacowała Jacobs [38], niezrównoważone kariotypy spowodowane aberracjami chromosomowymi strukturalnymi u płodów i zarodków były obserwowane z częstością 1,54%. W połowie przypadków były one efektem nosicielstwa aberracji zrównoważonej u któregoś z rodziców; pozostałe powstawały *de novo* wskutek procesów zachodzących podczas podziału mejotycznego. Uwzględniając późniejsze dane amerykańskie podaje się, że częstość niezrównoważonych aberracji strukturalnych u płodów wynosi 3% [76]. Zwraca uwagę fakt, że niezrównoważone kariotypy częściej powstawały w wyniku translokacji robertsonowskich niż w wyniku translokacji wzajemnych.

Dane diagnostyki prenatalnej II trymestru ciąży zbierane przez okres 10 lat za pomocą ankiet we wszystkich ośrodkach amerykańskich i kanadyjskich podały w 1991r., że częstość TCW *de novo* wynosi 1 na 2000 ciąż. Ryzyko, że płód nosiciela TCW będzie obciążony wadą wrodzoną oszacowano na 6,1%. [93].

## 5. TRANSLOKACJE ZRÓWNOWAŻONE W GRUPIE PAR MAŁŻEŃSKICH Z PORONIENIAMI NAWYKOWYMI

Dane zebrane przez Boué i wsp. [8] z ośrodków badających małżeństwa z poronieniami wykazały, że średnia częstość aberracji strukturalnych wynosi 7,2% i waha się od 2,8% do 13,4%. Późniejsze opracowania kariotypów bardzo dużych grup par małżeńskich podają zbliżoną częstość aberracji chromosomowych: tj. 4,31% u 2136 par przebadanych w ośrodku w Tuluzie [9]; 6% w grupie 269 własnych przypadków i 5000 z literatury w badaniach Campana i wsp. [13]; 6,36% na 1555 małżeństw w Leuven [24]. Jest to siedmiokrotnie wyższa częstość niż w populacji ogólnej. Kompilacja polskich danych z różnych ośrodków wskazuje częstość 7,52% [56]. Zaobserwowano pozytywną korelację między występowaniem aberracji chromosomowych a liczbą poronień [13].

Zasadniczym i zrozumiałym mankamentem opracowań na temat aberracji chromosomowych u małżeństw z zaburzeniami reprodukcji jest brak informacji o kariotypach utraconych płodów. Uniemożliwia to stwierdzenie, czy i jakie formy niezrównoważenia były obecne w kariotypach płodów, a tym samym, jaka jest zdolność przeżycia płodu w zależności od różnych form niezrównoważenia kariotypu poszczególnych segmentów chromosomowych. Wydaje się, że wyniki badań z diagnostyki prenatalnej I i II trymestru ciąży są w stanie częściowo na to odpowiedzieć.

Obserwacje Stengel-Rutkowski i wsp. [85] 1120 rodzin z TCW wykazały, że częstość niezrównoważonego kariotypu u potomstwa w diagnostyce prenatalnej II trymestru ciąży jest 1,5–10 razy wyższe niż częstość niezrównoważenia kariotypu obecnego u potomstwa przy urodzeniu. Dalsze badania grupy z Monachium analizujące 13 411 wyników badań prenatalnych II trymestru ciąży wykonane w Niemczech w latach 1973–1979 pozwoliły ustalić wartość prawdopodobieństwa u płodów niezrównoważonego kariotypu rodziców obciążonych nosicielstwem translokacji robertsonowskich z chromosomem 21 na:  $19,2 \pm 7,7\%$  dla nosicielstwa matczynego, natomiast dla obciążonych nosicielstwem TCW od 19% do 37,5% w zależności od rodzaju translokacji [84]. Kolejne badania tej grupy w latach 1985–1992 dotyczyły analizy wyników prenatalnych pierwszego trymestru ciąży, uzyskanych z biopsji trofoblastu. W grupie 14 594 badań prenatalnych wykryto 83 rodziny obciążone TCW i stwierdzono 11 płodów z niezrównoważonym kariotypem (9/50 pochodzenia matczynego, 2/33 pochodzenia ojcowskiego). Analiza ryzyka gene-

tycznego wynikająca z indywidualnej translokacji wykazała, że częstość niezrównoważenia kariotypu u płodów w I trymestrze ciąży wynosi 1:8, natomiast przy urodzeniu 1:17 [83]. Ilustruje to ograniczoną przeżywalność potomstwa uzależnioną od kombinacji poszczególnych segmentów chromosomowych w niezrównoważonym kariotypie. W badaniach amerykańskich [44] w grupie 11 473 wyników badań prenatalnych I trymestru ciąży (CVS) wykryto 180 aberracji struktury chromosomów, jednak nie analizowano ryzyka genetycznego u tych rodzin. Badania chorwackie grupy 40 nosicieli TCW diagnozowanych prenatalnie potwierdzają wpływ rodzaju translokacji na częstość występowania niezrównoważonego kariotypu w okresie prenatalnym [5].

## 6. TRANSLOKACJE CHROMOSOMOWE W OKRESIE PERI - I POSTNATALNYM

Duża letalność płodów z niezrównoważonym kariotypem decyduje o wybiórczym występowaniu poszczególnych segmentów chromosomowych w formie trisomii częściowych, czy monosomii lub też podwójnych niezrównoważeń kariotypu różnych segmentów u dzieci po urodzeniu [72,86].

Klinicznym efektem niezrównoważonej translokacji u dziecka jest zwykle zespół cech dysmorficznych, opóźnienie rozwoju psychomotorycznego i wady wrodzone. Już za pomocą technik cytogenetyki klasycznej wyznaczono najkrótsze tzw. krytyczne segmenty, których niezrównoważenie w kariotypie powoduje wystąpienie określonych zespołów dysmorficznych, jak np. prążek 21q22 dla z. Downa, 9p24 dla zespołu monosomii 9p i 4p16 dla z. Wolfa. Charakterystyczna dysmorfia, która powstaje już przy niezrównoważeniu małych segmentów danego chromosomu jest względnie stała. Na przykład, jak podaje Schinzel [72] w grupie 15 pacjentów z duplikacją 7q zespół cech dysmorficznych nie różnił się, gdy niezrównoważenie obejmowało zarówno segment 7q34→qter, jak i dłuższy 7q22→qter. Podobnie charakterystyczny obraz dysmorfii w pełnej trisomii 13, duplikacji 13q22→qter, czy 13q13→qter nie zależał od długości segmentu trisomicznego. Długość niezrównoważonego segmentu danego chromosomu w kariotypie wpływała natomiast na częstość wad rozwojowych i głębokość upośledzenia umysłowego pacjentów. U pacjentów z translokacją niezrównoważoną dłuższego segmentu liczba i stopień zaawansowania wad były większe, a rozwój psychiczny był głębiej upośledzony [72]. Należy pamiętać, że u pacjentów z tym samym niezrównoważeniem rodzaje wad narządów wewnętrznych mogą być bardzo różne [71].

W wielu przypadkach translokacji niezrównoważonych zespół towarzyszących objawów klinicznych nie został jeszcze w pełni zdefiniowany. Stwarza to określone trudności w diagnostyce przedurodzeniowej. Wykrycie prenatalne płodu z niezrów-

noważonym kariotypem wymaga bowiem przedstawienia całej listy skutków klinicznych, których wystąpienia należy się spodziewać po urodzeniu dziecka.

## 7. PROGNOZOWANIE GENETYCZNE W RODZINACH OBCIĄŻONYCH TCW

Wśród klinicystów dość rozpowszechniony jest mylny pogląd, że każda rodzina obciążona występowaniem TCW ma jednakowe, wysokie ryzyko urodzeń dzieci z wadami. Skłania to lekarzy do kierowania na diagnostykę prenatalną w każdym przypadku wykrycia nosicielstwa TCW. Jeśli kariotyp jest niezrównoważony, oznacza to obecność wad u płodu. Różnorodność i częstość aberracji chromosomowych w okresie prenatalnym jest wyższa w porównaniu do zmian kariotypu obserwowanych u dzieci po urodzeniu, ponieważ ograniczona jest przeżywalność płodów z zaburzeniami rozwojowymi. Rodzaj zaburzeń i wad zależy od tego, jakie kombinacje segmentów chromosomowych są obecne w niezrównoważonym kariotypie danego płodu. Każde nosicielstwo translokacji chromosomowej może manifestować się innym efektem klinicznym, co wynika z indywidualnego składu genetycznego każdej translokacji chromosomowej [48,72,82,85]. Trudności w przewidywaniu prawdopodobieństwa występowania niezrównoważonego kariotypu u potomstwa nosicieli indywidualnych TCW wynikają z szeregu czynników. Mogą być różne formy niezrównoważenia kariotypu u potomstwa u tego samego nosiciela TCW. TCW są heterogenne i unikatowość większości TCW pod względem położenia punktów złamania w małych liczebnie rodowodach uniemożliwia bezpośrednie określenie ryzyka. Z tego powodu nie są generalnie podejmowane oceny indywidualnego ryzyka genetycznego w zależności od rodzaju translokacji.

Istnieje szereg propozycji przewidywania prawdopodobieństwa urodzeń dzieci z wadami bądź innych zaburzeń. Model Daniela [20] sugeruje ocenę względnej długości segmentów chromosomowych, wyrażonej jako odsetek całkowitej haploidalnej długości autosomów niezależnie, od jakiego chromosomu pochodzą segmenty niezrównoważenia. Daniel wykazał, że niezrównoważony kariotyp jest obserwowany u żywo urodzonego potomstwa w takich translokacjach, w których długość segmentu monosomicznego nie przekracza 2% względnej długości haploidalnej (HAL), a długość segmentu trisomicznego 4% HAL. Na sumę długości względnej segmentów monosomicznych i trisomicznego składają się pomiary segmentów chromosomowych zaangażowanych w translokację od punktu złamania do telomeru. Użycie algebraicznej sumy długości względnej segmentów monosomicznych i trisomicznych ma swoje ograniczenia. Po pierwsze nie dostarcza informacji co do jakościowego efektu poszczególnych genów, które w nadmiarze lub niedoborze mogą mieć istotny wpływ na kształtowanie fenotypu, a tym samym na przeżywalność potomstwa. Po drugie, nie obejmuje tych przypadków translokacji, w których dwa segmenty

ulegające wymianie są prawie równe i suma algebraiczna będzie równa zeru. Uwzględnia tylko te kombinacje segmentów, które powstają po segregacji 2 : 2 i rozdziale przyległym typu 1.

Podstawą klasyfikacji translokacji TCW w modelu Daniela jest sposób wykrycia nosicielstwa translokacji chromosomowej tzw. *ascertainment*. Pierwszą grupę stanowią translokacje wykrywane przez badanie cytogenetyczne dzieci z dysmorfia i nieprawidłowym fenotypem. Jest to grupa translokacji wysokiego ryzyka urodzenia dziecka z wadami. Translokacje, których nosicielstwo stwierdzono przez badania chromosomowe z powodu poronień samoistnych, należą do grupy drugiej wg tej klasyfikacji. Trzecią grupę tworzą nosiciele TCW zaobserwowanych w badaniach cytogenetycznych wykonywanych z tzw. innych wskazań niż wyżej wymienione. Model ten jest wykorzystywany przez wielu badaczy [62], a coraz więcej danych empirycznych jest opracowywanych przez samego autora. Jest to daleko idące uproszczenie, bowiem sposób wykrycia czy rejestracji TCW może być przypadkowy jak w ruletce i nie może być podstawą oceny ryzyka. Problem ten przedyskutowano wcześniej [54].

Model Daniela został rozbudowany przez Jalberta i Sele [39], którzy przyjęli dodatkowe założenie, że nie zrównoważony kariotyp u potomstwa żywo urodzonego powstaje za pomocą jednego i tego samego mechanizmu segregacji i rozdziału chromosomów, takiego, który prowadzi do ilościowo najmniejszego z możliwych teoretycznie typów nie zrównoważenia kariotypu. Rysując diagramy chromosomów w stadium pachytenu, wykazali, że proporcje odcinków "krzyża" pachytenowego różnych TCW mają związek ze sposobem segregacji prowadzącej do nie zrównoważenia. Obliczając proporcje odpowiednich odcinków wyznaczonych przez położenie punktów złamania i centromerów, można wg autorów przewidywać, który sposób segregacji w indywidualnej translokacji prowadzi do minimalnego nie zrównoważenia kariotypu. Następnie wprowadzając regułę wg Daniela przewidywać, czy są to wartości ryzyka poronień czy też urodzeń dzieci z wadami [26]. Badania te są kontynuowane przez Cohena i wsp. [19,26], Cans i wsp. [15].

Najnowszy model oszacowania ryzyka genetycznego w rodzinach obciążonych TCW opracowali Stene i Stengel-Rutkowski [82], Stengel-Rutkowski i wsp. [85]. Niektóre zasady tej metody w polskim piśmiennictwie omówiono wcześniej [49,50]. Znajomość danych empirycznych rodzaju i częstości kombinacji segmentów występujących w nie zrównoważonych kariotypach u żywo urodzonego potomstwa nosicieli TCW jest podstawą do określenia wielkości ryzyka genetycznego [81]. Dane empiryczne uwzględniają każdy rodzaj mechanizmu segregacji mejozy oraz wiek rozwojowy, do którego przeżywa potomstwo TCW z nie zrównoważonym kariotypem.

Podstawą prognozy genetycznej wg tego modelu [81,82,85] jest identyfikacja segmentu/ów chromosomowego/wych, który może być nie zrównoważony w kariotypie u potomstwa indywidualnych nosicieli TCW. Wielkość segmentu chro-

mosomowego charakteryzuje się za pomocą położenia punktów złamania, skład genetyczny wyznacza chromosom, z którego pochodzi segment, a formę nie zrównoważenia określa mono- lub trisomia. Wyselekcjonowanie TCW, w których punkt złamania leży w regionie telomerowym dało podstawę do grupowania rodowodów. Grupuje się rodowody TCW obciążone ryzykiem pojedynczego nie zrównoważenia kariotypu w zakresie tego samego segmentu chromosomowego, który może powstać w wyniku różnych mechanizmów segregacji i rozdziału chromosomów mejotycznych. Pozwala to na określenie częstości urodzeń dzieci z wadami wskutek nie zrównoważenia danego segmentu chromosomowego i podanie wartości ryzyka empirycznego dla indywidualnych grup TCW z uwzględnieniem korekty oszacowania [52,80, 81,82,85]. Przykład karty ryzyka genetycznego wynikającego z nosicielstwa indywidualnej translokacji TCW obliczonego wg modelu Stengel-Rutkowski i wsp. [85] przedstawia rysunek 2. Karta zawiera chromosomy 5 i 13 uczestniczące w translokacji i ich pochodne  $der(5)$  i  $der(13)$  (rys. 2a). Interpretacja położenia punktów złamania chromosomów wg ISCN (1995) z uwzględnieniem obu metod barwienia tych chromosomów GTG i RBG na schemacie obok (rys. 2a). Położenie punktów złamania wyznacza segmenty chromosomowe, które mogą być nie zrównoważone w kariotypie w formie trisomii lub monosomii w różnych kombinacjach. Schemat kwadriwalentu pachytenowego (rys. 2b) ilustruje, że tylko mechanizm segregacji chromosomów 3:1 prowadzi do powstania nie zrównoważonego kariotypu, u żywo urodzonego potomstwa nosicieli rozpatrywanej  $t(5;13)$ . Rysunek 2c przedstawia rodowód, którego mała liczba zbadanych cytogenetycznie członków nie pozwala na bezpośrednią analizę ryzyka genetycznego. Wyniki oceny przeżywalności potomstwa z różnymi kombinacjami segmentów chromosomów w nie zrównoważonym kariotypie i oszacowanie wartości prawdopodobieństwa ich wystąpienia znajduje się na rysunku 2d.

Aby uzyskać kompletne dane o ryzyku nie zrównoważonego kariotypu z każdym możliwym segmentem chromosomowym, który może wystąpić u nieprawidłowego potomstwa nosicieli różnych translokacji chromosomowych, konieczne jest gromadzenie ogromnej liczby ich danych rodowodowych. Wydawałoby się, że grupa 1120 translokacji zebranych przez Stengel-Rutkowski i wsp. [85] jest duża. W praktyce okazało się, że uzyskano wartości szacunkowe tylko dla niewielkiej grupy nosicieli TCW angażujących specyficzne segmenty chromosomowe. Konieczne są dalsze opracowania. Polska Kolekcja TCW, która została utworzona w 1991 w Białymstoku, zgromadziła do 30 października 1995 r. z osiemnastu ośrodków genetycznych 243 translokacji [51,79]. Odrębnym problemem jest oszacowanie ryzyka, gdy obydwój rodzice są nosicielami TCW [14] lub nosicielstwo dotyczy translokacji złożonych [70].

Duża cytogenetyczna heterogenność TCW, różne sposoby powstawania nie zrównoważonych gamet u tego samego nosiciela, a także różny stopień żywotności potomstwa w okresie prenatalnym i postnatalnym czynią poradnictwo genetyczne

rodzin obciążonych TCW skomplikowaną procedurą. Wraz ze zgromadzeniem nowych danych empirycznych, zwiększeniem precyzji rozpoznań cytogenetycznych TCW i wprowadzeniem technik wspomagania komputerowego do określania ryzyka genetycznego będzie możliwe bardziej skuteczne i precyzyjne działanie w prognozowaniu i profilaktyce zaburzeń wywołanych stanem nosicielstwa TCW.

### Podziękowanie

Wyrażam podziękowania mgr Beacie Stasiewicz-Jarockiej, lek. med. Wojciechowi Szelałgowi, Cecylii Kosińskiej oraz Annie Piłaszewicz za pomoc techniczną w przygotowaniu manuskryptu oraz rycin. Praca finansowana z prac statutowych Akademii Medycznej w Białymstoku Nr 06 3500/96.

### PIŚMIENNICTWO

- [1] ANGELL RR, AITKEN RJ, VAN LOOK PFA, LUMSDEN MA, TEMPLETON AA. Chromosome abnormalities in human embryos after *in vitro* fertilization. *Nature* 1983; **303**: 336–338.
- [2] ANTEQUERA F, BOYES J, BIRD A. High levels of *de novo* methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 1989; **62**: 503–514.
- [3] ANTONARAKIS SE. Down Syndrome Collaborative Group. Prenatal origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N. Engl. J. Med.* 1991; **324**: 872–876.
- [4] AURIAS A, PRIEUR M, DUTRILLAUX B, LEJEUNE J. Systematic analysis of 95 reciprocal translocations of autosomes. *Hum Genet* 1978; **45**: 259–282.
- [5] BARISIĆ I, ZERGOLLERN L, MUZINIC D, HITREC V. Risk estimates for balanced reciprocal translocation carriers – prenatal diagnosis experience. *Clin Genet* 1996; **49**: 145–151.
- [6] BENNETT P, VAUGHAN J, HANDERSON D, LOUGHNA S, MOORE G. Association between confined placental trisomy, fetal uniparental disomy, and early intrauterine growth retardation. *Lancet* 1992; **340**: 1284–1285.
- [7] BISCHOFF FZ, NGUYEN DD, BURT KJ, SHAFFER LG. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence *in situ* hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1994; **66**: 237–243.
- [8] BOUÉ A, BOUÉ J. Cytogenetics of pregnancy wastage. *Advances in Human Genetics* Ed H. Harris, K. Hirschhorn (Plenum Publ Covp) 1985; 1–56.
- [9] BOURROUILLOU G, COLOMBIESP, DASTZGUE N. Chromosome studies in 2136 couples with spontaneous abortions. *Hum Genet* 1986; **74**: 399–401.
- [10] BRAEKELEER M, DAO TO. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; **6**: 245–250.
- [11] BRANDRIFF B, GORDON L, ASHWORTH L, WATCHMAKER G, MOORE DII, WYROBEK AJ, CARRANO AV. Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum Genet* 1985; **70**: 18–24.
- [12] BURNS JP, KODUNE PRK, ALONSO ML, CHAGANTI RSK. Analysis of meiotic segregation in a man heterozygous for two reciprocal translocations using the hamster *in vitro* penetration system. *Am J Hum Genet* 1986; **38**: 954–964.
- [13] CAMPANA M, SERRA A, NERI G. Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations. *Am J Genet* 1986; **24**: 341–356.

- [14] CAMPBELL SA, UHLMANN WR, DUQUETTE D, JOHNSON MP, EVANS MI. Pregnancy outcome when both members of a couple have balanced translocations. *Obstet Gynecol* 1995; **85**: 844–846.
- [15] CANS C, COHEN O, MERMET MA, DEMONGEOT J, JALBERT P. Human reciprocal translocations: is the unbalanced mode at birth predictable? *Hum Genet* 1993; **91**: 228–232.
- [16] CASNER KA, CHRISTOPHER CR, DYSERT GA. Spontaneous fetal loss after demonstration of a live fetus in the first trimester. *Obstet Gynecol* 1987; **70**: 827–830.
- [17] CHANDLEY AC. Meiotic studies and fertility in human translocation carriers. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 361–382.
- [18] COHEN O, CANS C, CUILLEL M, GILARDI JL, ROTH H, MERMET MA, JALBERT P, DEMONGEOT J. Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Hum Genet* 1996; **97**: 659–667.
- [19] COHEN O, SIMONET M, CANS CH, MERMET MA, DEMONGEOT J, AMBLARD F, JALBERT P. Human reciprocal translocations: a new computer system for genetic counselling. *Ann Genet* 1992; **35**: 4, 193–201.
- [20] DANIEL A. Structural differences in reciprocal translocations. *Hum Genet* 1979; **51**: 171–182.
- [21] DEBIEC-RYCHTER M, JAKUBOWSKI L, TRUSZCZAK B, MORUZGAŁA T, KAŁUŻEWSKI B. Two familial 9;17 translocations with variable effect on male carriers fertility'. *Fertil Steril* 1992; **57**: 933–935.
- [22] FLINT J, WILKIE AOM, BUCKLE VJ, WINTER RM, HOLLAND AJ, DERMID HE. The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nature Genetics* 1995; **9**: 132–140.
- [23] FRANCKE U. Digitized and differentially shaded human chromosome ideograms for genomic applications. *Cytogenet Cell Genet* 1994; **65**: 206–219.
- [24] FRYNS JP, KLECZKOWSKA A, KUBIEŃ E, VAN DEN BERGHE H. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage: The Leuven experience. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 453–470.
- [25] GOLDMAN ASH, HULTEN MA. Meiotic analysis by FISH of a human male 46,XY,t(15;20)(q11.2;q11.2) translocation heterozygote: quadrivalent configuration, orientation and first meiotic segregation. *Chromosoma* 1993; **102**: 102–111.
- [26] GOLDMAN ASH, HULTEN MA. Analysis of chiasma frequency and first meiotic segregation in a human male reciprocal translocation heterozygote, t(1;1)(p36.3;q13.1) using fluorescence *in situ* hybridisation. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 16–23.
- [27] GUAN XY, MELTZER PS, TRENT JM. Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* 1994; **22**: 101–107.
- [28] HAN TL, WEBB GC, FLAHERTY SP, CORRELL A, MATTHEWS CD, FORD JH. Detection of chromosome 17-bearing and X-bearing human spermatozoa using fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Reprod Dev* 1992; **33**: 189–194.
- [29] HANDYSIDE AH, PENKETH RJA, WINSTON RML, PATTINSON JDA, TUDDENHAM EGD. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; **1**: 347–349.
- [30] HANSMANN I, BOER P, SPEED RM. Aneuploidy-related delay of meiotic development in the mouse and the djungarian hamster. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 295–314.
- [31] HECHT F, HECHT BK. Fragile sites and chromosome breakpoints in constitutional rearrangements. *Clin Genet* 1984; **26**: 169–177.
- [32] HENDERSON J. Structure and function telomeres. *Cell* 1988; **80**: 286–290.
- [33] HERTIG AT, ROCK J, ADAMS EC. A description of 34 human ova within the first 17 days of development. *Am J Anat* 1956; **98**: 435–493.



- [34] HERTIG AT, ROCK J. Searching for early human ova. *Gynecol Invest* 1973; **4**: 121–139.
- [35] HOLMES JM, MARTIN RH. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1993; **91**: 20–24.
- [36] HOLMQUIST GP, DANCIS B. Telomere replication, kinetochore organizers, and satellite DNA evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 4566–4570.
- [37] ISCN. (1995). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (red.) Karger Basel: 1995.
- [38] JACOBS PA. Epidemiology of chromosome abnormalities in man. *Am J Epidemiol* 1977; **105**: 180.
- [39] JALBERT P, SELE B, JALBERT H. Reciprocal translocations: a way predict the mode of imbalanced segregation by pachytene-diagram drawing. *Hum Genet* 1980; **55**: 209–222.
- [40] JAMES RS, TEMPLE IK, PATCH C, THOMPSON EM, HASSOLD T, JACOBS PA. A systematic search for uniparental disomy in carriers of chromosome translocations. *Eur J Hum Genet* 1994; **2**: 83–85.
- [41] JAUCH A, DAUMER C, LICHTER P, MURKEN J, SCHROEDER-KURTH T, CREMER T. Chromosomal *in situ* suppression hybridization of human gonosomes and autosomes and its use in clinical cytogenetics. *Hum Genet* 1990; **85**: 145–150.
- [42] KALOUSEK DK, LANGLOIS S, BARRETT I, YAM I, WILSON DR, HOWARD-PEEBLES PN, JOHNSON MP, GIORGIUTTI E. Uniparental disomy for chromosome 16 in humans. *Am J Hum Genet* 1993; **52**: 8–16.
- [43] KODURU P, CHAGANTI R. Congenital chromosome breakage clusters within Giemsa - light bands and identified sites of chromatin instability. *Cytogenet Cell Genet* 1988; **49**: 269–274.
- [44] LEDBETTER DH, ZACHERY JM, SIMPSON JL, GOLBUS MS. Cytogenetic results from the U.S. collaborative study on CVS. *Prenatal Diagnosis* 1992; **12**: 317–345.
- [45] LICHTER P, TANG CJ, CALL K, HERMANSON G, EVANS GA, HOUSMAN D, WARD DC. High-resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science* 1990; **247**: 64–69.
- [46] LINDSTEN J, FRACCARO M, KLINGER HP, ZETTERQUIST P. Meiotic and mitotic studies of a familial reciprocal translocation between two autosomes of group 6–12. *Cytogenetics* 1965; **4**: 45.
- [47] MARTIN RH, RADEMAKER AW, HILDEBRAND K, LONG-SIMPSON L, PETERSON D, YAMAMOTO J. Variation in the frequency and type of sperm chromosomal abnormalities among normal men. *Hum Genet* 1987; **77**: 108–114.
- [48] MIDRO AT. Translokacje chromosomowe wzajemne jako czynnik ryzyka zaburzeń reprodukcji u człowieka. Praca habilitacyjna AM 1989: Białystok. Streszczenie *Gin Pol* 1989; **60**,3.
- [49] MIDRO AT. Poradnictwo genetyczne w przypadku nosicielstwa translokacji chromosomowych wzajemnych. *Wiad Lek* 1992; **XLV**: 19–20.
- [50] MIDRO AT, PANASIUK B, BIELECKI M, LEŚNIEWICZ R, WOŁCZYŃSKI S. Pierwotna niewydolność jajników w wyniku nosicielstwa translokacji chromosomowej t(X;8)(q27;q22.2). *Gin Pol Supl* 1991; **62**: 11–15.
- [51] MIDRO AT, STASIEWICZ-JAROCKA B, LEŚNIEWICZ R. Polska Kolekcja Translokacji Chromosomowych Wzajemnych. Biuletyn Komisji Genetyki Człowieka PAN. Nr. 4: 1996.
- [52] MIDRO AT, STENGEL-RUTKOWSKI S, KRAJEWSKA-WALASEK M, SZYMAŃSKA J, LASSOTA M, LEŚNIEWICZ R, JAWOROWSKA B. Different risks in two familial translocations t(9;12) with similar breakpoints. *Ann Genet* 1992; **35**: 1, 33–40.
- [53] MIDRO AT, STENGEL-RUTKOWSKI S, STENE J. Experiences with risk estimates for carriers of chromosomal reciprocal translocations. *Clin Genet* 1992; **41**: 113–122.

- [54] MIDRO AT, WIŚNIEWSKI L, KRAJEWSKA-WALASEK M, SZYMAŃSKA J. Rzyzko zaburzeń reprodukcji u nosicieli translokacji chromosomowych wzajemnych a sposób wykrycia nosicielstwa translokacji. *Gin Pol* 1989; **60**: 7–9.
- [55] MILLS JL, SIMPSON JL, DRISCOLL SG, JOVANOVIC-PETERSON L, VAN ALLEN M, AARONS JH, METZGER BE, BIEBER FR, KNOPP RH, HOLMES LB, PETERSON CM, WITHIAM-WILSON M, BROWN Z, OBER C, HARLEY E, MACPHERSON TA, DUCKLES A, MUELLER-HEUBACK E. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* 1988; **319**: 1617–1623.
- [56] MRÓZEK K, MRÓZEKE, NEDOSZYTKO B, BABIŃSKA M, GOŚCINIAK W, MIELNIK J, LIMON J. Badania cytogenetyczne w rodzinach z niepowodzeniami rozrodu. *Wiad Lek* 1989; **42**: 1014.
- [57] MULLER HJ. The remaking of chromosomes. *Collecting Net Woods Hole* 1939; **13**: 181–195.
- [58] NANCARROW JK, KREMER E, HOLMAN K, EYRE H, DOGGET NA, LE PASLIER D, CALLEN DA, SUTHERLAND GR, RICHARDS RI Implication of FRA 16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis. *Science* 1994; **264**: 1938–1941.
- [59] PARIS KONFERENCJE. Standardization in human cytogenetics. Birth Defects, Original Article Series, Vol VIII No 7 New York: The National Foundation 1971, oraz w *Cytogenetics* 1972; **11**: 13–362.
- [60] PARK VM, GUSTASHAW KM, WANTHEN T. The presence of interstitial telomeric sequences in constitutional chromosome abnormalities. *Am J Hum Genet* 1992; **50**: 914–923.
- [61] PETERSEN MB. Nondisjunction studies in trisomies 21 and 18. (w) Stengel-Rutkowski S (red.) Early Prenatal Diagnostics. Hamburg: Verlag Dr Kovac 1995: 161–171.
- [62] PETROSKY DL, BORGAONKAR DS. Segregation analysis in reciprocal translocation carriers. *Am J Med Gen* 1984; **19**: 137–159.
- [63] PINKEL D, LANDEGENET J, COLLINS C, FUSCOE J, SEGRAVES R, LUCAS J, GRAY JW. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome – specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9138–9142.
- [64] ROSENBERG C, BLAKEMORE KJ, KEARNS WG, GIRALDEZ RA, ESCALLON CS, PEARSON PL, STETTEN G. Analysis of reciprocal translocations by chromosome painting: Applications and limitations of the technique. *Am J Genet* 1992; **50**: 700–705.
- [65] ROUSSEAU S, CHEVRET E, MONTEIL M, COZZI J, PELLETIER R, DEVILLARD F, LESPINASSE J, SELE B. Meiotic segregation in males heterozygote for reciprocal translocations: analysis of sperm nuclei by and three colour fluorescence *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **71**: 240–246.
- [66] RUDAK E, JACOBS PA, YANAGIMACHI R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978; **274**: 911–913.
- [67] RUDAK E, DOR J, MASHIACH S, NEBEL L, GOLDMAN B. Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilized *in vitro*. *Fertil Steril* 1984; **41**: 538–545.
- [68] RYBAŁKO A, MIDRO AT, UŚNISKIENÉ R, STASIEWICZ-JAROCKA B, SOROKINA J, KRARCENKIENE J, UTKUS A, SINKUS A, KUCINKAS V. Litewska Kolekcja Translokacji Chromosomowych Wzajemnych. *Gin Pol* 1996; **64**: supl. 5.
- [69] SARTO GE, THERMAN E, PATAU K. X inactivation in man : A woman with t(Xq;12q+). *Am J Hum Genet* 1973; **25**: 262–270.
- [70] SAWICKA A, LEŚNIEWICZ R. Rodzinne występowanie złożonej translokacji t(1;4;10)(q21;q27;q26.3). *J Applied Genet* 1996; **37B**: 47–48.
- [71] SCHINZEL A. Catalogue of Unbalanced Chromosome Aberrations in Man. Berlin-New York: Walter de Gruyter 1984.

- [72] SCHINZEL A. Phenotype in autosomal chromosome aberrations: distinctiveness, variability, and karyotype correlations. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 725–738.
- [73] SCHMIDT M, DU SART D. Functional Disomies of the X Chromosome Influence the Cell Selection and Hence the X Inactivation Pattern in Females With Balanced X-Autosome Translocations: A Review of 122 Cases. *Am J Med Genet* 1992; **42**: 161–169.
- [74] SEARLE JB. Selection and robertsonian variation in nature: the case of the common shrew. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 507–531.
- [75] SHERMAN SL, TAKAESU N, FREEMAN SB, GRANTHAM M, PHILLIPS C, BLACKSTON RD, JACOBS PA, COCKWELLA E, FREEMAN V, UCHITA I, MIKKELSEN M, KURNIT DM, BURACZYŃSKA M, KEATS BJB, HASSOLD TJ. Trisomy 21: Association between reduced recombination and nondisjunction. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 608–620.
- [76] SIMPSON JL. Incidence and timing of pregnancy losses: relevance to evaluating safety of early prenatal diagnosis. *Am J Med Genet* 1990; **35**: 165–173.
- [77] SPEED RM. Heterologous pairing and fertility in humans. (w) Gillies CB (red.) *Fertility and chromsome pairing: recent studies in plants and animals*. CRC, Boca Raton, FL, 1989: 2–35.
- [78] SPELEMAN F, VAN ROY N, WIEGANT J, VERSCHRAEGEN-SPAE MR, BENOIT Y, GOVAERT P, GOOSSENS L, LEROY JG. Detection of subtle reciprocal translocations by fluorescence *in situ* hybridization. *Clin Genet* 1992; **41**: 169–174.
- [79] STASIEWICZ-JAROCKA B, MIDRO AT, STENGEL-RUTKOWSKI S. Analiza częstości występowania niezrównoważonego kariotypu u potomstwa nosicieli poszczególnych translokacji chromosomowych. *J Applied Genet* 1996; **37b**: 47–48.
- [80] STENE J. Analysis of segregation patterns between sibships within families ascertained in different ways. *Ann Hum Genet* 1970; **33**: 261–283.
- [81] STENE J. Comment on estimations of risks to translocation carriers. Invited editorial. *Am J Med Genet* 1989; **33**: 54–59.
- [82] STENE J, STENGEL-RUTKOWSKI S. Genetic risks of familial reciprocal and robertsonian translocation carriers. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 1–54.
- [83] STENGEL-RUTKOWSKI S. Risk estimates in reciprocal translocations. Experience obtained from the 1<sup>st</sup> trimester CVS data. (w) Stengel-Rutkowski S (red.) *Early Prenatal Diagnostics*. Hamburg: Verlag Dr Kovac 1995: 187–194.
- [84] STENGEL-RUTKOWSKI S, LINSE B, BRANDMOIER R, HANSEN-KUBE H. Prenatal diagnostic of genetic defects of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Munchen: Springer-Verlag 1992.
- [85] STENGEL-RUTKOWSKI S, STENE J, GALLANO P. Risk estimates in balanced parental reciprocal translocations. Monographie des Annales de Genetique, Expansion Scientifique Francaise 1988.
- [86] SUTHERLAND GR. Chromosome rearrangements in pediatric autopsies. (w) Daniel A (red.) *The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. New York: Alan Liss Inc. 1988: 471–478.
- [87] TAI JJ, HOU CD, WANG-WUU S, WANG CH, LEU SY, WUU KD. A method for testing the nonrandomness of chromosomal breakpoints. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 147–150.
- [88] TAZI J, BIRD CD. Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* 1990: 909–920.
- [89] TOMMERUP N. Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet* 1993; **30**: 713–727.
- [90] TRASK B. Fluorescence *in situ* hybridization: Applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* 1990; **7**: 149–154.
- [91] TUPLER R, BARBIERATO L, LARIZZA D, SAMPAOLO P, PIOVELLA F, MARASCHIO P. Balanced autosomal translocations and ovarian dysgenesis. *Hum Genet* 1994; **94**: 171–176.

- [92] WANG J-CHC, PASSAGE MB, YEN PH, SHAPIRO LJ, MOHANDAS TK. Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet* 1991; **48**: 1069–1074.
- [93] WARBURTON D. *De novo* balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet* 1991; **49**: 995–1013.
- [94] WHO. Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1977; **56**: 247–253.
- [95] WIEGANT J, KALLE W, MULLENDERS L, BROOKES S, HOOVERS JM, DAUWERESE JG, VAN OMMEN GJ, RAAP AK. High resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 587–591.
- [96] WIEGANT J, WIESMEIJER CC, HOOVERS JMN, SCHUURING E, d'AZZO A, VROLIJK J, TANKE HJ, RAAP AK. Multiple and sensitive fluorescence *in situ* hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet Cell Genet* 1993; **63**: 73–76.
- [97] WILLIAMS BJ, BALLENGER CA, MALTER HE, BISHOP F, TUCKER M, ZWINGMAN TA, HASSOLD TJ Nondisjunction in human sperm – results of fluorescence *in situ* hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1929–1936.
- [98] YUNIS JJ, SORENG AL, BOWE AE. Fragile sites are targets of diverse mutagens and carcinogens. *Oncogene* 1987; **1**: 59–69.

Redaktor prowadzący: Maciej Zabel.

Otrzymano 30.12.1996 r.

Przyjęto: 17.03.1997 r.

Adres autora: 15-230 Białystok, ul. Waszyngtona 13

## NISKOCZĄSTECZKOWE JĄDERKOWE RNA (snoRNA); WŁAŚCIWOŚCI I FUNKCJE

### SMALL NUCLEOLAR RNAs (snoRNAs); PROPERTIES AND FUNCTIONS

Zofia KILIAŃSKA, Piotr SZYMCZYK

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

**Streszczenie:** Przegląd stanowi podsumowanie głównych osiągnięć dokonanych w charakteryzowaniu podklasy RNA, która występuje w jąderkach *Eukaryota*, tj. niskocząsteczkowych jąderkowych RNA (snoRNA). Populacja RNA stanowi niejednorodną pod względem długości cząsteczek, motywów strukturalnych i oddziaływań z białkami grupę związków, a ta odrębność wynika z faktu różnych funkcji przez nie pełnionych oraz odmiennych szlaków ich syntezy. Obecnie przyjmuje się, że niektóre cząsteczki snoRNA są kodowane przez niezależne geny, a znaczna ich część jest kodowana przez introny w genach białek; ta ostatnia grupa powstaje przez obróbkę pierwotnych transkryptów mRNA. Liczne badania wskazują, że kilka rodzajów snoRNA jest wykorzystywanych w obróbce rybosomalnego RNA, choć dokładna ich rola pozostaje do wyjaśnienia. W artykule przedstawiono ponadto postulowane funkcje snoRNA w zwijaniu pre-rRNA, modyfikacji nukleotydów, katalizie cięć RNA i w niektórych przypadkach ich działanie jako molekularnych przyzwoitek.

**Słowa kluczowe:** niskocząsteczkowe jąderkowe RNA, antysensowne snoRNA, obróbka snoRNA, obróbka pre-rRNA.

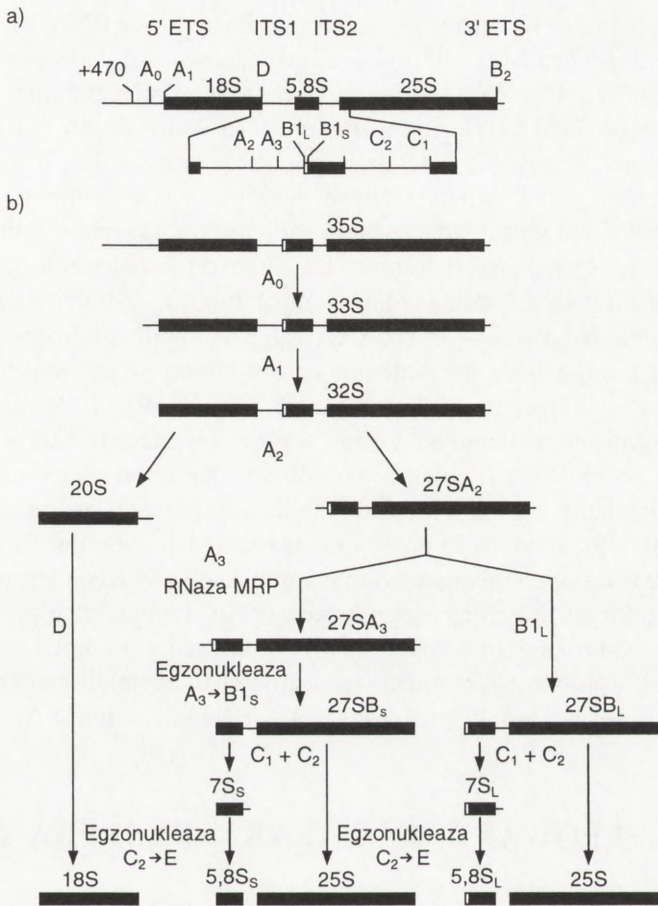
**Summary:** The review summarizes main progress made in characterizing the subclass of RNA which resides in eukaryotic nucleoli, i.e., small nucleolar RNAs (snoRNAs). snoRNA populations are heterogeneous in size, structural motifs, and protein associations, and this diversity is consistent with the fact that they play different functions and are produced by diverse pathway. At present is accepted that some of snoRNAs are encoded by independent genes and many of them within introns of protein genes; the latter group is generated by processing of pre-mRNA transcripts. Numerous studies have shown that several snoRNA are needed for processing of ribosomal RNA however precise role remain to be determined. The article presents also snoRNAs postulated functions in pre-rRNA folding, nucleotide modifications, catalyzing RNA cleavage and in some cases acting as RNA chaperones.

**Key words:** small nucleolar RNA, antisense snoRNA, snoRNA processing, pre-rRNA processing.

## 1. WSTĘP

Jąderka komórek eukariotycznych są miejscem transkrypcji, dojrzewania pre-rybosomalnych RNA (pre-rRNA) oraz powstawania rybosomów [23, 27, 61, 62, 86, 102]. Na obszarze tej struktury przebiega z udziałem polimerazy RNA klasy I transkrypcja trzech rodzajów rRNA, tj. 17–18S, 5,8S i 25–28S z tandemowo powtórzonych jednostek transkrypcyjnych (50-10 000 indywidualnych kopii w haploidalnym genomie), przedzielonych naprzemiennie sekwencjami nietranskrybowanymi (ang. *Intergenic Spacers*; IGS) [29, 30, 42, 88]. U kręgowców jednostki transkrypcyjne osiągają długość około 14 kpz, zaś oddzielające je odcinki około 30 kpz [71]. Geny kodujące rRNA gromadzą się zwykle w jednym lub kilku chromosomach w obszarach określanych organizatorami jąderka (ang. *Nucleolus Organizers*; NORs). U człowieka zlokalizowano je w krótkich ramionach chromosomów akrocentrycznych, pary 13., 14., 15., 21. i 22. [30].

Produkt transkrypcji polimerazy RNA I stanowi prekursorowa forma rRNA, z której trzy dojrzałe cząsteczki rRNA uwalniają się spośród zespołu specyficznych gatunkowo sekwencji nietranskrybowanych zewnętrznych przy 5' i 3' końcach transkryptu (ang. *External Transcribed Spacers*; 5' i 3'ETS lub ETS1 i ETS2) oraz wewnętrznych (ang. *Internal Transcribed Spacers*), oznakowanych symbolami ITS1 i ITS2 w wyniku serii cięć endo- i egz nukleolitycznych [48, 93, 100]. Proces ten zwany obróbką bądź dojrzewaniem pre-rRNA (ang. *processing, maturation*), szeroko badany w wielu organizmach (m.in. *Tetrahymena*, *Xenopus laevis*, mysz, człowiek) został najlepiej poznany w przypadku drożdży – *Saccharomyces cerevisiae* (rys. 1), co stało się ostatnio możliwe dzięki wykryciu mechanizmu działania RNazy MRP (ang. *Mitochondrial RNA Processing*; [27, 61, 77, 85, 93, 100]). Obróbka pierwotnego transkryptu *S. cerevisiae*, przepisanego z rDNA o długości 9,1 kpz rozpoczyna się usunięciem dużego segmentu 3'ETS przez endonukleolityczne cięcie przy pozycjach 45.–50. i 15. od 3' końca 25S rRNA [36]. Powstający produkt z 10-nukleotydowym odcinkiem 3'ETS, praktycznie niewykrywalny *in vivo*, podlega obróbce przy jego 5'końcu w wyniku kolejnych ataków nukleolitycznych w miejscach  $A_0$  i  $A_1$ , odcinających 5'ETS oraz  $A_2$  – w obszarze ITS1, dostarczając cząsteczki 20S pre-rRNA, z której w wyniku kolejnego endonukleolitycznego ataku w miejscu D tworzy się 18S rRNA [101]. Z kolei produkt pośredni – 27SA<sub>2</sub> pre-rRNA podlega dalszej obróbce prowadzącej do 5,8S i 25S rRNA [31] przez dwie alternatywne drogi ataku w regionie ITS1. W jednej z nich, uważanej za główną, dochodzi do cięcia ITS1 w miejscu  $A_3$  przez wspomnianą RNazę MRP [31, 53, 55, 80], po którym następuje szybka egz nukleolityczna degradacja (5'→3') w miejscu B1<sub>S</sub> i tworzy się produkt pośredni 27SB<sub>S</sub> pre-rRNA. Okazało się, że zaledwie około 15% pre-rRNA ulega cięciu w miejscu B1<sub>L</sub> generując prekursorową cząsteczkę 27SB<sub>L</sub>. Obydwie formy 27SB pre-rRNA dojrzewają przez atak nukleolityczny w



Rys. 1. Schemat genetycznej organizacji rDNA (a) i obróbki 35S pre-rRNA (b) w komórkach drożdży *S. cerevisiae* (wg [99] za zgodą Autora), regiony kodujące 18S i 25S rRNA zaznaczono pogrubionymi liniami, pozostałe objaśnienia w tekście

C<sub>1</sub> i C<sub>2</sub> segmentu ITS2, co przyczynia się do uwolnienia dojrzałych cząsteczek, tj. 25S rRNA i 5,8S rRNA (główniej 5,8S<sub>S</sub>). Podczas tego procesu część nukleotydów ulega metylacji, a niektóre urydylowe są przekształcane w pseudourydyłowe [24, 56].

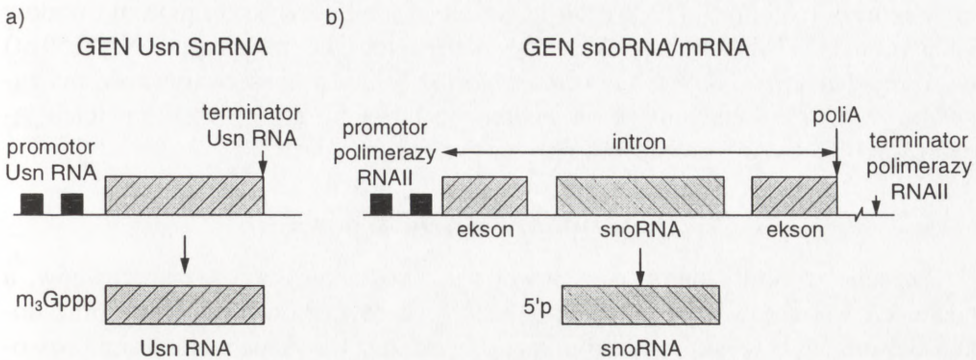
Drogi obróbki pre-rRNA wyższych *Eukaryota* są ogólnie zbliżone do procesu opisywanego u drożdży [22, 100, 104], choć występują pewne różnice gatunkowo-specyficzne dotyczące długości pośrednich cząsteczek prekursorowych oraz kolejności, w której są one formowane. Alternatywne szlaki przemian pre-rRNA obserwuje się nawet w obrębie tych samych komórek organizmu w zależności od warunków ich wzrostu czy stadium różnicowania [23].

Liczne wyniki badań wykazały, że zarówno w przemianach RNA, jak i w tworzeniu rybosomów uczestniczą bogatourydylowe, niskocząsteczkowe jądrowe RNA (ang. *U small nuclear RNA*; U snRNA) wraz ze związanymi z nimi białkami w kompleksach – snRNP [5, 11, 27, 61, 100], które modulują strukturę drugo- i trzeciorzędową pierwotnych transkryptów RNA. Bogata populacja snRNA jest dzielona na dwie klasy na podstawie ich wewnątrzjądrowej lokalizacji oraz pełnionej roli. Pozajądrowe snRNA dokonują składowania (ang. *splicing*) transkryptów syntetyzowanych przez polimerazę RNA klasy II [60, 66, 82, 89, 105] w nukleoplazmie w rybonukleoproteinowych kompleksach – spliceosomach [60, 87]. Z kolei dla grupy snRNA występujących w jąderkach – U snoRNA (ang. *U small nucleolar RNA*), skompleksowanych z odpowiednimi białkami udowodniono udział w szlaku przemian pre-rRNA oraz w biogenezie rybosomów [5, 26, 61, 91, 100]. Zespół zdarzeń związanych z tymi przemianami odbywa się w procesosomach [27, 69] – kompleksach zbudowanych ze snoRNA i białek w sposób wysoce uporządkowany, który musi zakładać mechanizmy regulacji nieodzowne dla koordynacji nadmiaru rybosomów ze zmianami fizjologicznymi komórek oraz w czasie ich rozwoju. Aktualnie odnosi się wrażenie, że szlak przemian pierwotnych transkryptów rRNA jest nawet bardziej złożony niż prekursorowych cząsteczek pre-mRNA, ponieważ te pierwsze ulegają intensywnym modyfikacjom nukleotydów i organizacji w kompleksy rybosomalne [16, 23, 24, 42, 67]. Niniejsze opracowanie przybliży czytelnikowi składniki uczestniczące w procesie obróbki prekursorowych rRNA, tj. snoRNA.

## 2. WYSTĘPOWANIE I CHARAKTERYSTYKA snoRNA

Bogata klasa niskocząsteczkowych jąderkowych RNA licząca ponad 100 przedstawicieli poznanych u kręgowców i drożdży stanowi niejednorodne pod względem długości nukleotydów (nt) (60–280 nt u wyższych *Eukaryota*; 80–605 nt u *S. cerevisiae*), motywów strukturalnych, a także oddziaływań z białkami cząsteczek RNA, co wynika zapewne z odmiennej drogi ich biosyntezy oraz funkcji [5, 27, 40, 61, 91]. Najliczniej występujące w komórkach U3, U8 i U13 ( $10^4$ – $2 \times 10^5$  kopii w komórce), a także w niektórych organizmach U14 ( $2 \times 10^4$  kopii w komórce) są produktami niezależnych genów [61, 94]. Natomiast liczna grupa obejmująca U14-U61 i przypuszczalnie E2 i E3 snoRNA reprezentuje cząsteczki, dla których informacja genetyczna zawarta jest w intronach genów kodujących białka jąderkowe, rybosomalne lub białka czasowo odnajdowane w jąderkach np. hsc70. Powyższe snoRNA są syntetyzowane przez polimerazę RNA klasy II [2, 27, 65, 83]. W jąderku występuje bardzo interesujący przykład snoRNA, który wykryto również w mitochondriach – 7-2 MRP, syntetyzowany przez polimerazę RNA III. Ten





Rys. 2. Podklasy niskocząsteczkowych jąderkowych U RNA syntetyzowane przez polimerazę RNA II (wg [39] zmodyfikowany)

snoRNA wykazuje znaczną homologię z RNA wchodzącym w skład RNazy P [17, 37, 53-55, 80, 96, 106].

Analiza sekwencji jąderkowych RNA wykazała, że przy 5' końcu ich łańcuchów istnieje pewna odmienność. Transkrybowane przez polimerazę RNA II snoRNA, podobnie jak nukleoplazmatyczne snRNA przepisane z niezależnych genów wykorzystują indywidualne U-sekwencje promotorowe. Ich 5' zakończenie (z wyjątkiem U6 snRNA), tzw. czapeczkę (ang. *cap*) stanowi 2,2,7-trimetyloguanozyna (TMG) [1, 59, 61, 85]. Z kolei cząsteczki snoRNA pochodzące z intronów genów białek są zakończone – monofosfonukleotydem (rys. 2). Natomiast unikatowy 7–2 MRP RNA jest wyposażony na jego 5' końcu w trifosfonukleotyd [106].

"Czapeczkę" roślinnych U3 stanowi monometylofosfonukleotyd i ten snoRNA syntetyzuje polimeraza RNA III [84]. Na 3' końcu zidentyfikowanych dotychczas jąderkowych RNA występuje grupa hydroksylowa. W obrębie łańcuchów jąderkowych RNA dochodzi do modyfikacji zasad azotowych i reszt cukrowych. Nieliczne jak dotąd badania dotyczą metylacji reszt cukrowych bądź pseudourydylacji opisanych w U3 i U8 szczura i niektórych snoRNA drożdży [61]. Aktualnie poznano sekwencję nukleotydomową większości snoRNA [40, 65, 86]. Wiele z nich jest bezpośrednio zaangażowanych w obróbkę pre-rRNA, w modyfikacje prekursorowych transkryptów, tworzenie rybosomów, choć nie wyklucza się z uwagi na ich znaczną liczebność w jąderkach funkcji dotychczas jeszcze nie określonych [5, 62]. W przypadku drożdży *S. cerevisiae*, zapewne najczęściej badanego organizmu w zakresie metabolizmu RNA, trzy rodzaje snoRNA, tj. U3, U14 i snoR30 są niezbędne dla ich żywotności, podczas gdy delekcja genu kodującego snoR10 osłabia ich wzrost [6, 60, 107].

Dla dobrze scharakteryzowanych snoRNA U3, U8, U14 i 7–2 MRP wykazano znaczną konserwatywność sekwencji między homologicznymi cząsteczkami kręgowców i drożdży, a trzy z nich, tj. U3, U14 i 7–2 MRP mają odpowiedniki w

organizmach roślinnych [12, 61, 84]. Okazało się, że U3 wykryto m.in. u owadów i pierwotniaków [61]. Ostatnio ukazało się doniesienie o U3-podobnym RNA (159 nt) u *Archaeobacteria* – *Sulfolobus acidocaldarius* [72]. Ta konserwatywność ma zapewne znaczenie funkcjonalne, udowodnione udziałem części przedstawicieli jąderkowych RNA w obróbce pre-rRNA (por. rozdz. 3).

## 2.1. Struktura drugorzędowa

Poznanie struktury pierwszorzędowej wielu rodzajów snoRNA kręgowców, a także ich wariantów wydzielonych z bezkręgowców, głównie drożdży oraz doświadczenia wykorzystujące modyfikacje chemiczne, trawienie nukleazami pozwoliło stworzyć modele ich struktury drugorzędowej [6, 15, 35, 58, 91, 95; por. rys. 3].

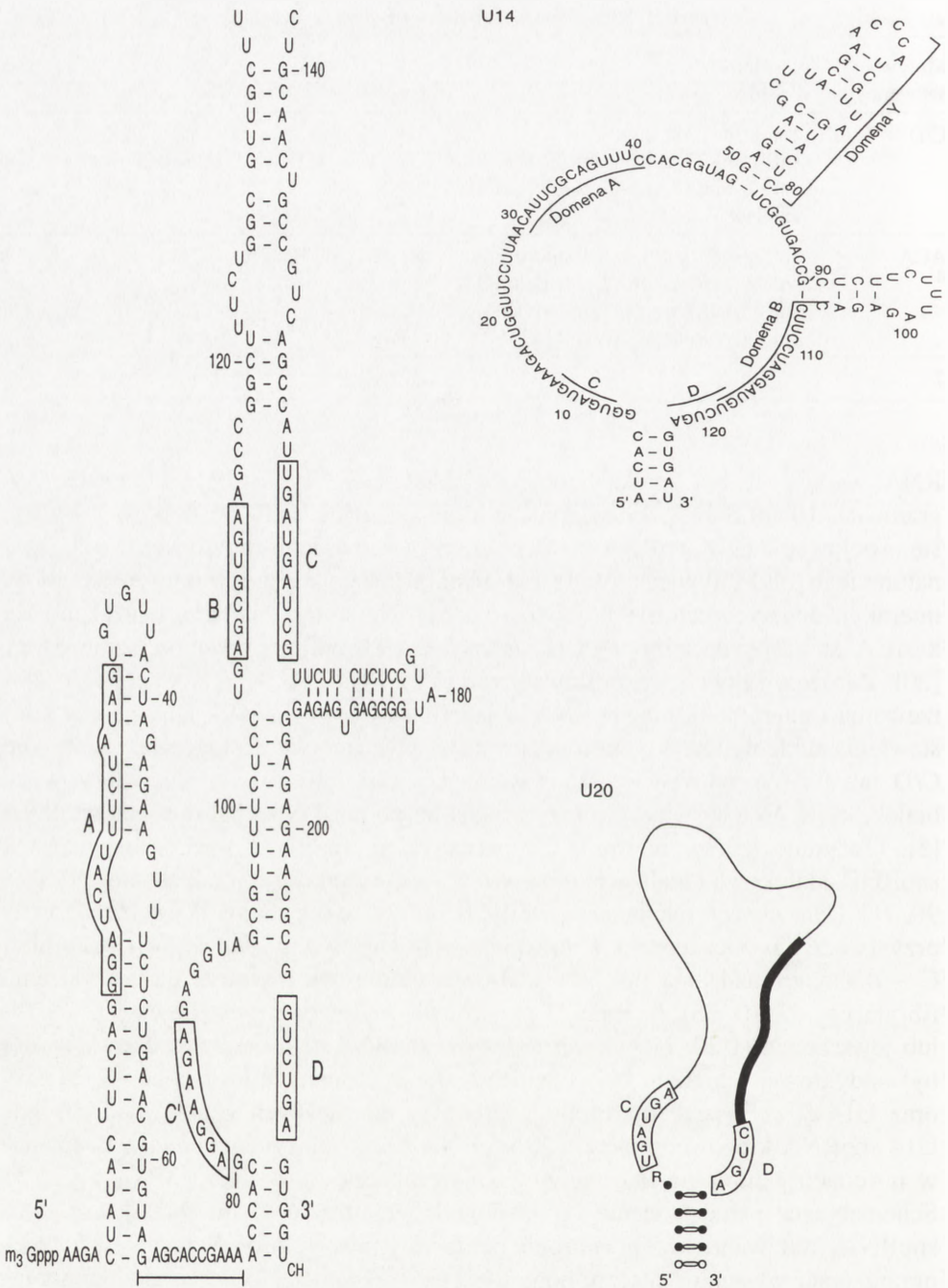
Z dotychczasowych badań strukturalnych snoRNA rysuje się pewien schemat ich budowy obejmujący kilka sekwencji, a także motywów struktury drugorzędowej o wysokim stopniu konserwatywności. Najwięcej danych o strukturze pierwszej i drugorzędowej dotyczy U3 i U14 snoRNA [35, 47, 58, 61, 91]. Większość cząsteczek snoRNA zawiera dwa z pięciu konserwatywnych motywów sekwencji (ang. *boxes*) opisanych pierwotnie w U3 [49, 94], tj. A, B, C, C' i D, wśród których wykryto znaczną komplementarność z odcinkami w rRNA (rys. 3). Żaden z wymienionych motywów strukturalnych nie jest uniwersalny, ale istnieje znaczna homologia w ich obrębie odnotowana przy analizach porównawczych snoRNA różnego pochodzenia. Motywy A i B są unikatowe dla U3 snoRNA. Uważa się je za odpowiedzialne za interakcje z rRNA [6, 68].

Doświadczenia wykorzystujące mutacje w obrębie motywów C, C' i D wiążą ich obecność z syntezą snoRNA i oddziaływaniami z białkami [9, 90, 91]. Zmiany sekwencji w odcinku C U3 snoRNA człowieka wpływają na jego zdolności interakcji z fibrylaryną [9, 10]. Strukturalne elementy C (RUGAUGA) i D (CUGA) obecne u większości snoRNA kręgowców i drożdży, a także występowanie konserwatywnej sekwencji trinukleotydydowej ACA przy 3' końcu łańcuchów części jąderkowych RNA stały się podstawą do ich podziału (tab. 1). W tym schemacie nie mieści się unikatowy 7–2 MRP RNA, którego budowa zostanie omówiona w rozdz. 3.5. W opinii laboratorium Fourniera [5] podział na podklasy C/D i ACA snoRNA wynika z odrębności pełnionych przez nie funkcji, innego szlaku ich biosyntezy bądź odmiennego pochodzenia ewolucyjnego. Stwierdzono, że podklasa C/D snoRNA, spośród której niektórzy członkowie uczestniczą w obróbce i metylacji pre-rRNA oraz biogenezie rybosomów, a także oddziałują na zasadzie komplementarności nukleotydydów na stosunkowo długich odcinkach (do 21 nt) z transkryptami polimerazy RNA I [3, 15, 40, 61]. Z kolei w obrębie niektórych ACA snoRNA odnotowano komplementarność z rRNA, choć ogranicza się ona do krótszych odcinków (< 12 nukleotydydów) [18]. Ponadto istotnym składnikiem różnicującym te dwie podklasy

Tabela 1. Klasyfikacja snoRNA wg Balakina i wsp. [5]

Motywy sekwencyjne	snoRNA	
	drożdże	kręgowce
C/D	U3, U14, U18, U24 snR4, snR13, snR38, snR39, snR39b snR40, snR41, snR45, snR47, snR48 snR190	U3, U8, U13, U14, U15, U16, U18, U20, U21, U22, U24, U25–U61
ACA	snR3, snR5, snR8, snR9, snR10, snR11 snR30, snR31, snR32, snR33, snR34 snR35, snR36, snR37, snR42, snR43 snR44, snR46, snR49, snR189	U17/E1, E2, E3, U19, U23
?	7–2 MRP	7–2 MRP

RNA wydają się być białka budujące cząstki snoRNP o stałej sedymentacji w granicach 10–90 S [27]. Fibrylaryna, ilościowo bogate białko jąderkowe, wydaje się asocjować z C/D snoRNA zarówno u kręgowców, jak i drożdży [61, 65], choć natura tego oddziaływania wciąż nie została poznana i nie wyklucza się w tej interakcji dodatkowych białek [5, 51, 52, 61]. Natomiast białkami wiążącymi się z ACA snoRNA drożdży wydają się być GAR1 [52] i prawdopodobnie SSB1 [20]. Zarówno sekwencje konserwatywne C i D, jak i ACA są potrzebne do dojrzewania i nagromadzenia snoRNA w jąderkach [5, 33, 61, 69]. Delecje czy podstawienia nukleotydów w tych strategicznie ważnych motywach sugerują, że zarówno C/D jak i ACA sekwencje stanowią miejsca docelowego wiązania kluczowych białek, które po ich związaniu przyzwalają na potranskrypcyjną obróbkę snoRNA [5]. Obejmuje ona dojrzewanie i hipermetylację snoRNA, formowanie cząstek snoRNP, jąderkową lokalizację oraz właściwości i funkcje dojrzałych snoRNP [69, 90, 91]. Dane eksperymentalne ujawniły, że motyw sekwencyjny D jest nieodzowny przy tworzeniu 5 czapeczki w przypadku U3 snoRNA *X. laevis* [70], natomiast C – dla nagromadzenia np. U14 u drożdży; odgrywa również rolę w wiązaniu fibrylaryny [9, 10, 33]. Rysunek 3 przedstawia budowę drugorzędową (U3 i U14) lub jej schemat (U20) niektórych rodzajów snoRNA. Ich nieprzypadkowy wybór był podyktowany faktem, iż U3 snoRNA dotąd zbadanych kręgowców i drożdży oraz U14 *S. cerevisiae* reprezentują produkty niezależnych genów, podczas gdy U14 snoRNA kręgowców oraz U20 snoRNA badanych organizmów są kodowane w intronach genów białek i nie zawierają czapeczki w postaci TMG (rys. 2, 3). Schematyczne przedstawienie prawdopodobnej struktury drugorzędowej U20 snoRNA, kodowanego w 11. intronie nukleoliny myszy, kury, *X. laevis*, w których organizmach występuje znaczna homologia jego sekwencji [15] jest prawdopodobnie typowa dla szeregu tzw. antysensownych snoRNA, m.in. U14 myszy, U21 i U24 człowieka [3, 15]. W przypadku wymienionych RNA występuje charakterystyczna



Rys. 3. Proponowana struktura drugorzędowa U3 człowieka, U14 *S. cerevisiae* i U20 myszy, kompilacja danych [15,47,58], na rysunku zaznaczono konserwatywne motywy i domeny strukturalne

tw. końcowa struktura 5'-3' pnia (ang. *stem*), która stanowi jednocześnie *cis*-aktywny sygnał w procesie ich obróbki. Tworzy się ona wskutek parowania nukleotydów 5' i 3' końców cząsteczki, wymuszając zbliżenie funkcjonalnie czynnych motywów C i D. Na podkreślenie zasługuje, że w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji D przylega zwykle długi odcinek sekwencji komplementarnych do rRNA, a po stronie 5' sekwencji C występuje zawsze nukleotyd purynowy [15, 16] (rys. 3). Organizacja struktury motywów C i D w snoRNA zawierających dość długie odcinki antysensowne do pre-rRNA sugeruje występowanie wśród nich dwóch grup [2], tj. 1<sup>o</sup> ze strukturą 5'-3' pnia (m.in. U14, U20, U21, U24 kręgowców i snR41 drożdży), 2<sup>o</sup> pozbawionej struktury 5'-3' pnia, natomiast wyposażonej w dwa nukleotydy po 3' stronie motywu D (m.in. U13 i U18 człowieka oraz snR38, snR39 i snR40 drożdży). Wyniki symulacji komputerowej wskazują ponadto, że przedstawiciele podklasy ACA charakteryzuje bardziej zwarta struktura drugorzędowa, co zdemonstrowano w przypadku snR11 drożdży [5], U19 snoRNA kręgowców [39]. Z kolei U14 snoRNA przynależące do podklasy C/D cechuje bardziej otwarta struktura [4].

## 2.2. snoRNA kodowane w intronach genów białek (antysensowne snoRNA)

Synteza snoRNA tej grupy zachodzi podczas transkrypcji genów macierzystych przez polimerazę RNA II. W trakcie tego procesu odcinki odpowiadające U cząsteczkom są wycinane z intronów pre-mRNA (rys. 2 i 4; podrozdz. 2.3). Geny pierwotne mogą kodować w sąsiadujących intronach różne snoRNA [65], bądź jeden lub kilka wariantów jednego rodzaju. Bliższa charakterystyka antysensownych wariantów snoRNA z różnych organizmów ujawniła, że mogą one być kodowane w intronach odmiennych genów, a także liczba kodujących je intronów w genach białkowych oraz ich lokalizacja może ulec zmianom (por. tab. 2).

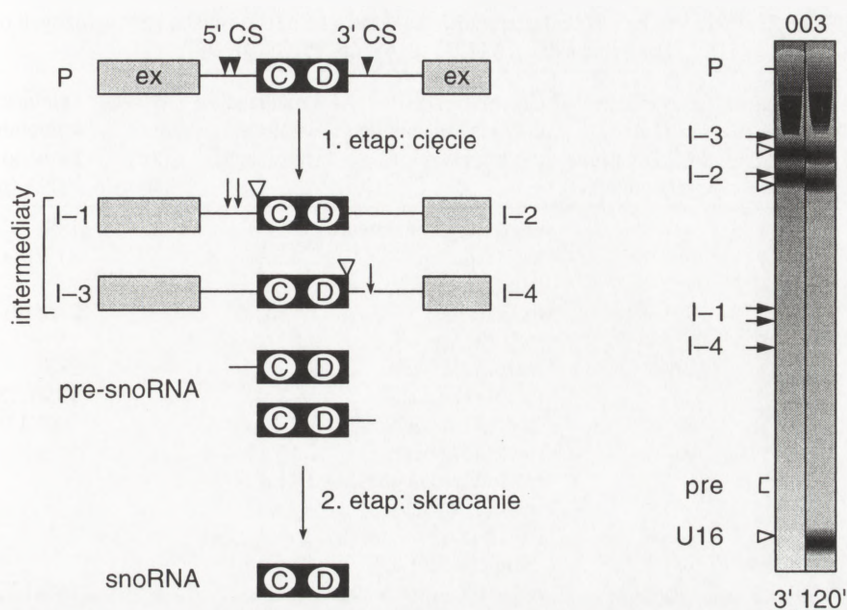
Większość tak powstałych U snoRNA cechuje obecność odcinków (jednego lub dwóch o długości 10–21 nt) komplementarnie oddziałujących z domenami o silnie konserwatywnej strukturze drugorzędowej, tj. regionem rdzeniowym (ang. *core region*) 18S i 25/28S rRNA [2, 75, 86, 98]. Odcinki zdolne do parowania z transkryptami polimerazy I w obrębie opisywanych snoRNA, które nazywa się również antysensownymi [2], usytuowane są w bezpośrednim sąsiedztwie ich 5' (motyw C lub D') lub 3' zakończeń (motyw D) cząsteczek [98]. Z analiz termodynamicznych wynika, że oddziaływanie snoRNA – pre-rRNA są trwalsze niż wewnątrzcząsteczkowe interakcje rRNA – rRNA bądź snRNA – pre-mRNA [2].

"Intronowe" pochodzenie dużej grupy jąderkowych RNA przypisuje się doświadczeniom Liu i Maxwella [49], którzy w 1990 r. donieśli o odrębnej drodze powstawania U14 snoRNA z intronów białka szoku cieplnego hsc70 myszy, bez wykorzystania typowych U RNA promotorów. Wnikliwe śledzenie prac o RNA

bez charakterystycznej "czapeczki", kodowanych przez introny genów białka rybosomów L1 *X. laevis* ujawnia ich nieco wcześniejsze wykrycie [13]. Łatwy model doświadczalny, jakim są jądra komórkowe oocytów *X. laevis*, w których po iniekcji prekursorowych transkryptów zachowuje się zdolność precyzyjnego wycinania intronów z egzogennych pre-mRNA hsc 70 [45], białek rybosomalnych S3 [96] i L1 [28] oraz białka RCC1 [38], udowodnił unikatowe pochodzenie odpowiednio U14, U15, U16 i U17 snoRNA. W kolejnych latach nastąpiło gwałtowne zwiększenie zainteresowania antysensownymi snoRNA [2, 40, 65, 75, 98]. W tabeli 2 krótko przedstawiono charakterystykę tych związków do U40 włącznie. Nie ujęto w niej wykrytych ostatnio [40] 21 przedstawicieli snoRNA, dla których nie zostały jeszcze w pełni określone geny, w których intronach zakodowana jest ich informacja genetyczna. Te antysensowne U41–U61, opisane przez Kiss-Laszlo i wsp. [40] należą do podklasy C/D snoRNA (por. tab. 1).

### 2.2.1. Metylacja snoRNA

Wnikliwa analiza odcinków komplementarnych do pre-rRNA wśród nowoodkrytych oraz wcześniej uznanych za antysensowne snoRNA zasugerowała związek między tymi oddziaływaniami a metylacją transkryptów polimerazy RNA I. Oszacowano, że w dojrzałych formach rRNA kręgowców budujących rybosomy występuje ponad 100 metylowanych nukleotydów (głównie na 2' hydroksylowej reszcie *O*-rybozy). Uważa się, że większość tych miejsc metylacji dotyczy pozycji konserwatywnych [56]. W przypadku rRNA drożdżowego, który zawiera mniej, tj. około 55 reszt metylowanej rybozy, potwierdzono kilka wspólnych miejsc metylacji z rRNA człowieka, co wskazuje na zachowawczy charakter tej modyfikacji. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że tworzące się komplementarne segmenty snoRNA–pre-rRNA zawierają około 8% zmodyfikowanych nukleotydów, podczas gdy w całości regionu rdzeniowego występuje zaledwie 2% [2, 56]. Wydaje się, że hydrofobowe właściwości grup metylowych wprowadzone do rRNA mogą być wykorzystywane do właściwego zwijania jego łańcuchów [41, 56]. Wspomniane badania Kiss-Laszlo i wsp. [40], Cavaillé i wsp. [16] oraz Nicoloso i wsp. [65] opublikowane w ostatnich miesiącach wskazują na antysensowne snoRNA jako wyznaczniki zakotwiczenia (ang. *docking guides*) enzymów dokonujących tej modyfikacji. Najciekawszym rezultatem cytowanych prac, obejmujących analizę około 40 snoRNA było stwierdzenie (z drobnymi wyjątkami dotyczącymi U21, U26, U31, U48 i U50), że w powstających dupleksach snoRNA–pre-rRNA modyfikacji ulega zawsze piąty nukleotyd powyżej motywu strukturalnego D' (D). W doświadczeniach przeprowadzonych na szczepie komórek Ura wykazano, że usunięcie U24 snoRNA prowadziło do znoszenia 2'-*O*-metylacji 25S rRNA (przy nukleotydach C<sup>1436</sup>, A<sup>1448</sup> i G<sup>1449</sup>) bez wpływu na metylację innych nukleotydów w tym łańcuchu [40]. Ekspresja U24 drożdży w komórkach, pozbawionych uprzednio tego snoRNA, przywraca



Rys. 4. Obróbka antysensownego U16 snoRNA (wg [14] za zgodą Autorów): radioaktywny  $^{32}\text{P}$ -003RNA wstrzykiwano do jąder komórkowych oocytów *X. laevis* i inkubowano 3 lub 120 minut; po tym czasie jądrowy RNA wydzielano i analizowano w 10% żelu poliakrylamidowym z mocznikiem; produkty pośrednie i ostateczne obróbki U16 RNA zaznaczono obok żelu i schematu; eksony (ex) reprezentują zakropkowane prostokąty, intron – ciągła linia, natomiast region kodujący U snoRNA w intronie – czarny prostokąt z zaznaczonymi konserwatywnymi motywami C i D; symbole 5'CS i 3'CS wskazują miejsce cięcia (ang. *cleavage site*) odpowiednio w 5' i 3' części intronu; produkty pierwotnego cięcia prekursorowego snoRNA oznakowano strzałkami, a produkty skracania za pomocą trójkątów

właściwą metylację 25S rRNA co potwierdza, że jej brak był spowodowany nieobecnością wspomnianego antysensownego RNA. Zmiana usytuowania motywu strukturalnego D o jeden nukleotyd w kierunku 3' łańcucha U24 wiązała się z włączeniem reszty metylowej na nukleotydy przesunięty o jeden w porównaniu z pierwotnym miejscem metylacji dzikiego 25S rRNA ( $\text{C}^{1436} \rightarrow \text{U}^{1437}$ ). Również doświadczenia Cavallé i wsp. [16] ujawniły, że zmiana sekwencji w innym antysensownym snoRNA – U20 jest wynikiem wpływającym na specyficzność metylacji 18S rRNA kręgowców. Metylacja rybozy zachodzi albo w pierwotnym transkrypcie (45S rRNA), albo w skróconych formach prekursorowych pre-rRNA w jąderku [2, 56]. Rola tej modyfikacji pre-rRNA dla zdarzeń związanych z tworzeniem i funkcjonowaniem rybosomów pozostaje wciąż bliżej nieokreślona.

Pełnienie funkcji wyznaczników metylacji transkryptu pre-rRNA przez antysensowne snoRNA, dla których podstawową właściwością jest wiązanie się z fibrylaryną, rodzi wiele pytań, m.in. czy udział tych cząsteczek sprowadza się do funkcji "drogowskazu" dla enzymu metylującego, czy wiąże się z ich aktywnością

TABELA 2. Charakterystyka molekularna snoRNA kodowanych w intronach genów różnych białek (kompilacja danych [2, 3, 38, 61, 65, 75, 85, 97, 98])

snoRNA	Długość łańcucha [nt]	Sekwencje' konserwat. C i D/ /struktura pnia 5'-3'	Gen macierzysty kodujący białko (występowanie)	Lokalizacja w intronie (intronach)	Wiązanie fibrylaryny	Odcinek komplemen-tarny do rRNA (nt)
U14	87	+/+	hsc70 (mysz, człowiek) hsc70 (pstrąg) S13 ( <i>X. laevis</i> )	5, 6 i 8 2,4,5,6,7 i 8 3,4	+	18S (13/14+14)
U15	148	+/+	rpS3 (HeLa) rpS1 ( <i>X. laevis</i> )	1,5 lub 6 3,5 i 6	+	28S(10)
U16	106	+/+	rpL1 ( <i>X. laevis</i> )	3	+	28S
U17[E1]	207	-/-	RCC1 (HeLa) rpS8 ( <i>X. laevis</i> )	1 i 2 1,2,3,4,5 i 6	-	18S/ETS 28S(13)
U18	69	+/-	rpL1 ( <i>X. laevis</i> ) rpL1 ( <i>X. tropicalis</i> ) rpL1 (człowiek)	2,4,7 i 8 2,7 i 8 4	+	
U19	102		EF-1β ( <i>S. cerevisiae</i> )	1		
U20	200	-/-	(komórki HeLa)?	?	-	?
U20	80	+/+	nukleolina (człowiek, mysz, szczur, chomik, kura, <i>X. laevis</i> ) karp pstrąg	11 7 9	+	18S(17/21)
U21	93	+/+	rpL5 (człowiek, kura) ARF-1 (muszka owocowa)	5 zmienna lokalizacja	+	28S(13)
U22	125	+/+	UHG (człowiek, <i>X. laevis</i> )	9	+	18S
U23	147	-/-	nukleolina (człowiek, komórki HeLa, mysz, <i>X. laevis</i> )	12	-	nieokreślony
U24	76	+/+	białko rpL7a (czło- wiek, kura)	2	+	28S(12+12)
	89		białko G ( <i>S. cerevisiae</i> )	nieokreślony		
U25	70	+	UHG (człowiek, mysz)		+	18S(12)
U26	76	+	UHG (człowiek, mysz)		+	28S(14)
U27	74	+	UHG (człowiek, mysz)		+	18S(12)
U28	78	+	UHG (człowiek, mysz)		+	18S (15)
U29	65	+	UHG (człowiek, mysz)		+	28S (12)
U30	71	+	UHG (człowiek, mysz)		+	28S (12)
U31	68	+	UHG (człowiek, mysz)		+	28S (13)
U32	81	+	rpL13a (mysz)	2	+	18S(12); 28S(13)
U33	82	+	rpL13a (mysz)	4	+	18S(12)
U34	66	+	rpL13a (mysz)	5	+	28S(13)
U35	89	+	rpL13a (mysz)	6	+	28S(14)
U36	68-80	+	rpL13a (kura, człowiek)	5 i 6	+	18S(14); 28S(12)



TABELA 2 cd.

snoRNA	Długość łańcucha [nt]	Sekwencje konserwat. C i D/struktura pnia 5'-3'	Gen macierzysty kodujący białko (występowanie)	Lokalizacja w intronie (intronach)	Wiązanie fibrylaryny	Odcinek komplementarny do rRNA (nt)
U37	65	+	EF2 (chomik)	4	+	28S(14)
U38	69-71	+	rpS8 (człowiek)	4 lub 5	+	28S(11)
U39	80	+	rpS8 (człowiek)	1	+	28S(10)
U40	100	+	rpS8 (człowiek)	2	+	28S(11)
E2	154	-	?	?	-	
E3	135	-/-	eIF-4AII (człowiek)	8	-	-
snR38	95	+/-	EF-1 $\gamma$ ( <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> )	1		25S (13)
snR39	89	+/-	pYL8 ( <i>S. cerevisiae</i> ) ( <i>S. pombe</i> )	2 1	+	25S (13)

katalityczną? W sprawowaniu czynności wyznacznika metylacji udział motywu D(D') nie ulega kwestii, choć nie można wykluczyć również zaangażowania sekwencji konserwatywnych C i być może innych czynników. Okazało się, że mutacja genu kodującego fibrylarynę silnie hamuje metylację pre-rRNA drożdży [92]. Powyższe wyniki należy rozpatrywać krytycznie choćby przez fakt, że fibrylaryna wiąże się również z snoRNA kodowanymi przez niezależne, bezintronowe geny. Wydaje się jednak, że białko to mogłoby zmieniać konformację antysensownych snoRNA prowadząc do utworzenia takiej struktury kompleksu snoRNP-pre-rRNA, który stawałby się bardziej podatny na działanie metylotransferazy. Formowanie w miarę stabilnych, choć przejściowych dupleksów snoRNA-pre-rRNA, musi zakładać również uwalnianie z nich poszczególnych składników; w tej kaskadzie zdarzeń na pewno muszą być wykorzystywane RNA helikazy [40, 65]. Być może właśnie omawiana modyfikacja wprowadza nowe hydrofobowe wiązania modulując interakcje między rRNA – białkami – tRNA i mRNA na poziomie rybosomów.

W ostatnim okresie pojawiły się sugestie, że prawdopodobnie większość snoRNA uczestniczy w prawidłowym zwijaniu ogromnej cząsteczki syntetyzowanej przez polimerazę RNA I [2, 61, 86]. Związanie snoRNA z określonymi tylko segmentami tego transkryptu jest możliwe po zniszczeniu komplementarnych oddziaływań wewnątrz pre-rRNA czy innych konserwatywnych interakcji, doprowadzając jego cząsteczkę do optymalnej konfiguracji, w której podlega ona obróbce. Steitz i Tycowski [86] sugerują, że udział wielu snoRNA w przekształceniu struktury długiego łańcucha pre-rRNA, aby mógł ulec obróbce i być wykorzystany w tworzeniu rybosomów naśladuje "opiekuńczą" (ang. *chaperone*) czynność niektórych białek w zwijaniu łańcuchów polipeptydowych. Sprawą otwartą pozostaje, czy rola tych snoRNA sprowadza się do stworzenia właściwej geometrii transkryptu pre-rRNA

czy (bądź również) zapobiega niekorzystnym interakcjom między odcinkami bogatymi w GC, ściśle upakowanych sąsiadujących transkryptów [86]?

### 2.3. Obróbka snoRNA

Cząsteczki snoRNA, aby pełnić przypisane im funkcje ulegają po ich transkrypcji określonym zmianom, które składają się na proces zwany dojrzewaniem lub obróbką. W odróżnieniu od dojrzewania pozająderekowych, nukleoplazmatycznych snRNA [66, 82] proces ten w przypadku snoRNA jest słabo poznany. Aktualnie wiadomo, że snRNA po ich syntezie w jądrze ulegają metylacji na 5' końcu łańcucha (do 7-metyloguanozyny) i są eksportowane do cytoplazmy celem ich dodatkowej metylacji zwanej hipermetylacją (do 2,2,7-trimetyloguanozyny). Tak zmodyfikowane cząsteczki po przyłączeniu białek (głównie tzw. kompleksu Sm) wracają do jądra jako funkcjonalne snRNP.

W 1994 roku Terns i Dalhberg [90] wykazali, że U3 snoRNA nie jest eksportowany do cytoplazmy, a hipermetylacji ulega w jądrze komórkowym. Późniejsze badania z tego ośrodka ujawniły, że poza U3 również U8 i U24 nie opuszczają jądra komórkowego i ich "oczyszczenie" odbywa się na jego terenie [91]. Efektywność tej modyfikacji *in vitro* i *in vivo* warunkuje motyw strukturalny D obecny blisko 3' zakończenia łańcucha większości snoRNA (por. rys. 3). Okazało się, że zmutowane w obrębie motywu D cząsteczki U3 i U8 (wyznakowane  $^{32}\text{P}$ ), zawierające 7-metyloguanozynę na ich 5' końcach łańcucha, po iniekcji do jąder komórkowych oocytów *X. laevis* nie ulegają hipermetylacji. Mutant U8, który utracił sekwencję D, nagromadza się w cytoplazmie po iniekcji.

Wykazano ponadto, że U14, który reprezentuje u kręgowców snoRNA kodowany w intronach genów białek, a jego łańcuch zakończony jest po 5' stronie nukleotydem w formie monofosforanu z chwilą pozyskania na tym końcu cząsteczki 7-metyloguanozyny jest zdolny do hipermetylacji, która odbywa się również w jądrze komórkowym. Istnieją eksperymentalne potwierdzenia, że hipermetylacja przebiega w nukleoplazmie, skąd tak zmodyfikowane snoRNA przenoszone są do jąderka [91]. Za jądrową retencję badanych dotąd rodzajów snoRNA wydaje się odpowiadać również motyw D, który jest osłaniany podczas trawienia mikrokokalną nukleazą np. kompleksu U3 snRNP, co wskazuje na białkowy czynnik z nim związany. Białka (lub białko) asocjujące z 3' odcinkiem różnych snoRNA, gdzie lokuje się sekwencja D mogą odpowiadać za zakotwiczenie w jądrach (czy jąderkach), a także ochraniać je przed atakiem nukleolitycznym. Ponieważ motyw D jest nieodzowny przy hipermetylacji snoRNA, białka wiążące się z nim mogą również oddziaływać z jądrowym enzymem dokonującym tej modyfikacji [50]. Z doświadczeń Ternsa i wsp. [91] wynika, że białkiem tym jest jakiś bliżej nie scharakteryzowany polipeptyd różny od fibrylaryny. Mutacje, które blokują wiązanie fibrylaryny do U3 snoRNA zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, nie oddziałują na jego

hipermetylację po wstrzyknięciu do oocytów *X. laevis* [9, 10]. Czynnikiem istotnym podczas hipermetylacji U3 snoRNA jest struktura 3' pnia, która formuje się przy parowaniu 3' końca jego cząsteczki z nukleotydami przyległymi do motywu C (por. rys. 3).

Mechanizm wycinania i obróbki antysensownych snoRNA jest wciąż słabo poznany. Dzięki pomysłowym eksperymentom wprowadzania prekursorowych transkryptów białka hsc70 myszy [45] czy białka rybosomalnego L1 żaby [28] do jąder komórkowych oocytów *X. laevis* obserwowano sprawne i precyzyjne wycinanie odpowiednio U14 i U16 snoRNA z prawidłowymi zakończeniami 5' i 3' ich cząsteczek. W doświadczeniach modelowych wykorzystujących zarówno jądra komórkowe oocytów *X. laevis*, jak i ekstrakty komórkowe, w których prowadzono obróbkę pre-mRNA, obserwowano produkty przekraczające faktyczną długość snoRNA, z dodatkowymi sekwencjami po ich 5' i 3' końcach łańcucha. To sugerowało niezależną obróbkę obydwu zakończeń łańcucha oraz potrzebę, poza reakcjami cięcia endonukleolitycznego, również egzonukleolitycznego skracania [38]. Podczas wycinania snoRNA z odcinków intronowych genów białek nie jest wymagana obecność sąsiadujących eksonów, co przemawia za potencjalną autoregulacją usuwanych odcinków [2, 15, 38, 45, 73].

Szereg wspólnych cech snoRNA zawierających w swojej cząsteczce motywy strukturalne C i D oraz ich asocjacja z dominującym białkiem jąderkowym – fibrylaryną stało się podstawą do zaproponowania modelu obróbki U16, prawdopodobnie typowego dla snoRNA podklasy C/D (rys. 4). Caffarelli i wsp. [14] w swoich doświadczeniach wstrzykiwali do jąder komórkowych oocytów *X. laevis* zsyntetyzowany *in vitro* prekursor U16, znakowany  $^{32}\text{P}$  (003 RNA). Po krótkiej (3 min) bądź dłuższej (120 min) inkubacji wydzielali jądrowy RNA poddając go analizie elektroforetycznej w żelu poliakryloamidowym z mocznikiem. Dojrzała forma U16 (a także U18) powstaje z prekursorowej cząsteczki podczas dwuetapowego szlaku obejmującego endonukleolityczne cięcie powyżej 5' i poniżej 3' końców regionu kodującego snoRNA z przyległymi sekwencjami (tzw. trailer), które w kolejnej reakcji ulegają skróceniu dostarczając funkcjonalnego łańcucha snoRNA (rys. 4). Mutacja przez podstawienie dwóch lub trzech nukleotydów w obrębie motywów C i D U16 snoRNA całkowicie blokuje cięcie nukleolityczne zmutowanych prekursorów. Wydaje się, że wiązanie białek z motywami strukturalnymi podklasy C/D snoRNA jest czynnikiem chroniącym je przed nadmierną aktywnością egzonukleolityczną przy 5' i 3' końcu ich łańcuchów [4, 14]. W przypadku obróbki snoRNA podklasy ACA udział białek wydaje się być również ważny. W tym przypadku wiążą się one z tzw. strukturą szpilki do włosów (ang. *hairpin*) utworzoną przy 5' i 3' końcach ich cząsteczek [5].

W doświadczeniach *in vitro* wykorzystujących ekstrakt jądrowy oocytów *X. laevis* przy stężeniu zapewniającym tylko pierwszy etap obróbki snoRNA (analogiczny do tego *in vivo*; por. rys. 4) dochodzi do nagromadzenia intermediatów obróbki

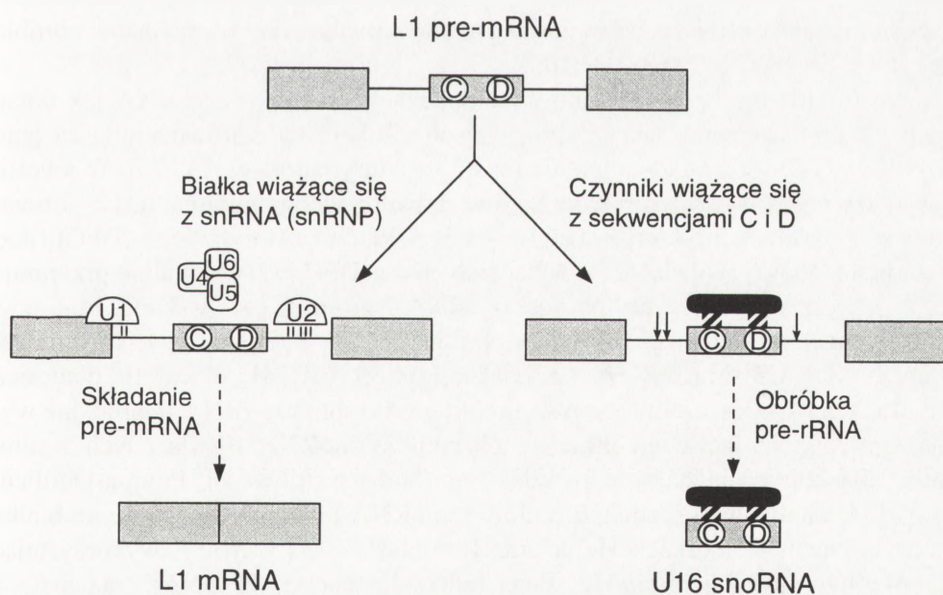
intronów pre-mRNA, które można rejestrować podczas elektroforezy. Mutacje motywów C i D U16 snoRNA dostarczają produktów analogicznych do tych obserwowanych w kontrolnych U16. Natomiast przy zapewnieniu warunków przebiegu drugiego etapu obróbki snoRNA (przez dodanie świeżej porcji ekstraktu jądrowego po 20 min reakcji) nie obserwowano nagromadzenia ani intermediatów, ani dojrzałych postaci U16, gdy w ekstrakcie jądrowym były obecne mutanty sekwencji C i D tegoż snoRNA [14]. Dane te pozwalają wnioskować, że motywy C i D uczestniczą w stabilizacji zarówno intermediatów przemiany, jak i dojrzałych snoRNA, w czym niebagatelną rolę wydają się pełnić oddziałujące z nimi czynniki. Jednym z nich może być fibrylaryna, choć prawdopodobnie nie wiąże się ona bezpośrednio z RNA [51]. Jak dotąd białko to jest jedynym znacznikiem formowania cząstek snoRNP, w których RNA obecne są sekwencje C i D. Metodę immunoprecypitacji ekstraktów jądrowych oocytów *X. laevis* za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko fibrylarynie wykorzystano w celu określenia, na którym etapie obróbki pre-mRNA dochodzi do tworzenia kompleksów snoRNP z jej udziałem. Jako substrat zastosowano pre-mRNA, opisywany symbolem F4 [14], ze zmutowanym miejscem składania przy jego 5' końcu (ACGUAUG→AGGUAAG). Zarówno w eksperymentach *in vitro* (ekstrakty jądrowe *X.laevis*), jak i *in vivo* (iniekcje do oocytów *X.laevis*) fibrylaryna wiąże się podczas krótkiej inkubacji (20 min) z pre-mRNA, natomiast przy dłuższych inkubacjach (60 i 120 min) zarówno z intermediatami, jak i dojrzałymi cząsteczkami U16. Stąd uzasadniony jest wniosek, że kompleksy z tym białkiem powstają już na pierwotnym transkrypcie polimerazy RNA II, a następnie są odnajdywane kolejno w produktach jego obróbki [14]. Fibrylaryna dość słabo wiąże się z intronami w formie pętli lassa, zaś brak jej w takiej formie intronu, który jest wytrącany przez przeciwciała skierowane przeciwko kompleksom białkowym opisywanym symbolem Sm – białkom typowym dla cząstek snRNP zaangażowanych w składanie pre-mRNA [44, 60, 82, 105]. Śledząc etapy obróbki U16 i U18 snoRNA (w różnym czasie, tj. 20, 60 i 120 min) stwierdzono, że antygen Sm można wykryć tylko przy krótkich okresach inkubacji, gdy intron ma postać niedojrzałej pętli lassa, zaś fibrylarynę przy dłuższej inkubacji. Stanowiło to przyczynek do sformułowania koncepcji, że kompleksy zawierające fibrylarynę, wiążąc się z pętlą lassa stanowią alternatywną formę intronu oddziałującego z czynnikami składania pre-mRNA. Ponadto wyniki te posłużyły do zaproponowania modelu wyjaśniającego molekularne podstawy wykorzystania genów zawierających introny w biosyntezie wielu rodzajów snoRNA bądź mRNA określonych białek (rys. 5).

Prekursorowe transkrypty polimerazy RNA II wykorzystywane są do składania dojrzałych mRNA w spliceosomach, gdy wycięte z nich introny nie tworzą funkcjonalnych kompleksów z motywami strukturalnymi C i D (np. z fibrylaryną) i budują cząstki snRNP. W alternatywnym rozwiązaniu, gdy składanie mRNA jest nieefektywne, dochodzi do powstania kompleksów z czynnikami rozpoznającymi motywy C i D i do obróbki wyciętych odcinków odpowiadających snoRNA (por.

rys. 4 i 5). Nie wyklucza się również wycinania snoRNA z intronów pierwotnych transkryptów mRNA, gdy proces ich składania jest zablokowany, bądź równoczesnego formowania dojrzałych form mRNA i snoRNA [45].

W tym miejscu należy odnotować wyniki doświadczeń Maxwella i Fourniera [61], z których jasno wynika, że obróbka U14snoRNA nosi cechy znacznej konserwatywności. Autorzy ci wykazali, że obróbka prekursorowego U14 drożdży, który jest kodowany przez bezintronowy gen, po iniekcji do jąder komórkowych oocytów *X. laevis* przebiega bez zakłóceń dostarczając dojrzałe jego formy. Dane eksperymentalne z zastosowaniem manipulacji genetycznych ujawniły, że w procesie obróbki U16, U18, U20 i prawdopodobnie innych antysensownych snoRNA, niezwykle ważne elementy struktury reprezentują konserwatywny układ sekwencji 5'–3' pnia i sąsiedztwo regionów C i D (por. rys. 3) [14–16, 47, 91]. Wymieniona struktura 5'–3' pnia może stanowić wyznacznik zakończenia skracania wyciętego pierwotnego łańcucha snoRNA przez egzozonukleazy. Wydaje się, że utworzony heliks przy zakończeniu 5' i 3' cząstek snoRNA oraz motywy C i D mogą oddziaływać z białkami zaangażowanymi w modulację ich obróbki [96].

### 3. UDZIAŁ snoRNA W OBRÓBCE TRANSKRYPTÓW POLIMERAZY RNA I

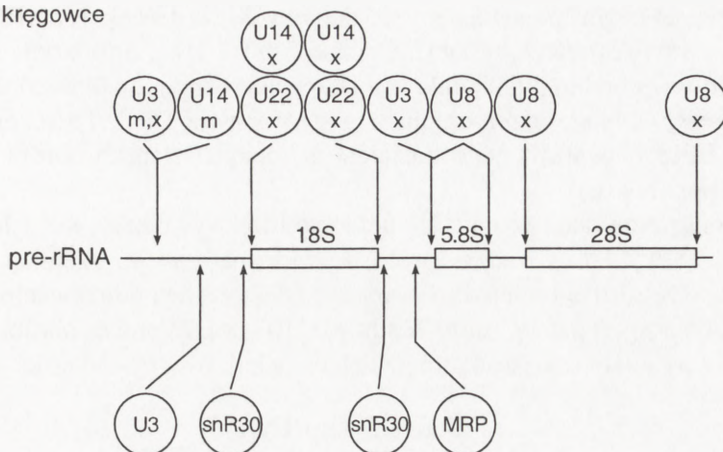


Rys. 5. Alternatywne drogi przemian pre-mRNA rybosomalnego białka L1 dostarczające mRNA białka L1 bądź U16 snoRNA. Na schemacie zaznaczono białka tworzące kompleksy z snRNA oraz czynniki wiążące się z motywami strukturalnymi C i D snoRNA – U1, U2, U4/U6 i U5 zaangażowane w składanie pre-mRNA (wg [14]; zmodyfikowany)

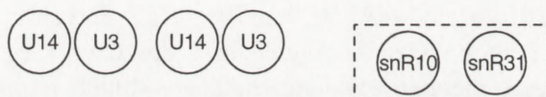
W wyniku złożonego zespołu zdarzeń obejmujących transkrypcję genów rDNA, modyfikacje (metylacja, pseudourydylacja) i obróbkę pre-rRNA, uorganizowanie utworzonych rRNA wraz z importowanymi z cytoplazmy białkami i 5S rRNA w kompleksy RNP w jąderkach *Eukaryota* dochodzi do biogenezy rybosomów [23, 24, 42, 56, 62, 67]. W znakomitej części tego skomplikowanego procesu biorą udział snoRNA, przy czym ich udokumentowane uczestnictwo dotyczy metylacji (por. podrozdz. 2.3) i obróbki pre-rRNA. Bezpośrednich dowodów zaangażowania różnych snoRNA w obróbkę pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I dostarczyły doświadczenia z usuwaniem ich cząsteczek (ang. *depletion*) z układów modelowych *in vitro* (najczęściej ekstrakty komórek myszy lub komórek HeLa) bądź *in vivo* (oocyty *X. laevis*) wykorzystujące RNazę H i komplementarne oligodeoksynukleotydy [35, 69, 78]. Wśród kilku snoRNA, których udział w obróbce pre-rRNA jest niekwestionowany, wykazano, że inne ich rodzaje uczestniczą podczas wydarzeń związanych z początkowymi stadiami tego procesu przy 5' końcu transkryptu, które prowadzą do powstania dojrzałej formy 18S rRNA (tzw. wczesna obróbka), zaś inne w późniejszych – przyczyniają się do utworzenia 5,8 i 25/28S rRNA (tzw. późna obróbka). Rysunek 6 stanowi kompilację danych wielu laboratoriów podkreślających udział poszczególnych snoRNA w obróbce pre-rRNA kręgowców (rys. 6a) i drożdży *S. cerevisiae* (rys. 6b). Podczas wczesnych reakcji uczestniczą U3, U14, U22, snR10 i snR30, zaś ostatecznej obróbki dopełniają U3, U8 i 7–2 MRPRNA [2, 6–8, 27, 61, 86, 97, 100]. Udział tego ostatniego unikatowego RNA w opisywanym procesie, składnika RNazy MRP, został ostatnio potwierdzony w przypadku obróbki pre-rRNA drożdży [43, 63, 93, 102].

Ultrastrukturalne badania szlaku metabolicznego jąderkowego RNA jak dotąd nie pozwoliły na jednoznaczne sprecyzowanie lokalizacji zarówno miejsca jego biosyntezy, jak i przemian na terenie tej substruktury jądrowej [61, 76]. W kwestii biosyntezy pre-rRNA rozpatrywane są dwa prawdopodobne miejsca, tj. 1<sup>o</sup> – obszar graniczny centrów fibrylarnych (FC) i gęstego składnika fibrylarnego (DFC) (por. praca przeglądowa [76]) lub 2<sup>o</sup> – wyłącznie obszar DFC [32]. Aktualnie przyjmuje się, że utworzone transkrypty polimerazy RNA I gromadzą się w DFC. Etap tzw. wczesnej obróbki przebiega właśnie w strefie DFC, w której zidentyfikowano sekwencje ETS, U3 snoRNA czy fibrylarynę [19, 39, 61, 74]. W świetle doniesień dotyczących rozmieszczenia etapów obróbki transkryptu pre-rRNA miarodajne wydają się te, które łączą ten proces z obecnością snoRNA i związanych z nimi białek, dla których udział w tym szlaku nie budzi wątpliwości. Puvion-Dutilleul i wsp. [74] analizowali rozmieszczenie U3 snoRNA i oddziałującego z nim białka – fibrylaryny w komórkach HeLa oraz fibroblastach 3T3 myszy, wykorzystując technikę hybrydyzacji *in situ* (z sondą biotynylowanego U3 DNA) oraz metodę immunozłocenia (z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko fibrylarynie). Okazało się, że U3 snoRNA nagromadza się w rozległym stopniu w DFC i na pograniczu DFC/FC, wobec braku znakowania wewnątrz FC, oraz słabiej

## a) kręgowce



## b) drożdże



Rys. 6. Rodzaje snoRNA uczestniczące we wczesnej i późnej obróbce pre-rRNA kręgowców (a) m – mysz, X – *Xenopus* i drożdży (b). Strzałki wskazują miejsce cięcia prekursorowych transkryptów polimerazy RNA I oraz cząsteczki U snoRNA w nich zaangażowane (wg [61]; zmodyfikowany)

również w regionach odpowiadających składnikom granularnym (GC). Cytowani autorzy są zdania, że rozkład tego U RNA w obszarach DFC i GC jest zbliżony, po uwzględnieniu faktu, że w badanych przez nich komórkach powierzchnia GC jest średnio 9 razy większa niż DFC. Immunodetekcja fibrylaryny wskazuje na obecność tego polipeptydu zarówno w DFC, jak i GC, choć stosunek U3/fibrylaryna w tych obszarach jąderka jest różny [74].

Z wciąż nielicznych doniesień o ultrastrukturalnej organizacji przemian pre-rRNA szerszego omówienia wymagają ostatnie doświadczenia Bevena i wsp. [12] dotyczące tego procesu w komórkach korzeni grochu. Dysponując sondami dla sekwencji 5'ETS i ITS1 pre-rRNA oraz U3, U14 i 7-2 MRP RNA, a także przeciwciałami przeciwko fibrylarynie i białku SSB1 (polipeptyd asocjujący z drożdżowym snR10, nieodzowny dla powstawania 18S rRNA) zastosowano do ich lokalizacji w substrukturach jąderka technikę FISH (ang. *Fluorescence in situ Hybridization*) i metodę immunofluorescencyjną. Uzyskane w toku takiego postępowania wyniki wskazują, że przemiany transkryptu pre-rRNA są w jąderku "przestrzennie" zorganizowane. Usuwanie odcinków odpowiadających 5'ETS przebiega w DFC, podczas gdy ITS1 – w otaczającej przestrzeni, odpowiadającej GC. Znaczna gęstość znakowania U3 i U14 snoRNA oraz obszary immunolokalizacji fibrylaryny i antygeny SSB1 pokrywają się z sygnałami dla 5'ETS, co pozwala przypuszczać, że eliminacja tegoż

ETS z równoczesnym pojawieniem się dojrzałych cząsteczek 18S rRNA odbywa się w tym samym obszarze, tj. DFC. Odcinki 5'ETS, U14, fibrylaryna i polipeptyd SSB1 tworzą w obrębie DFC punktowe skupienia o średnicy 0,5–1,0  $\mu\text{m}$ , podczas gdy U3 snoRNA ulega rozproszeniu w całej warstwie DFC. To rozproszenie U3 niektórzy badacze wiążą z jego udziałem w różnych etapach obróbki pre-rRNA [35, 64] (por. rys. 6).

Zaprezentowane dane wydają się popierać ideę wywodzącą się z laboratorium Hadjiolova [30] z lat osiemdziesiątych, że wczesne reakcje przemian transkryptu polimerazy RNA I mają miejsce w warstwie DFC, zaś ich dojrzewanie w obszarze GC. Ostatnie eksperymenty grupy Wachtlera [103] wiążą proces obróbki pre-rRNA z wysoce zorganizowaną strukturą szkieletu jąderkowego – matriks jąderkową.

### 3.1. U3 snoRNA

Proces obróbki pre-rRNA z udziałem U3 snoRNA wydaje się być konserwatywny ewolucyjnie [6, 61, 62, 64, 68, 72, 79, 99]. Z dotychczasowych wyników badań przeprowadzonych wśród *Archaeobacteria*, drożdży i kręgowców wnioskuje się, że U3 snoRNA jest nieodzowny do dokładnego usunięcia z pre-rRNA sekwencji 5'ETS [9, 35, 64, 72]. U *Archaeobacteria* – *Sulfolobus acidocaldarius* zidentyfikowano ostatnio [72] homolog eukariotycznego U3 o długości 159 nt, który zawiera wszystkie konserwatywne motywy strukturalne, tj. A, B, C, C' i D typowe dla tego RNA u kręgowców. Cząsteczki U3 RNA (ang. *U3-like*) tego mikroorganizmu kompleksują z białkiem o determinantach antygenowych podobnych do fibrylaryny. Z doniesień Pottera i wsp. [72] wynika, że 5'ETS bezpośrednio sąsiadujący z 16S rRNA *S. acidocaldarius* tworzy charakterystyczną strukturę koniczyny, eksponując miejsca cięć endonukleolitycznych opisywanych cyframi 1, 2 i 4 – odpowiadających nukleotydom w pozycjach: –91, –31 i +1 w obszarze granicznym 16S rRNA. Okazało się, że z tymi istotnymi dla uwolnienia dojrzałej cząsteczki 16S rRNA oddziałuje U3 RNA angażując do tego celu nukleotydy w regionach: 12–32 i 69–85.

Obszerne badania wykorzystujące tworzenie wiązań krzyżowych po działaniu pochodnych psoralenu i światła UV (365 nm) ujawniły oddziaływania U3 snoRNA–5'ETS pierwotnych transkryptów rRNA zarówno u drożdży, jak i kręgowców [9, 10, 35, 57]. W komórkach człowieka obejmują one region 5'ETS między 438–695 nt [57], szczura – 767–1149 nt [87], zaś myszy – 669–1290 nt [35]. Miejsca interakcji snoRNA–pre-rRNA znajdują się w obrębie sekwencji blisko lub w pewnej odległości od tzw. pierwotnych miejsc obróbki, które zlokalizowano w komórkach ludzkich: w pozycji +414; szczura: +790; myszy: +650 5'ETS [21, 35, 87]. Wnikliwa analiza struktury pierwszorzędowej 5'ETS oddziałujących z U3 snoRNA z zastosowaniem techniki wiązań krzyżowych, a także wydłużania starterów [21, 35, 57] pozwoliła odnotować znaczną homologię sekwencji (ok. 80%) odcinka około 200 nt po 3' stronie pierwotnego miejsca obróbki pre-rRNA człowieka i myszy. Dzięki wy-



korzystaniu mutantów z delecją nukleotydów wokół pierwotnego miejsca obróbki transkryptu myszy (+650) poznano rolę otaczających je sekwencji [21]. Okazało się, że delecja regionu między 130. a 250. nt powyżej tego krytycznego miejsca przyczynia się do około 50% spadku syntetyzowanego rRNA, usunięcie odcinka do 109. nt znacznie redukuje jego syntezę, natomiast delecja odcinka do 91. nt praktycznie uniemożliwia proces obróbki pre-rRNA, a co się z tym wiąże – blokuje powstawanie dojrzałych rRNA. W opinii Craiga i wsp. [21] obszar 40 nt po 3' stronie pierwotnego miejsca obróbki 5'ETS warunkuje specyficzność procesu przemian transkryptu, zaś przyległa domena może ją wzmocnić.

W ekstraktach komórek myszy L1210 zaobserwowano, że U3 snoRNA wiąże się również w odległości 362 nt od miejsca pierwotnego obróbki (+650 nt) 5'ETS. To oddziaływanie ze wspomnianą sekwencją pre-rRNA (1009–1016 nt) odbywa się przez odcinek U3 przylegający do motywu A' oraz częściowo w jego obrębie [95]. W przypadku komórek drożdży – modelu chętnie wykorzystywanego do śledzenia obróbki pre-rRNA z uwagi na łatwość dokonywania w nich mutacji – ustalono, że reakcje cięcia pierwotnego transkryptu polimerazy RNA I w miejscach  $A_0$  i  $A_1$  (por. rys. 1) wymagają obecności U3 snoRNA i prowadzą do pojawienia się dojrzałej cząsteczki 18S rRNA [9–11, 93]. Ten etap związany z precyzyjnym usunięciem 5'ETS wymaga u drożdży również U14 [46], snR10 i snR30 [61, 93, 100], a u kręgowców także U22 snoRNA [97].

*In vivo* wiązania krzyżowe indukowane psoralenem i UV między U3 snoRNA i 5'ETS pre-rRNA drożdży zlokalizowano przy +470 i +655 nt [9]. Obszar sąsiadujący z +470 5'ETS cechuje zdolność do komplementarnego parowania z U3 snoRNA w obszarze 39.–48. nt jego łańcucha. W tym miejscu należy podkreślić konserwatywny charakter sekwencji 5'ETS na granicy miejsca pierwotnej obróbki zarówno u drożdży, jak i kręgowców, który zapewne ma znaczenie fizjologiczne poza faktem oddziaływania z U3 snoRNP. Z kolei region w drugim miejscu krytycznym dla obróbki 5'ETS, tj. +655 znajduje się w obrębie pętli struktury: pień–pętla, u podstawy której leżą miejsca cięć nukleolitycznych  $A_0$  i  $A_1$  [9, 10, 92, 94]. Cząsteczka U3 snoRNA w oddziaływaniach komplementarnych z 5'ETS wykorzystuje motyw strukturalny A i przylegające doń sekwencje 39–48 nt; w tym segmencie występuje głównie jako pojedynczy łańcuch. Delecja odcinka 23-nukleotydowego w okolicy +470 5'ETS, uniemożliwiająca parowanie z U3 snoRNA, powoduje dramatyczny spadek syntezy 18S RNA bez wpływu na poziom 25S rRNA. Ograniczenie delecji 5'ETS do fragmentu 10-nukleotydowego, rozpoczynającego U3 snoRNA między 39–48 nt, blokuje syntezę 18S rRNA [10]. W swoich ostatnich doniesieniach Beltrame i Tollervey [11] wykazali, że mutacje w obszarze 10-nukleotydowego segmentu 5'ETS, szczególnie w jego części rdzeniowej sześciu nukleotydów (istotnej w tworzeniu idealnego dupleksu z U3 snoRNA), blokują prawidłową obróbkę pre-rRNA. Uzyskanie mutantów drożdży, z kompensującą mutacją w U3 snoRNA, która zapewnia ponownie komplementarność oddziaływania ze zmutowanym odcinkiem

5'ETS przywraca prawidłową syntezę 18S rRNA. Takie rezultaty bezsprzecznie prowadzą do wniosku, że obróbka 5'ETS wymaga bezpośredniego parowania tego U snoRNA (i prawdopodobnie innych) z pre-rRNA. Komórki drożdży pozbawione możliwości komplementarnego oddziaływania U3 snoRNA–pre-rRNA tracą możliwość syntezy i nagromadzania 18S rRNA; proces obróbki pre-rRNA jest hamowany w miejscach  $A_0$  – w obrębie 5'ETS,  $A_1$  – przy końcu 18S rRNA oraz  $A_2$  – w odcinku ITS1 [10, 11]. Śledząc szlak obróbki pre-rRNA drożdży w oocytach *X. laevis* po usunięciu znacznej części cząsteczki U3 snoRNA od 5'końca za pomocą komplementarnych oligodeoksynukleotydów ( w obecności endogennej RNazy H) Savino i Gerbi [90] udowodnili, że ten U RNA warunkuje prawidłowe miejsce cięcia w obszarze granicznym ITS1 i 5,8S rRNA. Odcinki ITS1 i ITS2 pre-rRNA, chociaż reprezentują sekwencje o mniejszym stopniu konserwatywności aniżeli te, z których powstają dojrzałe cząsteczki rRNA, wydają się zawierać *cis*-aktywne elementy struktury istotne dla dojrzewania podjednostek rybosomalnych [10].

Rola U3 snoRNA w obróbce transkryptu polimerazy RNA I jest wciąż niejasna. Wielu badaczy przychyli się do jednej z pierwotnych koncepcji [57], że ten U snoRNA ułatwia przyjęcie specyficznej struktury drugorzędowej pierwotnemu transkryptowi, szczególnie jego odcinkowi 5'ETS. Sugeruje się również, że oddziaływanie U3 snoRNA–pre-rRNA może chronić pre-rRNA przed niekorzystnym pofałdowaniem, które zakrywa miejsce obróbki związane z aktywnością nukleazową RNazy III. Ta interakcja może być wykorzystana w "organizowaniu" pre-rRNA w prerybosomalny kompleks, w którym dostępne są miejsca nukleolitycznego cięcia  $A_0$  dla RNazy III. Nie wyklucza się również, że enzym ten wiąże się bezpośrednio z U3 snoRNP *in vivo* i w tym kompleksie jest kierowany w to kluczowe miejsce cięcia [25]. Powyższe wyjaśnienia potencjalnej funkcji sprawowanej przez U3 snoRNA w odniesieniu do reakcji towarzyszących przemianom pre-rRNA wskazują na jego strukturalny raczej, a nie katalityczny udział.

### 3.2. U8 snoRNA

U8 kręgowców reprezentuje podklasę C/D snoRNA; składa się ze 136–140 nt i występuje w ilości pięciokrotnie niższej w porównaniu z U3, tj. około  $4 \times 10^4$  cząsteczek w komórce [5, 61]. W cząsteczce tego jąderkowego RNA wydzielonego z oocytów *X. laevis* stwierdzono po raz pierwszy interakcję motywów strukturalnych C i D z fibrylaryną *in vivo* [70]. Mutacje w obrębie odcinków C i D U8 snoRNA blokują wiązanie z fibrylaryną, lecz nie wpływają na jego stabilność. Zapewne inne, nieznanne jeszcze białka(o) oddziałują z tym U snoRNA i utrzymują jego strukturę drugorzędową, co dodatkowo wzmacnia obecność fibrylaryny. Z kolei mutacja przez podstawienie 5' końcowej guanozyny – adenozyń w U8 snoRNA uniemożliwia tworzenie struktury "czapeczki", nie okazując wpływu na jego akumulację w jądrach i jąderkach *X. laevis*, organizację cząstek U8 snoRNP i przebieg obróbki

pre-rRNA [70, 91]. W 5' końcowym obszarze tego U RNA występuje konserwatywna domena o długości 40 nt. Jej skład nukleotydowy wykazuje około 90% homologii między *X. laevis* i ssakami [70].

Zaangażowanie cząsteczek U8 snoRNA w obróbkę pre-rRNA wykazano w ciękawie zaplanowanych doświadczeniach wykorzystujących oocyty *X. laevis* [61, 69, 70]. Z komórek tych eliminowano U8 snoRNA przez iniekcję do ich wnętrza antysensownych oligodeoksynukleotydów w obecności RNazy H. Okazało się, że w oocytach po tym zabiegu obserwuje się zmianę składu intermediatów ("36S" i "32S") obróbki pre-rRNA, wykrywanych podczas elektroforezy w żelu agarozowym [69]. Ich analizy przy zastosowaniu techniki *Northern* i sond komplementarnych do obszarów odpowiadających ITS1, 5,8S rRNA, ITS2 i 3'ETS wskazują, że przy braku U8 snoRNA hamowane są cięcia endonukleolityczne w obszarach granicznych 5,8S i 28S rRNA. Szlak przemian prekursorowego transkryptu pre-rRNA wiodący do 18S rRNA nie ulega zakłóceniu. Nie obserwuje się 5,8S i 28S rRNA, natomiast dochodzi do nagromadzenia formy prekursorowej – 40S pre-rRNA. Podobne zakłócenia obróbki pre-rRNA występują po delecji konserwatywnej domeny w 5' końcu cząsteczki U8 snoRNA, która zawiera odcinki komplementarne do pre-rRNA o długości do 6 nt oraz potencjalne miejsca interakcji z białkowymi składnikami "procesosomu" [69]. W obrębie odcinka zawartego między pozycją 31. a 47. tego snoRNA występuje 13-nukleotydowy segment komplementarny do obszaru pre-rRNA od +175. do +192. nt względem miejsca obróbki w pozycji T<sub>1</sub>, tj. przy końcu 3' 28S rRNA. Jak dotąd, nie wykryto analogicznych odcinków antysensownych w 3' końcu pre-rRNA innych kręgowców [70]. Również przemiany pre-rRNA na pograniczu ITS1–5,8S rRNA przebiegają z niewielką wydajnością po usunięciu U8 snoRNA, choć można oczekiwać, że uczestniczy w nich zapewne inny U snoRNA – głównie U3. Cztery cięcia endonukleolityczne transkryptu polimerazy RNA I w obecności U8 snoRNA zachodzą w określonej kolejności. Pierwsze jest zlokalizowane w obrębie 3' 28S rRNA, zaś kolejne w obrębie 5' 28S rRNA oraz 3' i 5' 5,8S rRNA. Reakcje związane z przemianami prekursorowego transkryptu przy 3' 28S rRNA i 5,8S rRNA zachodzą w sposób skoordynowany – blok jednej z nich zatrzymuje przebieg następnej [61, 69, 70].

### 3.3. U14 snoRNA

U14 snoRNA występuje u kręgowców w ilości około  $2 \times 10^4$  kopii w komórce i należy do podklasy C/D [5, 27, 49, 85]. Jego długość waha się od 87 nt u ssaków do 125–128 nt u *S. cerevisiae* [2–4, 27, 61]. Różnice w długości drożdżowego U14 snoRNA i odrębność sekwencji nukleotydów na 3' i 5' końcach łańcucha wynikają z jego potranskrypcyjnej obróbki z udziałem egzonukleaz [4]. W obrębie wszystkich poznanych dotąd cząsteczek U14 snoRNA stwierdzono obecność następujących konserwatywnych ewolucyjnie elementów: domen A i B, motywów

strukturalnych C i D oraz struktury 5'-3' pnia (por. rys. 3) [2, 3, 27, 47, 61, 81]. Domeny A i B występują jedynie w U14 snoRNA i stanowią odcinki antysensowne do 18S rRNA o długości odpowiednio 13 i 14 nt [4, 47]. Odcinek komplementarny (8 nt) do domeny A tego snoRNA opisano w 3' końcu 18S rRNA [47]. Miejsca interakcji obydwu domen U14 snoRNA z pre-rRNA leżą w bliskim sąsiedztwie w obrębie cząsteczki 18S rRNA [2, 47]. W części centralnej U14 snoRNA drożdży występuje domena Y zbudowana z pnia (6-8 pz) i pętli (12-19 nt) (por. rys. 3), opisana ponadto w roślinnych homologach, a nieobecna w U14 kręgowców [4, 47, 78]. Podczas badań porównawczych ustalono dwa zespoły sekwencji zgodności dla domeny Y wśród 5 gatunków drożdży i 3 gatunków roślin, odpowiednio: CC--YGCCRRGGCU i AMGAACCY--AU, gdzie M = A lub C, Y – nukleotyd pirymidynowy, R – nukleotyd purynowy [78]. Domena Y uczestniczy zapewne w oddziaływaniach z pre-rRNA lub białkami procesosomu, gdyż interakcje w obrębie samej cząsteczki U14 snoRNA są niestabilne i zachodzą na odcinku o długości zaledwie 5 nt [4, 78, 81].

Jak dotąd, badania nad udziałem U14 snoRNA w procesie obróbki pre-rRNA prowadzono głównie u drożdży. Zahamowanie ekspresji genu kodującego U14 snoRNA powoduje spadek poziomu syntezy 18S rRNA [2, 47, 78]. Mutacje punktowe i delecje w obrębie tego snoRNA pozwoliły określić funkcję domen A i B, motywów sekwencyjnych C i D oraz struktury 5'-3' pnia w obróbce pre-rRNA [2, 27, 33]. Proces ten jest hamowany wówczas, gdy podstawienia pojedynczych nukleotydów domeny A występują razem z mutacjami domeny B, które blokują ich interakcje z 18S rRNA. Zapewne funkcje obu domen w przemianach pre-rRNA są współzależne, zaś przywrócenie parowania w obrębie jednej z domen umożliwia przebieg obróbki prekursorowego transkryptu, jednak z mniejszą wydajnością [47]. Okazało się, że podstawienie nukleotydu guanylowego w pozycji 34. (domena A) adenylowym blokuje dojrzewanie 18S rRNA. Natomiast mutacja kompensująca przez podstawienie nukleotydu guanylowego – urydylowym w obrębie 18S rRNA, tj. mutacja, która przywraca parowanie nukleotydów, umożliwia prawidłową obróbkę transkryptu polimerazy RNA I. Z kolei mutacje motywów strukturalnych C i D w obrębie dinukleotydu GA oraz utrata struktury 5'-3' pnia blokują interakcje ze składnikiem białkowym, który stabilizuje U14 snoRNA i umożliwia jego wewnątrzjadrową akumulację [33, 47, 91]. Na podkreślenie zasługują obserwacje, że wydłużanie struktury 5'-3' pnia zwiększa stabilność U14 snoRNA, nawet zmutowanych w obrębie motywów C i D [33].

Białkiem, które asocjuje z wymienionymi elementami tego snoRNA, może być fibrylaryna, jednak jej wiązanie z motywami strukturalnymi C i D wydaje się przebiegać odmiennie, niż to ma miejsce w przypadku U3. W tym ostatnim interakcja z białkiem jest hamowana przez mutacje domeny C w regionie innym niż nukleotydy GA i nie zachodzi nawet w obrębie niezmutowanego motywu D [4, 33, 81].

W toku badań nad hybrydami mysiego i drożdżowego U14 snoRNA zaobserwowano, że dla zachowania ich funkcji w obróbce pre-rRNA *S. cerevisiae* wymagane są nie tylko domena A i motyw strukturalny C, zlokalizowane w 5' segmencie (1–42 nt) oraz domena B i motyw D w 3' końcu cząsteczki (101–126 nt), ale również słabiej zakonserwowany region centralny, który zawiera domenę Y [46, 47].

### 3.4. U22 snoRNA

Informacja genetyczna dla U22 snoRNA ssaków występuje w intronie genu *UHG* (ang. *U22 Host Gene*). Ten RNA ulega poliadenylacji, lecz nie uczestniczy w biosyntezie białka. Najdłuższy ekson w genie *UHG* koduje łańcuch o długości 52 i 42 aminokwasów odpowiednio u człowieka i myszy [97, 98]. Udział U22 snoRNA w obróbce pre-rRNA analizowano w oocytach *X. laevis*. Przemiany pre-rRNA w obrębie 5'ETS zachodzą w tych komórkach później niż w somatycznych. Eliminacja U22 snoRNA za pomocą oligodeoksynukleotydów komplementarnych do sekwencji zawartych między 37.–53. oraz 53.–67. nt i następnie trawienie dupleksów RNA-DNA za pomocą RNazy H powoduje zmiany poziomu intermediatów obróbki pre-rRNA. W takich warunkach hamowana jest przemiana pre-rRNA w obrębie 3' i 5' zakończeń łańcucha 18S rRNA. W cytoplazmie oocytów nie wykrywa się dojrzałej formy 18S rRNA, zaś w jądrze komórkowym obserwuje się nagromadzenie prekursorowej formy 20S pre-rRNA. Efektem wtórnym wykluczenia tego U snoRNA jest spadek poziomu 36S pre-rRNA oraz powstających z niego 28S rRNA i 5,8S rRNA. Nie obserwuje się natomiast zakłóceń przemiany w obrębie 5'ETS [22, 97] (por. rys. 6).

### 3.5. 7–2 RNA

Unikatowy 7-2 RNA występuje jako składnik RNazy MRP, która wykazuje aktywność w dwóch przedziałach subkomórkowych, tj. w mitochondriach oraz w jąderkach (obszary GC i wakuole) [34, 37, 106]. Mitochondrialny enzym uczestniczy w usuwaniu starterowego RNA podczas replikacji mDNA [37, 53, 77]. Aktywność endonukleolityczna jąderkowej RNazy MRP wymaga obecności zarówno RNA, jak i białek, wśród których zidentyfikowano: POP1, POP2, SNM1, RRP5 oraz antygen Th-40 [53, 54, 61, 62, 77, 80, 93]. Długość łańcucha 7–2 RNA wchodzącego w skład kompleksu rybonukleoproteinowego waha się od 260 do 340 nt w świecie roślin i zwierząt [61]. Część centralną cząsteczki stanowi konserwatywna ewolucyjnie struktura w kształcie klatki (ang. *cage-shape*), zaś fragmenty zawarte między 72.–78. nt i 244.–249. nt formują pseudo-węzeł (ang. *pseudo-knot*) [43].

Antygen Th-40 wiąże się bezpośrednio z 7–2 MRP RNA tego wyjątkowego enzymu. Metodą tworzenia wiązań krzyżowych pod wpływem psoralenu i światła UV stwierdzono, że w oddziaływaniu z tym białkiem zaangażowany jest segment

7–2 RNA zawarty między 15. a 86. nt, który tworzy w tym regionie charakterystyczną strukturę pień-pętla [77]. Należy podkreślić, że między 66. a 76. nt opisywanego RNA znajduje się jedyny konserwatywny motyw sekwencyjny, który jest obecny również w RNA RNazy P.

Modelowe doświadczenia prowadzone *in vitro* oraz w komórkach drożdży *S. cerevisiae* wskazują na udział RNazyMRP w powstawaniu dojrzałej formy 5,8S rRNA [17, 53, 80, 93]. U drożdży tych występują dwie formy 5,8S, tj. S i L; ta druga jest dłuższa o 7–8 nt [53, 61]. Wydaje się, że RNaza MRP może stanowić zmienioną w toku ewolucji formę RNazy P, wyspecjalizowaną w tworzeniu 5,8S rRNA [43, 77, 93]. U *Archaeobacteria*, *Eubacteria* i *Eukaryota* RNaza P uczestniczy głównie w obróbce 5' końca pre-tRNA (cyt. wg [77]). U *Prokaryota* geny t-RNA znajdują się między sekwencjami kodującymi 16S i 23S rRNA. Wiadomo z kolei, że u *Eukaryota* w analogicznym regionie rDNA znajduje się informacja dla 5,8S rRNA [43, 77].

#### 4. UWAGI KOŃCOWE

Dynamiczny postęp badań nad podklasą niskocząsteczkowych jąderkowych RNA doprowadził do wykrycia, obok snoRNA kodowanych przez niezależne macierzyste geny, tzw. antysensownych snoRNA, dla których informacja genetyczna tkwi w intronach genów białek, które związane są z aktywnością jąderek czy biogenezą rybosomów. Zagadnienie koordynacji ekspresji genów, które wykorzystują informację ich eksonów i intronów jest poznane zaledwie w zarysach i wymaga wnikliwych badań. Można oczekiwać, że lista nowych rodzajów antysensownych snoRNA nie została jeszcze zamknięta. Jedną z pełnionych przez te unikatowe RNA funkcji wiąże się z "wyznaczaniem" miejsc metylacji w transkryptach polimerazy RNA I. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że poszczególne antysensowne snoRNA kierują "naznaczaniem" jednego tylko miejsca ich metylacji (a w rRNA kręgowców jest ponad 100 takich miejsc). Prawdziwą zagadką jest również pochodzenie genetyczne U snoRNA kodowanych w intronach genów białek. Zidentyfikowane dotychczas antysensowne snoRNA występują u kręgowców, podczas gdy snoRNA drożdży reprezentują cząsteczki głównie kodowane przez niezależne geny. Stąd rodzi się pytanie, czy drożdże pozostały w tyle w nabywaniu zbliżonej organizacji genów transkrybowanych przez polimerazę RNA II jak u kręgowców, czy reprezentują pierwsze organizmy, które wykształciły niezależne geny dla kodowania własnych snoRNA?

Na zakończenie należy podkreślić, że wszystkie snoRNA funkcjonują w komórkach wyłącznie w połączeniu z odpowiednimi białkami – w postaci kompleksów snoRNP. Właściwości i funkcje białek zdolnych do interakcji z jąderkowymi RNA przekraczają ramy niniejszego artykułu i wymagają oddzielnego opracowania.

## Podziękowanie

Autorzy pragną podziękować Panu mgr Janowi Gierakowi za przygotowanie wydruku komputerowego pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON J, ZIEVE GW. Assembly and intracellular transport of snRNP particles. *BioEssay* 1991; **13**: 57–64.
- [2] BACHELLERIE JP, MICHOT B, NICOLOSO M, BALAKIN A, NI J, FOURNIER JM. Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *TIBS* 1995; **20**: 261–264.
- [3] BACHELLERIE JP, NICOLSO M, QU LH, MICHOT B, CAIZERQUES-FERRER M, CAVAILLÉ J, RENALIER MH. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs with long sequence complementarities to mature rRNAs involved in ribosome biogenesis. *Bioch Cell Biol* 1995; **73**: 835–843.
- [4] BALAKIN AG, LEMPICKI RA, HUANG GM, FOURNIER MJ. *Saccharomyces cerevisiae* U14 small nuclear RNA has little secondary structure and appears to be produced by post-transcriptional processing. *J Biol Chem* 1994; **269**: 739–746.
- [5] BALAKIN AG, SMITH L, FOURNIER MJ. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 1996; **86**: 823–834.
- [6] BASERGA SJ, YANG XD, STEITZ JA. An intact box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs. *EMBO J* 1991; **10**: 2645–2651.
- [7] BASERGA SJ, GILMORE HM, YANG XW. Distinct molecular signals for nuclear import of the nucleolar snRNA, U3. *Genes Dev* 1992; **6**: 1120–1130.
- [8] BASERGA SJ, STEITZ JA. The diverse world of small ribonucleoproteins [w]: The RNA world, ed. RF Gesteland, JF Atkins, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1993, 359–381.
- [9] BELTRAME M, TOLLERVEY D. Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J* 1992; **11**: 1531–1542.
- [10] Beltrame M, Henry Y, Tollervey D. Mutational analysis of an essential binding site for the U3 snoRNA in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-rRNA. *Nucl Acid Res* 1994; **22**: 5139–5147.
- [11] BELTRAME M, TOLLERVEY D. Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J* 1995; **14**: 4350–4356.
- [12] BEVEN AF, LEE R, RAZAZ M, LEADER DJ, BROWN JWS, SHAW PJ. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1241–1251.
- [13] CAFFARELLI E, FRAGAPANE P, GEHRING C, BOZZONI I. The accumulation of mature RNA for the *X.laevis* ribosomal protein L1 is controlled at the level of splicing and turnover of the precursor RNA. *EMBO J* 1987; **6**: 3493–3498.
- [14] CAFFARELLI E, FATICA A, PRISLEI S, De GREGORIO E, FRAGAPANE P, BOZZONI I. Processing of the intron-encoded U16 and U18 snoRNAs: the conserved C and D boxes control both the processing reaction and the stability of the mature snoRNA. *EMBO J* 1996; **15**: 1121–1131.

- [15]CAVAILLÉ J, BACHELLERIE JP. Processing of fibrillar-in-associated snoRNAs from pre-mRNA introns: An exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochimie* 1996a; **78**: 443–456.
- [16]CAVAILLÉ J, NICOLSO M, BACHELLERIE J-P. Targeted ribose methylation of RNA *in vivo* directed by tailored antisense RNA guides. *Nature* 1996b; **383**: 732–735.
- [17]CHU S, ARCHER RH, ZEGEL JM, LINDAHL L. The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 659–663.
- [18]CECCONI F, MARIOTTINI P, LORENI F, PIERANDREI-AMALDI C, CAMPIONI N, AMALDI F. U17<sup>XS8</sup>, a small nucleolar RNA with a 12 nt complementarity to 18S rRNA and coded by a sequence repeated in the six introns of *Xenopus laevis* ribosomal protein S8 gene. *Nucl Acid Res* 1994; **22**: 732–741.
- [19]CERDIDO A, MEDINA FJ. Sub-nucleolar location of fibrillar-in and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plant cells. *Chromosoma* 1995; **103**: 625–634.
- [20]CLARK MW, YIP MLR, CAMPBELL J, ABELSON J. SSB-1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a nucleolar-specific silver-binding protein that is associated with the snR10 and snR11 small nuclear RNAs. *J Cell Biol* 1991; **111**: 1741–1751.
- [21]CRAIG N, KASS S, SOLLNER-WEBB B. Nucleotide sequence determining the first cleavage site in the processing of mouse precursor rRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 629–633.
- [22]DUNBAR DA, WARE VC, BASERGA SJ. The U18 snRNA is not essential for pre-rRNA processing in *Xenopus laevis*. *RNA* 1996; **2**: 324–333.
- [23]EICHLER DC, CRAIG N. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Progr Nucl Acid Res Mol Biol* 1994; **49**: 197–239.
- [24]EICHLER DC. Characterization of a nucleolar 2-O-methyltransferase mouse precursor ribosomal RNA. *Biochimie* 1994; **76**: 1115–1122.
- [25]ELELA SA, IGEL H, ARES M Jr. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at U3 snoRNP – dependent site. *Cell* 1996; **85**: 115–124.
- [26]FILIPOWICZ W, KISS T. Structure and function of nucleolar snRNPs. *Mol Biol Rep* 1993; **18**: 149–156.
- [27]FOURNIER MJ, MAXWELL SE. The nucleolar snRNAs: catching up with spliceosomal snRNAs. *TIBS* 1993; **18**: 131–135.
- [28]FRAGAPANE P, PRISLEY S, MICHIZENZI A, CAFFARELLI E, BOZZONI I. A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *EMBO J* 1993; **12**: 2921–2928.
- [29]HAAFT, HAYMAN DL, SCHMID M. Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res* 1991; **193**: 78–86.
- [30]HADJIOLOV AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. Wien, New York: Springer-Verlag 1985, 1–268.
- [31]HENRY Y, WOOD H, MORRISSEY JP, PETFALSKI E, KEARSEY S, TOLLERVEY D. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonuclease from an upstream cleavage site. *EMBO J* 1994; **13**: 2452–2463.
- [32]HOZAK P, COOK PR, SCHOEFER C, MOSGOLLER W, WACHTLER F. Site of transcription of ribosomal RNA and intranuclear structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 639–648.
- [33]HUANG GM, JARMOLOWSKI A, STRUCK JCR, FOURNIER MJ. Accumulation of U14 small nuclear RNA in *Saccharomyces cerevisiae* requires box C, box D, and a 5', 3' terminal stem. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 4456–4463.
- [34]JACOBSON MR, CAO LG, WANG YL, PEDERSON T. Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J Cell Biol* 1995; **131**: 1649–1658.
- [35]KASS S, TYC K, STEITZJA, SOLLNER-WEBB B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 1990; **60**: 897–908.



- [36]KEMPERS-VEENSTRA AE, OLIEMANS J, OFFENBERG H, DEKKER AF, PIPER PW, PLANTA RJ, KLOOTWIJK J. 3'-end formation of transcripts from the yeast rRNA operon. *EMBO J* 1986; **10**: 2703–2710.
- [37]KISS T, MARSHALLSAY C, FILIPOWICZ W. 7-2/MRP RNA in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J* 1992; **11**: 3737–3746.
- [38]KISS T, FILIPOWICZ W. Small nucleolar RNAs encoded by introns of the human cell cycle regulatory gene *RCC1*. *EMBO J* 1993; **12**: 2913–2920.
- [39]KISS T, BORTLIN M-L, FILIPOWICZ W. Characterization of the intron-encoded U19 RNA, a new mammalian small nucleolar RNA that is not associated with fibrillar. *Mol Cell Biol* 1996a; **16**: 1391–1400.
- [40]KISS-LÁSZLÓ Z, HENRY Y, BACHELLERIE J-P, CAIZERGUES-FERRER M, KISS T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 1996b; **85**: 1077–1088.
- [41]LANE BG, OFENGAND J, GRAY MW. Pseudouridine and O<sup>2</sup>-methylated nucleotides: significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins. *Biochemie* 1995; **77**: 7–15.
- [42]LARSON DE, ZAHRADKA P, SELLS BH. Control points in eucaryotic ribosome biogenesis. *Biochem Cell Biol* 1991; **69**: 5–22.
- [43]LEE B, MATERA GA, WARD DC, CRAFT J. Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered structures in the nucleolus: a possible coordinate role in ribosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 11471–11476.
- [44]LERNER MR, STEITZ JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with protein are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 5495–5499.
- [45]LEVERETTE RD, ANDREWS MT, MAXWELL ES. Mouse U14 snRNA is a processed intron of the cognate hsc 70 heat shock pre-messenger RNA. *Cell* 1992; **71**: 1215–1221.
- [46]LI HV, FOURNIER MJ. U14 function in *Saccharomyces cerevisiae* can be provided by large variations of yeast U14 and hybrid mouse-yeast U14 RNAs. *EMBO J* 1992; **11**: 683–689.
- [47]LIANG WQ, FOURNIER MJ. U14 base-pairs with 18S rRNA: a novel snoRNA interaction required for rRNA processing. *Genes Dev* 1995; **9**: 2433–2443.
- [48]LINDAHL L, ARCHER RH, ZENGEL JM. Alternate pathways for processing in the internal transcribed spacer 1 in pre-rRNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acid Res* 1994; **22**: 5399–5407.
- [49]LIU J, MAXWELL ES. Mouse U14 snRNA is encoded in an intron of the mouse cognate hsc70 shock gene. *Nucl Acid Res* 1990; **18**: 6565–6571.
- [50]Liu Q, Dreyfuss G. *In vivo* and *in vitro* arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2800–2808.
- [51]LÜBBEN B, MARSHALLSAY CH, ROTTMANN N, LÜHRMAN R. Isolation of U3 snoRNP from CHO cells: a novel 55 kDa protein binds to the central part of U3 snoRNA. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 5377–5385.
- [52]LÜBBEN B, FABRIZIO P, KASTNER B, LÜHRMAN R. Isolation and characterization of the small nucleolar ribonucleoprotein particle snR30 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11549–11554.
- [53]LYGEROU Z, MITCHELL P, PETFALSKI E, SERAPHIN B, TOLLERVEY D. The *POP1* gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins. *Genes Dev* 1994; **8**: 1423–1433.
- [54]LYGEROU Z, ALLMANG CH, TOLLERVEY D, SERAPHIN B. Accurate processing of a *Eukaryotic* precursor of ribosomal RNA by ribonuclease MRP *in vitro*. *Science* 1996; **272**: 268–270.

- [55]LYGEROU Z, PLUK H, van VENROOIJ WJ, SERAPHIN B. hPOP1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J* 1996; **15**: 5936–5948.
- [56]MADEN BEH. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1990; **39**: 241–303.
- [57]MASER RL, CALVET JP. U3 small nuclear RNA can be psoralen-cross-linked *in vivo* to the 5'external transcribed spacer of pre-ribosomal-RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6523–6527.
- [58]MATERA GA, TYCOWSKI KT, STEITZ JA, WARD DC. Organization of small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs) by fluorescence *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Mol Biol Cell* 1994; **5**: 1289–1299.
- [59]MATTAJ IW. Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* 1986; **46**: 905–911.
- [60]MATTAJ IW, TOLLERVEY D, SERAPHIN B. Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. *FASEB J* 1993; **7**: 47–73.
- [61]MAXWELL ES, FOURNIER MJ. The small nucleolar RNAs. *Ann Rev Biochem* 1995; **35**: 895–934.
- [62]MELESE T, XUE Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 319–324.
- [63]MORRISSEY JP, TOLLERVEY D. Birth of the snoRNPs – the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA processing system. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 78–82.
- [64]MOUGEY EB, PAPE LK, SOLLNER-WEBB B. A U3 small nuclear ribonucleoprotein-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5990–5998.
- [65]NICOLOSO M, QU L-H, MICHOT B, BACHALLERIE J-P. Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs. *J Mol Biol* 1996; **260**: 178–195.
- [66]NILSEN TW. RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell* 1994; **78**: 1–4.
- [67]OLSON MOJ. The eukaryotic nucleus [w:] Molecular Biochemistry and Macromolecular Assemblies, red. PR Strauss, SH Wilson, Telford Press, Caldwell, NY, 1989, 519–559.
- [68]PARKER KA, BRUZIK JB, STEITZ JA. An *in vitro* interaction between the human U3 snRNP and 28S rRNA sequences near the -sarcin site. *Nucl Acids Res* 1988; **16**: 10493–10509.
- [69]PECULIS BA, STEITZ JA. Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 1993; **73**: 1223–1245.
- [70]PECULIS BA, STEITZ JA. Sequence and structural elements critical for U8 snRNP function in *Xenopus* oocytes are evolutionarily conserved. *Genes Develop* 1994; **8**: 2241–2255.
- [71]PIKAARD CS, PAPE LK, HENDERSON SL, RYAN K, PAALMAN MH, LOPATA MA, REEDER RH, SOLLNER-WEBB B. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 4816–4825.
- [72]POTTER S, DUROVIC P, DENNIS PP. Ribosomal RNA precursor processing by a *Eukaryotic* U3 small nucleolar RNA-like molecule in an Archaeon. *Science* 1995; **268**: 1056–1060.
- [73]PRISLEY S, FATICA A, De GREGORIO E, ARESE M, FRAGAPANE P, CAFFARELLI E, PRESUTTI C, BOZZONII. Self-cleaving motifs are found in close proximity to the sites utilized for U16 snoRNA processing. *Gene* 1995; **163**: 221–226.
- [74]PUVION-DUTILLEUL F, MAZAN S, NICOLOSO M, CHRISTENSEN ME, BACHALLERIE JP. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol* 1991; **56**: 178–186.
- [75]QU LH, HENRY Y, NICOLOSO M, MICHOT B, AZUM MC, RENALIER MH, CAIZERGUES-FERRER M, BACHELLERIE JP. U24, a novel intron encoded small nucleolar RNA with two 12 nt long, phylogenetically conserved complementarities to 28S rRNA. *Nucl Acids Res* 1995; **23**: 2669–2676.

- [76] RASKA I. Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *J Cell Biochem* 1995; **59**: 11–26.
- [77] REDDY R, SHIMBA S. Structural and functional similarities between MRP and RNase P. *Mol Biol Rep* 1996; **22**: 81–85.
- [78] SAMARSKY DA, SCHNEIDER GS, FOURNIER MJ. An essential domain in *Saccharomyces cerevisiae* U14 snoRNA is absent in vertebrates, but conserved in other yeasts. *Nucl Acid Res* 1996; **24**: 2059–2066.
- [79] SAVINO R, GERBI SA. *In vivo* disruption of *Xenopus* U3 snRNA affects ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1990; **9**: 2299–2308.
- [80] Schmitt ME, Clayton DA. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7935–7941.
- [81] Shanab G, Maxwell ES. Proposed secondary structure of eukaryotic U14 snoRNA. *Nucl Acids Res* 1991; **19**: 4891–4894.
- [82] Sharp PA. Split genes and RNA splicing. *Cell* 1994; **77**: 805–815.
- [83] Shaw PJ, Jordan EG. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 93–121.
- [84] SHIMBA S, BUCKLEY B, REDDY R, KISS T, FILIPOWICZ W. Cap structure of U3 small nucleolar RNA in animal and plant cells is different, gamma-monomethyl phosphate cap structure in plant RNA. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13772–13777.
- [85] SOLLNER-WEBB B. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 1993; **75**: 403–405.
- [86] STEITZ JA, TYCOWSKI KT. Small RNA chaperones for ribosome biogenesis. *Science* 1995; **270**: 1626–1627.
- [87] STROKE IL, WEINER AM. The 5' end of U3 snoRNA can be crosslinked *in vivo* to the external transcribed spacer of rat ribosomal RNA precursors. *J Mol Biol* 1989; **210**: 497–512.
- [88] SWAT W, BUŁAJ G, SZOPA J. Ekspresja eukariotycznych genów rDNA. *Post Biochem* 1990; **36**: 4–13.
- [89] TARN W-Y, STEITZ JA. A novel spliceosome containing U11, U12 and U5 snRNPs excises a minor class (AT-AC) intron *in vitro*. *Cell* 1996; **84**: 801–811.
- [90] TERNS MP, DAHLBERG JE. Retention and 5' cap trimethylation of U3 snRNA in the nucleus. *Science* 1994; **264**: 959–961.
- [91] TERNS MP, GRIMM C, LAUD E, DAHLBERG JE. A common maturation pathway for small nucleolar RNAs. *EMBO J* 1995; **14**: 4860–4871.
- [92] TOLLERVEY D, LEHTONEN H, JANSEN R, KERN H, HURT EC. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillar in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 1993; **72**: 443–457.
- [93] TOLLERVEY D. Genetic and biochemic analyses of yeast RNase MRP. *Mol Biol Rep* 1996; **22**: 75–79.
- [94] TYC K, STEITZ JA. U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J* 1989; **8**: 3113–3118.
- [95] TYC K, STEITZ JA. A new interaction between the mouse 5 external transcribed spacer of pre-rRNA and U3 snRNA detected by psoralen crosslinking. *Nucl Acid Res* 1992; **20**: 5375–5382.
- [96] TYCOWSKI KT, SHU MD, STEITZ JA. A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal proteins S3. *Genes Dev* 1993; **7**: 1176–1190.
- [97] TYCOWSKI KT, SHU MD, STEITZ JA. Requirement for intron-encoded U22 small nucleolar RNA in 18S ribosomal RNA maturation. *Science* 1994; **266**: 1558–1561.
- [98] TYCOWSKI KT, SHU MD, STEITZ JA. A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature* 1996; **379**: 464–466.
- [99] VANCE VB, THOMPSON AE, BAUMAN LH. Transfection of mouse ribosomal DNA into rat cells; faithful transcription and processing. *Nucl Acid Res* 1985; **13**: 7499–7513.

- [100] Van NUES RW, VENEMA J, RIENTJES JMJ, DIRKS-MULDER A, RAUE HA. Processing of eukaryotic pre-rRNA: the role of the transcribed spacers. *Biochem Cell Biol* 1995; **73**: 789–801.
- [101] VENEMA J, TOLLERVEY D. Two distinct recognition signals define the site of endonucleolytic cleavage at the 5' end of yeast 18S rRNA. *EMBO J* 1995; **14**: 4883–4892.
- [102] VENEMA J, TOLLERVEY D. RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. *EMBO J* 1996; **15**: 5701–5714.
- [103] WEIPOLTSHAMMER K, SCHÖFER C, WACHTLER F, HOZAK P. The transcription unit of ribosomal genes is attached to the nuclear skeleton. *Exp Cell Res* 1996; **227**: 374–379.
- [104] WILCZYŃSKI G. Ultrastrukturalne i molekularne aspekty ekspresji jądrowych genów rRNA. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 73–100.
- [105] WILL CL, FABRIZIO P, LÜHRMANN R. Nuclear pre-mRNA splicing. *Nucl Acid Molec Biol* 1995; **9**: 342–372.
- [106] YUAN Y, SINGH R, REDDY R. Rat nucleolar 7-2 RNA is homologous to mouse mitochondrial RNase mitochondrial RNA-processing RNA. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14835–14839.
- [107] ZAGÓRSKI J, TOLLERVEY D, FOURNIER M. Characterization of an SNR gene locus in *Saccharomyces cerevisiae* that specifies both dispensible and essential small nuclear RNAs. *Mol Cell Biol* 1988; **8**: 3282–3290.

Redaktor prowadzący: Maria Olszewska

Otrzymano: 10.03.1997 r.

Przyjęto: 20.03.1997 r.

Adres autorów: 90-237 Łódź, ul. S. Banacha 12/16

## KOMÓRKI GRZEBIENIA NERWOWEGO I. POWSTAWANIE I MIGRACJA

### NEURAL CREST CELLS I. DEVELOPMENT AND MIGRATION

Zofia Bielańska-Osuchowska

Zakład Histologii i Embriologii. Wydziału Weterynaryjnego  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

*Streszczenie:* W artykule przedstawiono powstawanie, migrację oraz różnicowanie się komórek grzebienia nerwowego. Grzebień nerwowy jest przejściową strukturą w rozwoju zarodków kręgowców. Powstaje z grzbietowej części cewy nerwowej. Komórki grzebienia nerwowego migrują określonymi szlakami do różnych okolic ciała zarodka i różnicują się w wiele różnorodnych typów komórek włącznie z neuronami, komórkami glejowymi, komórkami tkanki łącznej, melanocytami. W części I omówiono właściwości poszczególnych szlaków migracji oraz rolę ECM w migracji komórek grzebienia nerwowego.

*Słowa kluczowe:* rozwój zarodkowy, grzebień nerwowy, migracja

*Summary:* The paper reviews the life story of neural crest. The neural crest is a transient embryonic structure, that in vertebrates originates from dorsal region of the neural tube. Neural crest cells migrate from the neural tube along the particular pathways to different locations in embryo and differentiate into a variety of specific cell types including neurons, glial cells, connective tissue cells and melanocytes. In part I the feature of particular migration pathways and the role of ECM in migration of neural crest cells are discussed.

*Key words:* embryonic development, neural crest, migration

*Wykaz stosowanych skrótów:* **DIL** (1,1-dioctadecyl 3,3,3',3'tetramethyl indocarbocyanine perchlorate) – barwnik przyżyciowy; **ECM** (extracellular matrix) – podstawowa substancja międzykomórkowa; **FGF** (fibroblast growth factor) – fibroblastyczny czynnik wzrostu; **FN** – fibronektyna **GN** – grzebień nerwowy; **HA** (hyaluronic acid) – kwas hialuronowy; **HNK-1** (human natural killer -1) – antygen powierzchniowy na subpopulacji ludzkich limfocytów NK, wykrywany przeciwciałem Leu-7; **KN** – komórki grzebienia nerwowego; **N-CAM** (neural cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezyjna komórki nerwowej; **PK-C** – kinaza białkowa C; **r** – rombomer; **TGF** (transforming growth factor) – transformujący czynnik wzrostowy

## 1. WSTĘP

W każdym podręczniku embriologii wspomniane są grzebienie nerwowe i mniej lub bardziej szczegółowo wymienione są komórki z nich się wywodzące [5, 51]. Grzebień nerwowy jest strukturą przejściową występującą na początku gastrulacji u zarodków kręgowców. Z komórek grzebieni nerwowych – **KGN** wywodzi się następnie wiele rodzajów komórek zarówno nerwowych, glejowych, tkanki łącznej, szkieletowych, endokrynowych, jak i barwnikowych. W ostatnich kilku latach komórki pochodzące z grzebienia nerwowego wzbudzają coraz większe zainteresowanie, czego dowodem jest pojawienie się wielu prac na ich temat. Są one dogodnym modelem do badań nad różnicowaniem się komórek, ponieważ początkowo multipotencjalne komórki różnicują się w wielu kierunkach zarówno pod wpływem środowiska, jak i różnych czynników biologicznie aktywnych, mają też zdolność migracji na duże odległości. Są one łatwe do odróżnienia od innych komórek zarodka dzięki obecności na nich markera, jakim jest epitop HNK-1 [12, 23, 57 ii]. Szereg wad rozwojowych i nowotworów ma związek z nieprawidłowym rozwojem KGN.

Badania nad KGN są prowadzone głównie na zarodkach ptaków i ssaków, ostatnio także wiele prac dotyczy rozwoju i różnicowania się tych komórek u płazów i ryb. Do badań tych stosowane są różne metody, takie jak: znakowanie poszczególnych komórek *in vivo*, hodowla całych zarodków lub ich części, izolowanych komórek *in vitro* i inne obecnie dostępne. Ograniczę się do omówienia wyników badań nad KGN ptaków i ssaków.

## 2. ROZWÓJ GRZEBIENA NERWOWEGO

Na początku neurulacji u zarodków kręgowców w czasie zamykania się cewy nerwowej fałdy nerwowe oddzielają się od ektodermy naskórkowej i zrastają się ze sobą [5, 8, 51] (rys. 1). W fałdach nerwowych komórki są ściśle ułożone, tworząc nabłonek nie odróżniający się morfologicznie od pozostałej neuroektodermy, mają one jednak zdolność migracji. Komórki te wysuwają się ze ściany cewy nerwowej, tworząc wzdłuż linii fuzji fałdów nerwowych pasmo równoległe do jej długiej osi – **grzebień nerwowy** (*crista neuralis*) – **GN** (rys. 1D). GN tworzy się wzdłuż całej cewy nerwowej, z wyjątkiem jej przedniego końca przyszłego zawiązka kresomózgowia, w takiej kolejności, jak sukcesywnie się ona zamyka. Niedługo po tym komórki grzebienia nerwowego – **KGN** zaczynają rozchodzić się symetrycznie po obu bokach cewy nerwowej (rys. 1E) [20 i inni].

### 3. MIGRACJA KOMÓREK GRZEBIENIA NERWOWEGO

#### 3.1. Kierunki migracji komórek grzebieni nerwowych

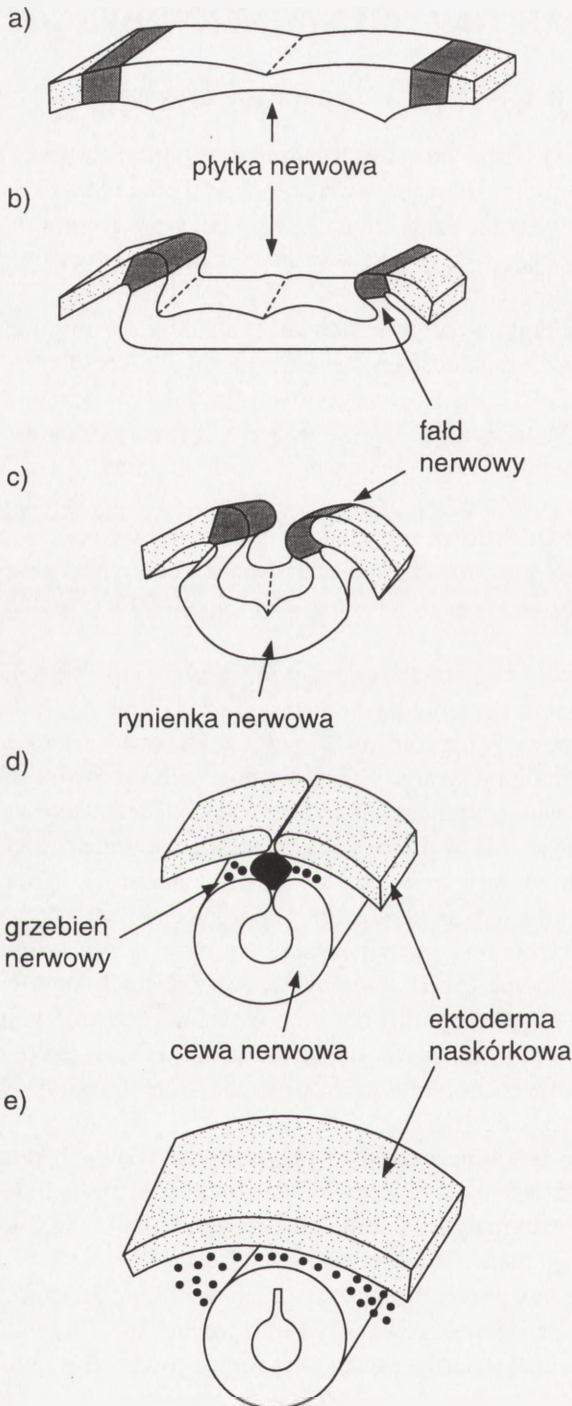
Przebieg migracji KGN najlepiej został poznany u zarodków kury i przepiórki japońskiej, dzięki przeprowadzonym przeszczepom poszczególnych odcinków cewy nerwowej w ektotopowe miejsca [29,ii] oraz dzięki znaczeniu pojedynczych komórek barwnikami przyżyciowymi, takimi jak np. Dil, czy wyznacznikami genetycznymi [7, 52 ii].

KGN migrują ze wszystkich odcinków cewy nerwowej, charakter tej migracji zależy od odcinka cewy, od miejsca ostatecznego osiedlenia się i zakresu zróżnicowania tych komórek. Wzdłuż osi czaszkowo-ogonowej zarodka wyodrębnia się kilka różnych populacji KGN. Są to: **czaszkowe** migrujące z pęcherzyków mózgowych, **wagalne** migrujące z odcinka cewy nerwowej zawartego między 1 a 7 somitem (obejmującego ostatnie rombomery z okolic przyszłego nerwu błędnego i rdzeń przedłużony) [1, 29] oraz **tułowiowe** migrujące z pozostałej części cewy nerwowej (rys. 2). Większość KGN przesuwa się po obu stronach cewy nerwowej tak zwanym **szlakiem brzuszny**m, część natomiast wsuwa się pod ektodermę naskórkową na **szlak boczny**.

KGN pochodzące z tyłomózgowia i rdzenia kręgowego migrują w formie segmentalnych pasm, zwanych segmentami grzebienia, podczas gdy z przodomózgowia i z śródmózgowia migrują jako warstwa. W obrębie tułowiowej części cewy nerwowej obecność somitów narzuca segmentalną migrację KGN. Na migrację i rozwój czaszkowych KGN wpływa ukształtowanie pęcherzyków mózgowych. Pierwsze dwa, przodomózgowie i międzymózgowie, nie wykazują segmentacji, natomiast w tyłomózgowiu wyróżnia się przejściowo serię powtarzających się segmentów – **rombomerów** – r w liczbie 7 u ssaków i 8 u ptaków (r1 do r8). Granice między nimi są widoczne jako płytkie wgłębienia i charakteryzują się mniejszą gęstością komórek. Komórki z sąsiednich rombomerów nie mieszają się ze sobą, każdy stanowi odrębny przedział, dający początek określonej linii komórek. W późniejszym rozwoju zarodka w tyomózgowiu wtórnym segmentacja ta zostaje zatarta, odbija się w jedynie w rozmieszczeniu zwojów czuciowych nerwów czaszkowych, które powstają w co drugim rombomerze (rys. 3) [31, 32, ii].

Czaszkowe KGN różnicują się w zwoje czuciowe nerwów czaszkowych oraz zasiedlają łuki skrzelowe i przekształcają się w komórki **mezoektodermalne**, stanowiące specyficzną tkankę mezenchymatyczną. Daje ona początek tkance łącznej i jej pochodnym oraz miocytom gładkim w obrębie głowy [tab. I] [5, 51].

Migracja KGN z pęcherzyków mózgowych rozpoczyna się w rejonie śródmózgowia, a następnie z tylnej części przodomózgowia i tyłomózgowia [18]. Pierwsze KGN ze śródmózgowia wędrują pod ektodermą ponad przodomózgowiem ku przodowi ptaków, a bocznie u myszy i zasiedlają I łuk skrzelowy. Następnie dołączają

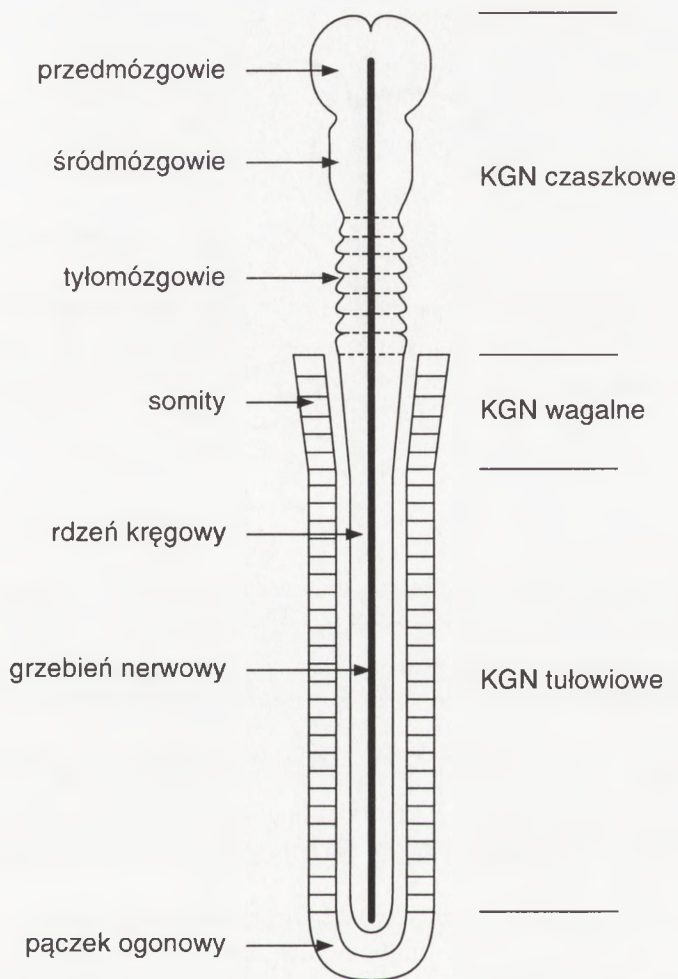


do nich KGN powstające na tylnej części przodomózgowia (późniejsze międzymózgowie – rys.3). W drugiej fali migracji KGN ze śródmózgowia przesuwały się po szypule ocznej. Część z nich tworzy zwój rzęskowy, część wsuwa się pomiędzy brzeg kubka ocznego i soczewkę, gdzie tworzą one nabłonek wewnętrzny i macierz rogówki oka [18].

W obrębie tyłomózgowia KGN przesuujące się bezpośrednio po ścianie cewy nerwowej dają początek zwojom czuciowym nerwów czaszkowych, pozostałe KGN zasiedlają łuki skrzelowe (tab. 1). KGN wysuwają się oddzielnie z każdego rombomeru, ale szybko łączą się w trzy oddzielne strumienie. Początkowo sądzono, że r3 i r5 nie wytwarzają KGN [49, 55]. Po przeprowadzeniu badań ze znakowaniem przyżyciowym pojedynczych komórek w tyłomózgowiu, wykazano jednak powstawanie KGN emigrujących bardzo wcześnie z r3 i r5. Przesuwają się one ku przodowi i ku tyłowi dołączając do KGN migrujących z sąsiednich rombomerów [7, 54] (rys. 4). Ponadto z r3 migruje

Rys. 1. Schemat rozwoju grzebienia nerwowego u zarodków kręgowców: a – e kolejne stadia

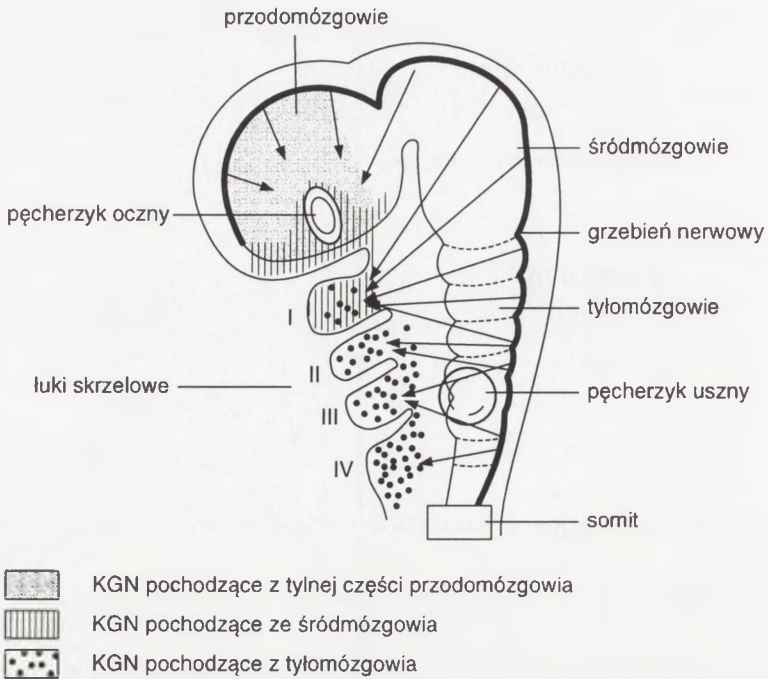




Rys. 2. Podział grzebienia nerwowego na odcinki wzdłuż osi czaszkowo-ogonowej zarodka

znacznie mniej komórek niż z pozostałych rombomerów, gdyż ulegają one częściowo apoptozie [40, 55].

KGN z r1, r2 i przedniej części r3 przesuwają się pierwszym strumieniem do I łuków skrzelowych oraz uczestniczą w formowaniu zwojów czuciowych nerwów trójdzielnych [V]. KGN z tylnej części r3 i następnego rombomeru r4 i przedniej części r5 wchodzi do drugiego strumienia i zasiedlają II łuki oraz tworzą zwoje czuciowe nerwów twarzowych [VII]. Trzeci strumień wywodzi się z rombomerów leżących do tyłu od pęcherzyka usznego [z tylnej części r5 i r6–r8]. Te KGN zasiedlają III i IV łuki skrzelowe oraz dają początek zwojom czuciowym nerwów językowo-gardłowych (IX) i nerwów błędnych (X) (rys. 4). Na poziomie pęcherzyka



Rys. 3. Schemat migracji komórek z grzebienia nerwowego z rejonu pęcherzyków mózgowych u zarodka ptaka

usznego KGN, przesuujące się w kierunku bocznym, płyną dwoma strumieniami przednim i tylnym rozdzielonymi przez pęcherzyk uszny, który wyraźnie hamuje ich ruch [7, 18, 47, 55].

Königes i Lumsden [26] na podstawie wszczepiania odpowiednich KGN przepiórki w miejsce poszczególnych rombomerów zarodka przedstawili szczegółową mapę ostatecznej lokalizacji i zróżnicowania pochodnych KGN. Wykazali, że w budowie poszczególnych elementów trzewioczaszki biorą udział pochodne zarówno I, jak i II łuków skrzelowych. Kolejność ich ułożenia jest taka jak macierzystych rombomerów; pochodne rombomerów przednich są zlokalizowane w wysuniętych ku przodowi częściach poszczególnych kości. Populacje KGN z każdego rombomeru są spójne przez cały okres ontogenezy i zasiedlają określony obszar. Między tymi obszarami nie ma jednak granic morfologicznych.

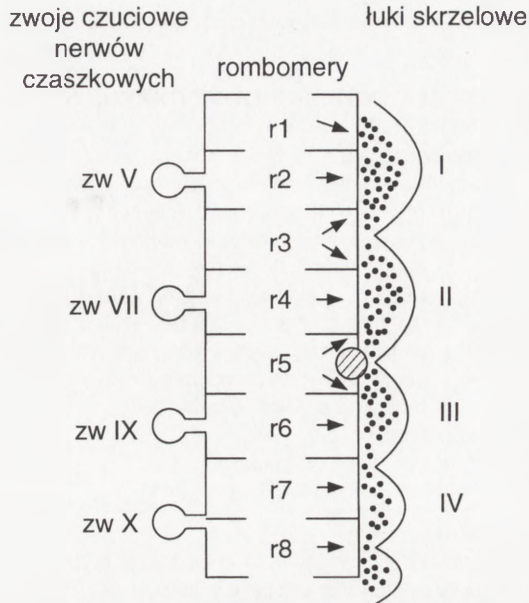
Wagalne KGN najliczniej emigrują z cewy nerwowej na poziomie 3–6 somitu. Część KGN z poziomu 1–4 somitu daje początek zwojom czuciowym nerwów błędnych X (stąd nazwa tego odcinka GN), inne z poziomu 1–5 somitu tworzą zwój szyjny górny [16]. Większość wagalnych KGN przemieszcza się jednak na znacznie dłuższe odległości. Zasiedlają one najpierw tylne łuki skrzelowe, gdzie część ich pozostaje dając ektomezoderme. Pozostałe migrują dalej, wnikają do me-

zodermy jelita zarodkowego rozpoczynając od okolic gardła i przesuując się aż do rejonu przyszłego jelita prostego. [17]. Tworzą one sploty nerwowe jelitowe. Według Le Douarin i Theillet [29] i niektórych autorów [16] końcowa część jelita zarodkowego ptaków zasiedlana jest przez KGN pochodzące z lędźwiowo-krzyżowego odcinka cewy nerwowej. Teza ta nie znalazła u innych potwierdzenia, chociaż nie można wykluczyć, że komórki glijowe towarzyszące neuronom splotów jelitowych pochodzą z tułowiowych KGN [1]. Część KGN z rejonu cewy nerwowej między pęcherzy-

kciem usznym a 4 somitem (1–3 somity) migruje przez III, IV i V łuki skrzелowe w kierunku serca. Uczestniczą w tworzeniu przegrody aortalno-płucnej i spiralnej w pniu tętniczym i stożku tętniczym serca, błony środkowej dużych naczyń serca, zwojów parasympatycznych serca (tab. 1) [23, 24, 33, 58].

U zarodków ssaków KGN z odcinka wagalnego wnikają także do ciała pozaskrzелowego i dają początek komórkom C (parafolikularnym) tarczycy oraz niektórym komórkom zrębu grasicy [53].

W części tułowiowej bardzo wyraźna jest migracja segmentalna KGN, odpowiadająca rozmieszczeniu somitów. U ptaków w każdym segmencie począwszy od wysokości 6 somitu ku tyłowi do 28 somitu wyraźne jest rozgraniczenie między szlakiem **brzusznym** a **bocznym** (rys. 5). KGN wędrujące brzusznie rozdzielają się na dwa strumienie. Jeden stosunkowo krótki przesuwa się między przednią częścią somitu a cewą nerwową, daje początek zwojom czuciowym tylnych korzonków nerwowych. Drugi wchodzi w przestrzeń między sąsiednimi somitami i wytwarza łańcuch zwojów sympatycznych pnia współczulnego, sploty nerwowe aorty grzbietowej i komórki chromafinowe (tab. 1). Komórki chromafinowe pochodzące KGN z odcinka między 18 a 28 somitem tworzą rdzeń nadnercza. [13, 18, 29 i inni]. KGN wędrujące bocznie pod ektodermą naskórkową ponad somitami rozpraszają się w mezenchymie skóry właściwej oraz w naskórku i stają się ko-



Rys. 4. Schemat podziału przedniej części tyłomózgowia na rombomery i kierunki migracji komórek grzebienia nerwowego do łuków skrzелowych (strzałki)

Tabela I. Zestawienie najważniejszych komórek i tkanek pochodzących z grzebienia nerwowego u ptaków i ssaków

---

## KOMÓRKI I TKANKI POCHODNE GRZEBIENIA NERWOWEGO

### SZLAK BRZUSZNY

#### rejon czaszkowy

neurony i komórki glejowe zwojów czuciowych nerwów czaszkowych V, VII, IX, X

mezoektoderma głowy – pochodne mezenchymalne łuków skrzelowych:

chrząstki i kości czaszki [większość]

tkanka łączna głowy

mięśnie gładkie głowy i gruczołów głowy

tkanka łączna pochodnych kieszonek skrzelowych (np. grasicy i przytarczyc)

tkanka łączna i mięśniowa ściany łuków aorty

opony mózgowe przodomózgowia

brodawki zębowe i odontoblasty

tkanka łączna oczodołu

mięśnie rzęskowy i zwieracz źrenicy

substancja właściwa i nabłonek tylny rogówki

---

#### rejon wagalny

neurony i komórki glejowe spłotów nerwowych jelitowych

komórki ciałek przyzwojowych szyjnych

komórki kalcitoninowe tarczycy

komórki tkanki łącznej przegrody aortalno-płucnej i spiralnej opuszki serca

---

#### rejon tułowiowy

układ nerwowy obwodowy:

neurony i komórki glejowe zwojów sympatycznych

neurony i komórki glejowe zwojów parasympatycznych

lemocyty (komórki Schwanna) nerwów obwodowych

komórki rdzenia nadnercza

komórki ciałek przyzwojowych

---

### SZLAK BOCZNY

melanocyty

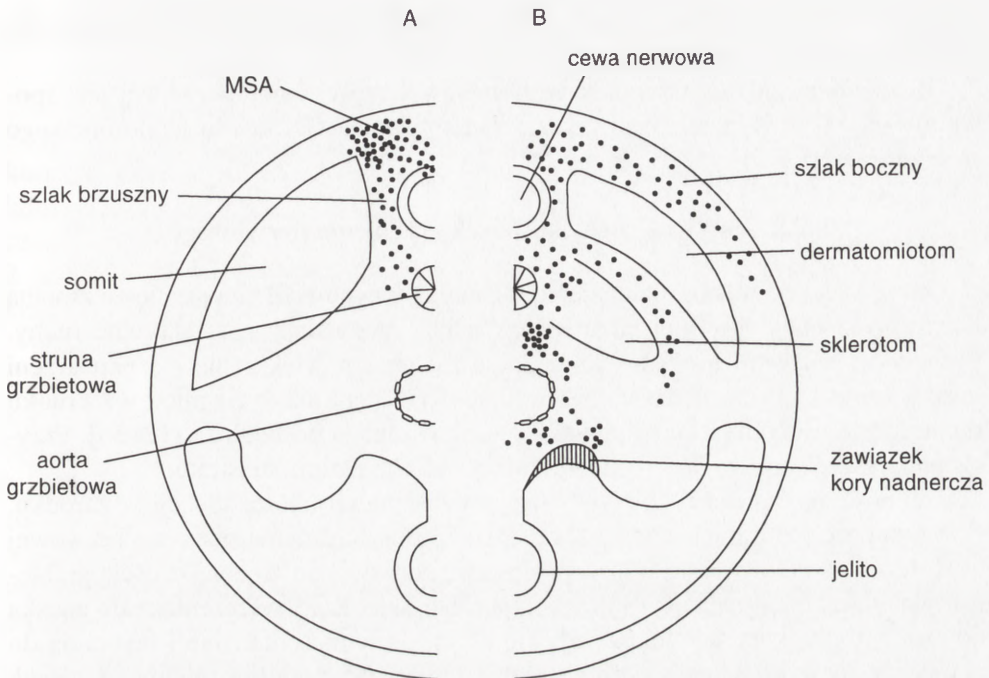
---

mórkami barwnikowymi – melanocytami (tab. 1). Migracja boczna zaczyna się u zarodków ptaków 24 godziny później niż brzuszna [19].

Różnice między powstawaniem i migracją KGN u zarodków ptaków i u zarodków myszy są niewielkie. Dotyczą one czasu rozpoczęcia migracji z odcinków czaszkowych cewy nerwowej, nie dotyczą szlaków migracji, docelowego osiedlenia się KGN i ich ostatecznego zróżnicowania [18, 22, 37, 46].

### 3.2. Mechanizm migracji komórek grzebienia nerwowego

KGN mają zdolność aktywnego ruchu *in vivo* oraz *in vitro*. Według niektórych autorów [20, 34], aby migracja KGN mogła się odbywać muszą być spełnione następujące warunki:



Rys. 5. Schemat migracji komórek z tułowiowego grzebienia nerwowego: **A** (lewa strona rysunku) – wczesne stadium migracji, **B** (prawa strona rysunku) – późne stadium migracji

- 1/ zanik przylegania między komórkami,
- 2/ oddzielenie się komórek od nabłonka,
- 3/ wewnętrzna kompetencja komórek do lokomocji i aktywacja ruchu,
- 4/ dostępność odpowiedniej przestrzeni i
- 5/ odpowiedni substrat dla migracji.

Inne czynniki (presja populacji, haptotaxis ii) oraz specyficzność szlaków odgrywają również rolę w kierowaniu migracją KGN.

### 3.2.1 Zanik przylegania

Jak wyżej zaznaczono, prekursorzy KGN w obrębie fałdów nerwowych tworzą zwarty nabłonek nie różniący się od reszty cewy nerwowej. Rozpoczęcie migracji KGN z neuroektodermy poprzedzone jest rozluźnieniem się ich układu. Jest to związane z utratą połączeń międzykomórkowych i adhezywności komórek. Na komórkach grzbietowej części zamykającej się cewy nerwowej występuje kadheryna CAM. Zanika ona stopniowo z presumptywnych KGN równocześnie z zanikiem połączeń międzykomórkowych, pozostając tylko w miejscu styku wypustek komórek. W pierwszej kolejności zanika N-CAM zależne od  $Ca^{++}$ , w drugiej N-CAM nie-

zależne od  $\text{Ca}^{++}$  [13, 38, 46]. Presumptywne KGN *in vitro* wykazują niewielką adhezywność do substratu [38].

Rozluźnienie układu komórek w grzbietowej części cewy nerwowej jest spowodowane także wydzielaniem przez presumptywne KGN kwasu hyaluronowego (o czym niżej) [19].

### 3.2.2. Aktywne ruchy komórek grzebienia nerwowego

Utrata adhezywności i rozluźnienie presumptywnych KGN wiąże się ze zmianą ich formy z nabłonkowej na mezenchymalną, pozwalającą na aktywne ruchy. Pierwszym objawem jest ich zaokrąglenie się oraz powiększanie się przestrzeni międzykomórkowych między nimi. Migrujące KGN mają już wyciągnięte w kierunku ruchu liczne filopodia i lamelipodia, które przyczepiają do podłoża [18, 38]. Przyczepność wypustek w dużej mierze zależy od charakteru substratu.

Zdolność aktywnego ruchu KGN nie jest zależna od ich lokalizacji w zarodku. Przy rozpoczęciu migracji mogą przesunąć się z jednej na drugą stronę cewy nerwowej [14]. Jeżeli zarodkowi kury wszczepi się cewę nerwową odwróconą częścią grzbietową ku dołowi, migracja KGN nie zostaje zaburzona. KGN wszczepione do pączka odnóża zarodka kury przemieszczają się aktywnie w mesenchymie i docierają do ektodermy oraz do innych części zarodka [18]. KGN migrują również z cewek nerwowych hodowanych *in vitro* w różnych warunkach eksperymentalnych [13, 18 i inni].

KGN rozpoczynają migrację, gdy latentna zdolność ruchu zostaje w nich aktywowana [20]. Bódcami mogą być czynniki wzrostowe. Newgreen i Minichiello [38] uważają, że decyzja o migracji KGN zachodzi wcześniej, na parę godzin przed jej rozpoczęciem i powstaje pod wpływem cząsteczki z rodziny TGF. Migracja KGN *in vitro* jest przyspieszana przez egzogenne TGF- $\beta$ 1 i TGF- $\beta$ 2 [15]. Stwierdzono także, że grzbietowa część cewy nerwowej wydziela białko dorsalinę-1, należące do rodziny TGF- $\beta$ , które *in vitro* powoduje emigrację komórek z cewy nerwowej (nawet z jej rejonu brzuszego, gdzie ona normalnie nie zachodzi) [8]. Wpływ TGF- $\beta$  na KGN oraz utrata przez nie N-CAM powodują zmiany w ich cytoszkieletcie. Uwolniona zostaje aktywna -F związana z zanikającymi połączeniami międzykomórkowymi i przesunięta do sieci kortikalnej, co ułatwia wysuwanie wypustek, rozplaszczanie się i migrację komórek [38]. Rozpoczęcie migracji i zmian w charakterze powierzchniowym komórki można w warunkach eksperymentalnych rozdzielić w czasie, chociaż *in vivo* są one skoordynowane [38].

W czasie rozwoju zarodka KGN są także przemieszczane biernie przez zakotwiczenie w przylegającej tkance, która ulega rozpraszaniu jak sklerotom lub wzrostowi różnicującemu, tj przez rozrastanie się i zmianę kształtu i położenia innych narządów [18].

### 3.2.3. Przestrzeń dostępna do migracji komórek grzebienia nerwowego

KGN przemieszczają się w zarodku w przestrzeniach zawierających nieliczne komórki lub całkowicie są ich pozbawionych, a wypełnionych substancją międzykomórkową. Przestrzenie te są ograniczone barierą nie pozwalającą KGN na zbożczenie ze szlaku. KGN przesuwały się *in vivo* w szparach mających co najmniej 2  $\mu\text{m}$  szerokości, *in vitro* przechodzą przez filtry o porach średnicy nieco przekraczającej 1  $\mu\text{m}$  [36].

Rozpoczęcie migracji KGN z cewy nerwowej jest poprzedzone wytworzeniem się między cewą nerwową a ektoderma naskórkową przestrzeni wolnej od komórek a wypełnionej substancją międzykomórkową [36]. Przestrzeń ta jest ograniczona błoną podstawną ektodermy naskórkowej, która stanowi barierę dla migracji komórek. U zarodków ptaków błona podstawna na grzbietowej części cewy nerwowej zostaje przerwana na kilka godzin przed rozpoczęciem migracji KGN. U zarodków myszy nie obserwowano błony podstawnej nad presumywnymi KGN, pojawia się ona na bocznych i brzusznej powierzchni cewy nerwowej dopiero w czasie migracji KGN [18, 34].

W dalszej migracji KGN wykorzystują przestrzenie między narządami pierwotnymi, a następnie mezenchymę z luźno ułożonymi komórkami. Kierunek i kolejność migracji KGN zależy w pewnej mierze od szerokości przestrzeni dostępnej tym komórkom. W rejonie głowy KGN w znacznie większej liczbie rozprzestrzeniają się między ektoderma naskórkową a skąpą w tym rejonie zarodka mezoderma niż brzusznie po ścianie cewy nerwowej. KGN w rejonie tułowia wykorzystują najpierw szparę, jaka znajduje się między somitami, a dopiero później przestrzeń między somitem a cewą nerwową. Następnie przestają migrować między sklerotomem a cewą nerwową, na skutek zablokowania wolnej przestrzeni przez rozpraszające się komórki sklerotomu. [37]

Barierę dla migracji, zwłaszcza późniejszej, stanowią narządy, obok których KGN się przesuwały. Przykładem może być szypuła oczna stanowiąca barierę dla bocznej migracji KGN z rejonu śródmózgowia [18], oraz naczynia krwionośne w rejonie mezenchymy pomiędzy cewą nerwową a aortą grzbietową [36]. W późniejszych stadiach rozwoju zarodka naczynia krwionośne mogą służyć jako substrat dla wędrówki KGN [56].

### 3.2.4. Substancja międzykomórkowa

Przestrzenie międzykomórkowe, jakimi migrują KGN, są wypełnione substancją międzykomórkową – ECM oraz siecią cienkich fibryli, o średnicy 5–10 nm, połączonych z ciałkami śródmiąższowymi, o średnicy około 40 nm, oraz natywnymi

włóknami kolagenowymi. Fibryle i ciała śródmiąższowe mogą stanowić miejsca przyczepu wypustek migrujących KGN. Tworzą się one pod ektodermą naskórkową przylegającą do śródmózgowia, na bocznych powierzchniach cewy nerwowej i w obszarach między cewą nerwową a somitami, gdzie są ułożone w kierunku ruchu KGN [18, 50].

Substancja międzykomórkowa na szlakach migracji KGN jest syntetyzowana i modyfikowana przez otaczające tkanki zarodkowe i przez same KGN [13]. Stąd ECM różni się zależnie od okolicy zarodka, jak i od okresu migracji KGN. Na przykład EMC ekstrahowana z części czaszkowej zarodka bardziej sprzyja migracji KGN *in vitro* niż ECM z rejonu tułowiowego [ostatnie 7 somitów] [11].

Głównym składnikiem ECM na szlakach migracji KGN jest **kwasy hyaluronowy HA** o zmiennym stężeniu zależnie od miejsca i czasu rozwoju zarodka. HA obok formy rozpuszczalnej odkłada się w fibrylach [18]. W rejonach aktywnej migracji KGN u zarodków kury stężenie jego wynosi około 20 mg/ml, po zakończonej migracji znacznie spada [18, 41]. HA odgrywa rolę w powiększaniu i zapewnianiu odpowiednich przestrzeni dostępnych dla migracji KGN, dzięki zdolnościom wiązania wody i pęcznienia [20, 48]. Pojawia się on między cewą nerwową a ektodermą przed rozpoczęciem migracji. Jest syntetyzowany przez obydwie te struktury oraz przez same nabłonkowato jeszcze ułożone, przedmigracyjne KGN [18]. Obecność jego powoduje powiększenie się przestrzeni międzykomórkowych między KGN, co obok zmniejszenia adhezji ułatwia ich rozdzielanie się, a następnie oderwanie od ściany cewy nerwowej [20, 30, 36].

Nie wiadomo, czy HA wpływa bezpośrednio na migrację KGN, usunięcie go działaniem hyaluronidazy nie hamuje tego procesu [18]. *In vitro* HA nie wpływa na tempo migracji KGN, jednak od jego stężenia w środowisku hodowlanym zależała liczba komórek, jakie opuszczały cewę nerwową zarodków kury. Niskie stężenie HA (5 µg/ml) powodowało przylegania komórek do siebie, podczas gdy wysokie stężenie HA (250–1000 µg/ml) zapobiegało adhezji i sprzyjało wywędrowywaniu komórek [30].

**Siarczan chondroityny** występuje w EMC w znacznie mniejszym stężeniu niż HA (około 6 mg/ml) [36]. Większe jego stężenia wykrywano na bocznych ścianach cewy nerwowej, na strunie grzbietowej i na powierzchni somitów. Natomiast nie ma go prawie całkiem w rejonach intensywnej migracji KGN. Siarczan chondroityny odkłada się również w ziarnach śródmiąższowych [18].

Rozmieszczenie HA i siarczanu chondroityny na szlakach migracji KGN jest odmienne: HA występuje zarówno na szlaku brzuszny, jak i bocznym, siarczan chondroityny głównie na szlaku bocznym. Na szlaku bocznym migracja KGN jest opóźniona w stosunku do brzusznej, może to sugerować, że siarczan chondroityny nie sprzyja przemieszczaniu się komórek. W miarę postępującej migracji zmniejsza się w EMC na szlakach ilość HA i FA, a zwiększa ilość siarczanu chondroityny,



co może być związane z ustawianiem migracji [13]. Wykazano, że siarczan chondroityny *in vitro* redukuje adhezywność KGN do fibronektyny [18],

Jednym ze składników ECM zarodków kręgowców jest **wersykan**, proteoglykan tworzący duże agregaty. Zawiera on siarczan chondroityny. Proteoglykan ten wchodzi w interakcję z hyaluronami. Odgrywa rolę w regulowaniu adhezji komórek do ECM, hamując wiązanie się ich z kolagenem, FN i lamininą [25,27]. Wykazano, że wersykan nie występuje w ECM na szlakach migracji KGN, natomiast znajduje się na jego "flankach" ograniczając zbaczanie komórek ze szlaku. W zarodkach kury pojawia się on niedługo po zamknięciu się cewy nerwowej wokół struny grzbietowej, dookoła tworzącego się somitu i między somitem a ektodermą. Przed rozpoczęciem migracji zanika z przedniej części somitu, a następnie z przestrzeni między ektodermą a somitem. W późniejszym rozwoju zanika z mesenchymy, do której wrastają aksony zarówno neuronów czuciowych zwojów korzonków brzusznych, jak i neuronów ruchowych [27].

Ważnym składnikiem ECM w rozwoju zarodków kręgowców jest **fibronektyna (FN)**. Znajduje się ona w błonach podstawnych, w ECM i na powierzchni niektórych komórek. W ECM występuje w formie niezwiązanej oraz w fibrylach o średnicy 5–10 nm i w ciałkach śródmiąższowych [18, 50]. Pojawia się w miejscach, gdzie komórki zarodkowe ulegają zagęszczeniu, na przykład przy tworzeniu się mezodermy przyosiowej w czasie gastrulacji [41]. Odgrywa też rolę w migracji KGN. Wykazano, że przeciwciała przeciw FN hamują migrację KGN *in vivo* [18]. Na szlakach migracji KGN FN znajduje się w ECM oraz w błonie podstawnej struktur ograniczających te szlaki.

Rola FN w migracji KGN była badana w różnych układach doświadczalnych *in vitro*. Na stałych podłożach powleczonych FN KGN ptaków rozciągają się płasko i wysuwają liczne filopodia oraz lamelipodia. Przyczepiają się do nich silniej niż do podłoża powleczonych innymi substancjami (albuminą krwi bydlęcej, proteoglykanami chrząstki nosa bydlęcego, kolagenem). Maksymalne przyczepienie KGN do podłoża uzyskiwano przy stężeniu FN 1,0 µg/ml, wyższe jej stężenie zmniejszało w dużym stopniu liczbę przyczepionych komórek [10]. Szybkość migracji KGN na podłożu zawierającym FN o stężeniu 50 µg/ml wynosiła 0,087 µm na minutę i była porównywana z szybkością migracji na podłożach powleczonych 10% surowicą krwi bydlęcej oraz migracją po izolowanej błonie podstawnej. Szybsze tempo migracji wykazywały KGN na podłożu zawierającym mniej adhezyjne substraty, takie jak żele kolagenowe z siarczanem chondroityny [18,21].

Ekspresję FN na powierzchni samych KGN wykrywa się tylko okresowo. Czaszkowe KGN kury *in vitro* wykazują dwie fazy ekspresji FN: pierwsza w czasie początkowej migracji KGN, druga w okresie ich różnicowania się w komórki mezoektodermy. Tułowiowe KGN w tych samych warunkach wytwarzają bardzo mało FN. [28]. Obecność FN na powierzchni komórek może hamować ich ruch [18].

W interakcji KGN z FN odgrywają rolę integryny, receptory dla FN rozpoznające jej odpowiednie domeny wiążące. Zwiększoną ekspresję integryn alfa-4-beta-1 i  $\alpha$ -5- $\beta$ -1 wykrywa się na powierzchni migrujących KGN. Od ekspresji integryn zależy szybkość i kierunek przemieszczania się KGN. Prekursory melanoblastów mogą wejść na szlak boczny, gdyż mają zmniejszoną ekspresję integryn, zwłaszcza alfa-4-beta-1. Zwiększona ekspresja tej ostatniej powoduje homotypową agregację KGN [2, 9].

ECM na szlaku wczesnej migracji KGN zawiera **tenascynę** [36]. Tenascyna (syn. cytotaktyna, glikoproteina J<sub>1</sub>) jest glikoproteina syntetyzowaną przejściowo w zarodkach kręgowców i w wielu nowotworach. Uważa się, że hamuje ona interakcję między komórką a FN, przez co zmniejsza się przyczepność komórek do substratu [3, 25]. *In vitro* tenascyna pokrywająca stałe podłoże przyspiesza migrację KGN. Na płytkach plastikowych powleczonych tenascyną KGN zaokrąglają się, nie wysuwają lamelipodii, wytwarzają niewiele filopodii i nakładają się jedna na drugą. Mimo to przesuwają się szybciej niż po płytkach "gołych" lub powleczonych FN, prawdopodobnie na skutek mniejszej adhezji i łatwiejszego odczepiania się nielicznych wypustek. Natomiast tenascyna obecna w izolowanej błonie podstawnej, zatrzymuje przemieszczanie się komórek po niej. Podobnie tenascyna dodana do hodowli hamuje migrację KGN. Halfter et al. [21] przytaczają szereg hipotez dla wytłumaczenia tych różnych obserwacji. Tenascyna może wiązać się z powierzchnią komórki i równocześnie z błoną podstawną lub też tenascyna współzawodniczy w wiązaniu się z receptorami dla FN i/lub lamininy, do których ma mniejsze powinowactwo. Sądzą również, że współdziałanie tenascyny z FN i lamininą *in vivo* zachodzi w taki sposób, jaki jest trudno odtworzyć *in vitro*. Rozmieszczenie tenascyny jest zmienne, zależne od szlaku i czasu migracji KGN. Na szlaku brzuszny tenascyna rozluźnia interakcję między komórkami przedniej części somitu, co pozwala na migrację KGN, podczas gdy FN skleja razem komórki tylnej części somitu i stwarza barierę dla migracji.

Na szlakach migracji ECM wykazano obecność **kolagenu I, IV i VI**. Kolagen I występuje w formie prążkowanych włókien i formie tropokolagenu [18]. Jest on wytwarzany przez te same komórki pochodzące z GN, które produkują FN. KGN czaszkowe produkują więcej kolagenu I niż tułowiowe [28]. Kolagen IV związany jest głównie z błonami podstawnymi, ale znajduje się również w ciałkach śródmiąższowych, na fibrylach [o średnicy 10 nm] oraz w bezpostaciowej ECM [34]. Rozmieszczenie kolagenu VI zależne jest od miejsca na szlaku migracyjnym, jak i od etapu rozwoju zarodka. W stadium początkowej migracji KGN pojawia się on przy błonie podstawnej cewy nerwowej, somitów, struny grzbietowej oraz ektodermy naskórkowej. Zawiera łańcuchy  $\alpha$ -1(VI) i  $\alpha$ -2(VI), a w późniejszej fazie migracji KGN występuje w formie fibryl zawierających także łańcuchy  $\alpha$ -3(VI). Uważa się, że kolagen VI może uczestniczyć w regulacji migracji KGN służąc jako substrat.[45]. *In vitro* KGN mają zdolność adhezji do kolagenu I i VI, ale

migrują wyłącznie po jego spolimeryzowanych cząsteczkach. Przyczepianie się do kolagenu I zachodzi za pośrednictwem integryny  $\alpha$ -1  $\beta$ -1 wiążącej się z łańcuchem  $\alpha$ -1(I), a do kolagenu VI za pośrednictwem integryny  $\beta$ -1 [78, 44, 45].

**Błona podstawna** jest nie tylko barierą, ale również może być podłożem dla migracji KGN. Część KGN migruje po błonie podstawnej cewy nerwowej. W błonie podstawnej cewy nerwowej wykrywa się obecność lamininy, kolagenu IV, FN [18, 34 ], a na jej powierzchni znajduje się sieć fibryli (10 nm średnicy) zawierających fibronektynę i kolagen IV oraz ciała śródmiąższowe [34]

### 3.2.5. Presja populacji

Presja populacji jest mechanizmem powodującym rozpraszanie się KGN we wczesnym stadium migracji. Paglini i Rovasio [42, 43] wykazali, że czaszkowe KGN mają największe tempo proliferacji ze wszystkich komórek zarodka kury (tab. 2). Na początku migracji jest ona stymulowana przez FGF (FGF 2) wydzielany na cewie nerwowej [35].

Z szybkim mnożeniem się KGN może wiązać się hamowanie kontaktowe, które ma być jednym z czynników ukierunkowujących migrację KGN. Migrują one z miejsca o dużej ich koncentracji i przesuwały się przeważnie w kierunku doogonowym, gdzie jeszcze nie ma innych KGN, a przemieszczanie się dogłównie jest hamowane przez skupienie w poprzedzającym segmencie. Uszkodzenie mechaniczne lub zanik na tle genetycznym segmentu migracji powoduje, że komórki z poprzedzającego segmentu zasiedlają brakujący [18].

### 3.3. Specyficzność szlaków

Szereg prac poświęcono wyjaśnianiu, czy szlaki migracji KGN są dostępne dla wędrówki innych rodzajów komórek i na czym polega specyficzność tych szlaków. Bronner- Fraser [13] przedstawia podsumowanie badań na ten temat. Wprowadzano przez mikroinjekcję różne naturalnie znakowane komórki do jamy wczesnych somitów lub pomiędzy cewę nerwową a somity zarodków kury. Melanocyty przepiórki, sklonowane *in vitro*, przesuwały się szlakiem brzuszynym oraz różnicowały się obok endogennych KGN w chromafinoblasty i aortalny splot nerwowy. Inne komórki zarodkowe mające zdolność aktywnego ruchu, a nie pochodzące z GN – fibroblasty oraz komórki sklerotomów zarodków przepiórki zatrzymywały się w rejonie somitu i nie przesuwały się dalej. Nieoczekiwanie komórki barwnikowe siatkówki pochodzące z kubka wzrokowego, nie wykazujące w normalnym rozwoju zarodków kręgowców zdolności ruchu, przemieszczane były szlakiem brzuszynym. Wprowadzano w takie same miejsca obce ciała w postaci kulek lateksowych, wielkości KGN, które nie reagowały z ECM. Kulki "gołe" lub powleczone albuminą surowicy bydlęcej albo kolagenem rozpraszają się wraz z komórkami sklerotomu i w

Tabela 2 . Porównanie niektórych wskaźników proliferacji KGN i innych komórek zarodka kury

Okolica ciała zarodka	Czas trwania pokolenia [godz.]	Indeks					
				kolchicynowy		H <sup>3</sup> -tymidyny	
		komórki					
		KGn	CN	KGn	CN	KGn	CN
Przodomózgowie		16	20	0,087	0,089	0,268	0,085
Śródmózgowie		16,2	18	0,085	0,079	0,295	0,035
Tyłomózgowie		13,8	17	0,101	0,82	0,134	0,031
Ektoderma	33						
Mezoderma	56						
Endoderma	72						

GN – grzebień nerwowy, CN – cewa nerwowa (na podstawie [42 i 43])

późniejszych stadiach znajdowano je obok KGN gospodarza przy zwojach sympatycznych, przy korzeniach dobrzusznych, w okolicy aorty grzbietowej. Natomiast kulki powleczone lamininą lub FN pozostawały w miejscu wprowadzenia. Wykazano następnie, że kulki powleczone fragmentem FN (120 000 D) zawierającym domeny wiążące się z powierzchnią komórek pozostają na miejscu mikroinjekcji. Natomiast fragmenty FN zawierające domeny wiążące się z kolagenem (60 000 D) i heparanem (25 000 i 42 000 D) obecne na powierzchni kulek nie hamowały ich wejścia na szlak brzuszny. Ponad to tylko kulki o powierzchniowym ujemnym ładunku elektrycznym przesuwały się szlakiem brzuszny. Po zniszczeniu wiązką laserową KGN w obrębie kilku somitów wstrzyknięte w ich miejsce kulki lateksowe przemieszczane były nadal szlakiem brzuszny, co wskazuje, że nie były one, jak i w innych eksperymentach, prowadzone przez przyleganie do migrujących KGN. Mechanizm przemieszczania się szlakiem brzuszny komórek "nieruchliwych" i kulek lateksowych nie został jednak w tych badaniach wyjaśniony. Nie znaleziono zależności między zdolnością komórek do ruchu a skłonnością kierowania się KGN na szlak brzuszny. Bronner-Fraser [13] uważa, że zdolność przesuwania się KGN szlakiem brzuszny zależy w dużej mierze od właściwości powierzchniowych komórek, przy czym duża adhezywność hamuje migrację. Erickson [18] nie wyklucza, że na szlakach migracji KGN może działać mechanizm haptotaxis (ruch komórek wobec gradientu adhezywności, komórki przesuwały się z miejsca substratu o większej adhezywności do mniejszej adhezywności) i być może ma to związek ze stężeniem HA.

Jak się wydaje, co najmniej na szlaku brzuszny migracja KGN może być ukierunkowana przez ukształtowanie podłoża tzw. **kierowanie kontaktowe przez podłoże** (*contact guidance*). Newgreen [37] wykazał, że KGN migrujące *in vitro* przesuwały się wzdłuż zorientowanych fibryli ECM, poruszają się po nich szybciej

niż na fibrylach o przypadkowym ułożeniu. We wczesnej fazie migracji KGN na powierzchni cewy nerwowej, jak i na powierzchni somitów zwróconej do cewy nerwowej znajdują się bowiem fibryle zorientowane w kierunku grzbietowo-brzusznym. Podobnie migracja KGN w rejonie śródmózgowia odbywa się po fibrylach ECM ułożonych na cewie nerwowej w kierunku ruchu [18].

Wobec możliwości przemieszczania się nieruchomych komórek i kulek lateksowych można sądzić, że mechanizm chemotaxis, o ile istnieje, nie odgrywa w migracji KGN szlakiem brzuszным znaczącej roli. Być może działa on na szlaku migracji wagalnych KGN, gdzie według Le Douarin i Teillet [29] czynnik chemotaktyczny wydzielany jest przez jelito.

Najbardziej specyficzny wydaje się być szlak boczny dostępny wyłącznie dla KGN ukierunkowanych w melanoblasty [19].

### 3.4. Koniec migracji

Zakończenie migracji KGN może być spowodowane specyficznością środowiska, istnieniem lub powstawaniem bariery dla ich ruchu. Tkanka, do której wnikają KGN, może ułatwiać ich migrację lub ją hamować. KGN zatrzymują się w okolicach, takich jak np. mezoderma koło struny grzbietowej, gdzie ECM nie podtrzymuje tu migracji na skutek zwiększenia adhezyności *trapping action* [18]. Czaszkowe KGN emigrujące najpóźniej z tyłomózgowia i przesuujące się bezpośrednio po ścianie cewy nerwowej, dochodzą do miejsca przyszłego odejścia nerwów czaszkowych i są tu zatrzymywane. Prawdopodobnie komórki cewy nerwowej wydzielają w tych miejscach substancje, które przyciągają i zatrzymują KGN [39]. Barię dla migracji KGN stanowi brak odpowiedniej przestrzeni międzykomórkowej. Ostateczna lokalizacja może być spowodowana także nierównomiernym wzrostem innych narządów. Za biernym końcowym rozmieszczeniem KGN przemawiają omówione wyżej doświadczenia z kulkami lateksowymi.

Można także sądzić, że KGN są predeterminowane i każdy ich fenotyp wędruje docelowo do odpowiedniego miejsca. Przyczyna zakończenia migracji może leżeć wtedy w samych KGN, które zmieniają interakcje z otaczającą ECM. Świadczyć mogą o tym obserwacje wskazujące, że kiedy KGN wejdą w okolicę, w której tworzą się zwoje nerwowe czuciowe i splot przyaortalny, na ich powierzchni pojawiają się FN i N-CAM sprzyjające adhezji komórek do podłoża [18].

## PIŚMIENNICTWO

[1] ALLAN JJ, NEWGREEN DF. The origin and differentiation of enteric neurons of the intestine of fowl embryo. *Am J Anat* 1980; **157**: 137–154.

- [2] ANDERSON DJ. Stem cells and transcription factors in the development of the mammalian neural crest. *FASEB J* 1984; **8**: 707–713.
- [3] AUFDERHEIDE E, EKBLUM P. Tenascin during gut development: Appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms, and dependence on epithelial - mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 1988; **107**: 2341–2349.
- [4] BHATTARAYA A, BACKENBURY R, RATNER N. Axon arrest the migration of Schwann cell precursor. *Development* 1994; **120**: 1411–1420.
- [5] BARTEL H. Embriologia. PZWL 1995 Warszawa.
- [6] BASSLER K, EDLUND T, JESSELL TM, YAMADA T. Control of cell pattern in neural tube. Regulation of cell differentiation by dorsalin-1 a novel TGF- $\beta$  family member. *Cell* 1993; **73**: 687–702.
- [7] BEAUVAIS A, ERICKSON CA, GOINS T, CRAIG SE, HUMPHRIES MJ. Changes in the fibronectin-specific integrin expression pattern modify the migratory behavior of sarcoma S180 cells *in vitro* and in the embryonic environment. *J Cell Biol* 1995; **128**: 699–713.
- [8] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Embriologia, wyd.III, PWRiL 1993 Warszawa.
- [9] BIRGBAUER E, SECHRIST J, BRONNER-FRASSER S. Rhombomeric origin and rostro-caudal reassignment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* 1995; **121**: 935–945.
- [10] BLAUGRUND E, PHAM TD, TENNYSON VM, LO L, SOMMER L, ANDERSON D J, GERSHON MD. Distinct populations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineal markers and *Mash-1*-dependence. *Development* 1996; **122**: 309–320.
- [11] BRAUER Ph R, MARKWALD RR. Attachment of neural crest cells to endogenous extracellular matrix. *Anat Rec* 1987; **219**: 275–285.
- [12] BRONNER-FRASER M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. *Dev Biol* 1986; **115**: 44–55.
- [13] BRONNER-FRASER M: Guidance of neural crest migration. Latex beads as probes of surface-substratum interactions. [w] Steinberg M [red.] *Developmental Biology – a comprehensive synthesis*. Vol.3. The cell surface in development and cancer. New York, London; Plenum Press 1986: 301–337.
- [14] COULY G, GRAPIN-BOTTON A, COLTEY P, LE DOUARIN NM. The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited; the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior and posterior neural fold. *Development* 1996; **122**: 3393–3407.
- [15] DELANNET M, DUBAND JL. Transforming growth factor- $\beta$  control of cell-substratum adhesion during avian neural crest emigration *in vitro*. *Development* 1992; **116**: 275–287.
- [16] DURBEC PL, LARSSON-BLOMBERG LB, SCHUCHARDT A, CONSTANTIN F. Common origin and developmental dependence on c-ret subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 1996; **122**: 349–358.
- [17] EHRlich ME, EVIGER M, REGUNATHAN S, TEITELMAN G. Mammalian adrenal chromaffin cells coexpress the epinephrine-synthesizing enzyme and neuronal properties *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol* 1994; **163**: 480–490.
- [18] ERICKSON CA. Morphogenesis of the neural crest [w] Browder [red] *Developmental Biology – a comprehensive synthesis*. Vol. 2. The Cellular Basis of Morphogenesis. New York, London; Plenum Press 1986; 481–543.
- [19] ERICKSON CA, GOINS TL. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development* 1995; **121**: 915–924.
- [20] ERICKSON CA, WESTON JA. An SEM analysis of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 1983; **74**: 97–118.
- [21] HALFTER W, CHIQUET-EHRISMANN R, TUCKER RP. The effect of tenascin and embryonic basal lamina on the behavior and morphology of neural crest cells *in vitro*. *Dev Biol* 1989; **132**: 14–25.

- [22] IMAI H, OSUMI-YAMSHITA N, NINOMYA Y, ETO K. Contribution of early migrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos. *Dev Biol* 1906; **174**: 151–165.
- [23] ITO K, SIEBER-BLUM M. Pluripotent and developmentally restricted neural-crest-derived cells in posterior visceral arches. *Dev Biol* 1993; **136**: 191–200.
- [24] KIRBY ML, KUMINSKI DH, MYERS T, CERJAN C, MISTRIMA N. Backtransplantation of chick cardiac neural crest cells cultured in LIF rescues heart development. *Dev Dynam* 1993; **198**: 296–311.
- [25] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Cytobiochemia. Warszawa, PWN; 1995
- [26] KÖNIGES G, LUMSDEN A. Rhombocephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 1996; **122**: 3229–3242.
- [27] LANDOLT RM, VAUGHAN L, WINTERHALTER KH, ZIMMERMANN DR. Versicam is selectively expressed in embryonic tissue that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 1995; **121**: 2303–2312.
- [28] LE BLANC G. Rostrocaudal differences in the expression of extracellular matrix proteins by avian neural crest cells *in vitro*. *Cell Tiss Res* 1994; **277**: 97–107.
- [29] LE DOURAIN NM, THEILLET MA. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchyme derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* 1974; **41**: 162–184.
- [30] LUCKENHILL-EDDS L, CARRINGTON JL. Effects of hyaluronic acid on the emergence of neural crest cells from neural tube of the quail *Coturnix coturnix japonica*. *Cell Tiss Res* 1988; **252**: 573–579.
- [31] LUMSDEN A, KEYNES R. Segmental pattern of neuronal development in the chick hindbrain. *Nature* 1989; **337**: 424–428.
- [32] LUMSDEN A, SPRAWSON N, GRAHAM A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. *Development* 1991; **113**: 1281–1291.
- [33] MANNER J, SEIDL W, STEDING G. Experimental study on the specification of abnormal cardiac looping for the development of cardiovascular anomalies in neural crest ablated chick embryos. *Anat Embryol* 1996; **194**: 289–300.
- [34] MARTINS-GREEN M, ERICKSON CA. Basal lamina is not a barrier to neural crest cell migration: documentation by TEM and immunofluorescent and immunogold labelling. *Development* 1987; **101**: 517–533.
- [35] MURPHY M, REID K, FORD M, FURNESS JB, BARTLETT PF. FGF-2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 1994; **120**: 3519–3528.
- [36] NEWGREEN DF. The role of the extracellular matrix in the control of neural crest cell migration. [w] Hawkes S, Wang JL [red] Extracellular Matrix. New York, London Acad Press 1982: 141–145.
- [37] NEWGREEN DF. Physical influence on neural crest cell migration in avian embryos: contact guidance and spatial restriction. *Dev Biol* 1989; **131**: 136–148.
- [38] NEWGREEN DF, MINICHELLO J. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in onset of neural crest migration are separable and inducible by protein kinase inhibitor. *Dev Biol* 1995; **170**: 91–101.
- [39] NIEDERLANDER C, LUMSDEN A. Late migrating neural crest cells migrate to the exit points of craniomotor nerves. *Development* 1996; **122**: 2367–2374.
- [40] NONCHEV S, VESQUE CHR, MACONOCHEM, SEITANIDOU T, ARIZA-MCNAUGHTON L, FRAIN M, MARSHALL H, SHAM MH, KRUMLAUF R, CHARNAY P. Segmental expression of *Hoxa-2* in the hindbrain is directly regulated by *Krox-20*. *Development* 1996; **122**: 543–554.
- [41] OSTROVSKY D, SANGER J, LASH JW. Somatogenesis in the mouse embryo. *Cell Diff* 1988; **23**: 17–26.

- [42] PAGLINI MG, ROVASIO RA. Proliferative behavior during early migration of chick embryo neural crest cells *in vivo*. *Biocell* 1994; **18**: 43–49.
- [43] PAGLINI MG, ROVASIO RA. Cell cycle of neural crest cells in the early migratory stage *in vivo*. *Cell Prolif* 1994; **27**: 571–578.
- [44] PERRIS R, KUO HJ, GLANVILLE RN, LEIBOLD S, BRONNER-FRASER M. Neural crest cell interaction with type VI collagen is mediated by multiple cooperative binding sites within triple helix and globular domains. *Exp Cell Res* 1993; **209**: 103–117.
- [45] PERRIS R, KUO HJ, GLANVILLE RN, BRONNER-FRASER M. Collagen typ VI in neural crest development: Distribution *in situ* and interaction with cells *in vitro*. *Dev Dymam* 1993; **198**: 135–149.
- [46] PETERSON PG, BLANKENSHIP TN, WILSON DB, HENDRICKS AG. Analysis of hindbrain neural crest migration in the long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*). *Anat Embryol* 1996; **194**: 235–246.
- [47] PINCO O, CARMELI C, ROSENTHAL A, KALCHEIM C. Neurotrophin 3 affects proliferation and differentiation of distinct neuronal crest cells and is present in early neural tube of avian embryos. *J Neurobiol* 1993; **24**: 1626–1641.
- [48] PRATT RM, LARSEN MA, JOHNSTON MC. Migration of cranial neural crest cells in free hyaluronate-rich matrix. *Dev Biol* 1975; **44**: 298–305.
- [49] PRINCE V, LUMSDEN A. *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres; independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 1994; **120**: 911–923.
- [50] RUIZ WF, MUJWID DR, STEFFEK AJ. Scanning electron microscopy (SEM) of the extracellular matrix during cranial neural crest migration in chick embryos. [w] Hawkes S, Wang JL [red] Extracellular Matrix. New York, London Acad Press 1982: 135–139.
- [51] SADLER TW. Embriologia lekarska. Med Tour Press International 1993 Warszawa.
- [52] SALDIVAR J R, KRULL C E, KRUMLAUF R, ARIZA-MC NAUGHTON L, BRONNER-FRASER M. Rhombomere of origin determinates autonomous versus enviromentally regulated expression of *Hoxa-3* in the avian embryo. *Development* 1996; **122**: 895–904.
- [53] SCREPANTI I, SCARPA S, MECO D, BELLAVIA D, STUPPIA L, FRATI L, MODESTI A, GULINO A. Epidermal growth factor promotes a neuronal phenotype in tymic epithelial cells and enhances neuropoietic cytokine expression. *J Cell Biol* 1995; **130**: 183–192.
- [54] SECHRIST J, SCHERSON T, BRONNER-FRASER M. Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. *Development* 1994; **120**: 1777–1790.
- [55] SECHRIST J, SERNEDZIJA G, SCHERSON T, GRASER S, BRONNER-FRASER M. Segmental migration of the hindbrain neural crest does not arise from segmental migration. *Development* 1993; **118**: 691–703.
- [56] SPENCE SG, POOLE TJ. Developing blood vessels and associated extracellular matrix as substrates for neural crest migration in Japanese quail *Coturnix coturnix*. *Int J Dev Biol* 1994; **38**: 85–90.
- [57] TUCKER GC, AOYAMA H, LIPÍŃSKI M, TURSZ T, THIERY JP. Identical reactivity of monoclonal antibodies HNK-1 and BC-1. Conservation in vertebrates on cells derived from neural primordium and some leukocytes. *Cell Differ* 1984; **14**: 223–230.
- [58] WALDO KL, KIRBY ML. Cardiac neural crest contribution to the pulmonary artery and six aortic artery complex in chick embryos aged 6 to 18 days. *Anat Rec* 1993; **237**: 385–399.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 12.11.1996 r.

Przyjęto: 02.04.1997 r.

Adres autora: Mickiewicza 21 m 12, 01-517 Warszawa



# KOMÓRKI GRZEBIENIA NERWOWEGO

## II. RÓŻNICOWANIE

### NEURAL CREST CELLS II. DIFFERENTIATION

Zofia Bielańska-Osuchowska

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Weterynaryjnego  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

*Streszczenie:* Komórki grzebienia nerwowego zasiedlają różne okolice ciała zarodka i różnicują się w wiele odrębnych fenotypów. Końcowe ich zróżnicowanie jest zależne od szlaku, po jakim migrują, wcześniejszego ukierunkowania i od czynników genetycznych. Przedstawiono różnicowanie się komórek grzebienia nerwowego tułowiowych migrujących szlakiem brzuszynym i bocznym oraz kranialnych i wagalnych.

*Summary:* Neural crest cells populate different regions of embryo body and differentiate into different phenotypes. Final differentiation depends on the migratory pathway, early commitment and genetic factors. The differentiation of neural crest cells: truncal, on ventral and dorsolateral pathway, as well as cranial and vagal is presented.

*Słowa kluczowe:* rozwój zarodkowy, grzebień nerwowy, różnicowanie

*Key words:* embryonic development, neural crest, differentiation

*Wykaz stosowanych skrótów:* **BDGF** (*brain derived growth factor*) – czynnik wzrostowy pochodzący z mózgu; **BDNF** (*brain derived neurotrophic factor*) – czynnik neurotroficzny pochodzący z mózgu; **BMP** (*bone morphogenetic protein*) – białko związane z morfogenezą kości; **CGRP** (*calcitonine gene related peptide*) – białko związane z genem kalcitoniny; **c-kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej, wiążący SCF; **CRABP** (*cellular retinoic acid binding protein*) – komórkowe białko wiążące kwas retinowy; **c-ret** – protoonkogen, który koduje receptor dla kinazy tyrozynowej; **DIL** (*1,1-dioctadecyl 3,3,3',3'tetramethyl indocarbocyanine perchlorate*) – barwnik przyżyciowy; **ECM** (*extracellular matrix*) – podstawowa substancja międzykomórkowa; **FGF** (*fibroblast growth factor*) – fibroblastyczny czynnik wzrostu; **FN** – fibronektyna; **HNK-1** (*human natural killer-1*) – antygen powierzchniowy na subpopulacji ludzkich limfocytów NK, wykrywany przeciwciałem leu-7; **KN** – komórki grzebienia nerwowego; **LIF** (*leukemia inhibitory factor*) – czynnik hamujący wzrost niektórych linii białaczkowych; **LRD** (*lysinated rhodamin dextran*) – barwnik przyżyciowy; **MSA** (*migration staging area*) – obszar szkolenia w czasie migracji; **MSH** – hormon melanotropowy; **N-CAM** – (*neural cell adhesion*

*molecule*) – cząsteczka adhezyjna komórki nerwowej; **NDF** - (*Neu differentiation factor - glial growth factor*) – czynnik wzrostu komórek glejowych; **Ng-CAM** (*neuroglial adhesion molecule*) – neuroglejowa cząsteczka adhezyjna; **NGF** (*neural growth factor*) – czynnik wzrostu nerwu; **NT-3** – neurotrofina-3; **PNA** – lektyna orzeszków ziemnych; **PNMT** (*phenylethanolamine -N- methyltransferase*) – metylotransferaza fenyletalamina; **r** – rombomer; **RA** (*retinoic acid*) – kwas retinowy; **RXR** (*retinoic acid receptor X*) – receptor X kwasu retinowego; **SCF** (*stem cell factor*) – czynnik komórek macierzystych; **SSEA-1** (*stage specific embryonic antigen -1*) – etapowo swoisty antygen zarodkowy; **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostowy; **trk-c** – receptor dla neurotrofiny-3; **TRP** (*tyrosinase related protein*) – białko związane z tyrozinazą

## 1. WSTĘP

Wiele badań poświęcono różnicowaniu się komórek grzebienia nerwowego – **KGN**, mimo to pozostał nie rozstrzygnięty problem, czy różnicują się one w odrębne linie już w cewie nerwowej lub zaraz po jej opuszczeniu czy też multipotentne komórki wchodzą na szlaki migracyjne i różnicują się w odrębne fenotypy dopiero w trakcie migracji i po jej zakończeniu. Śledzono kolejność przemian KGN pochodzących z różnych odcinków cewy nerwowej. Badania przeprowadzono wieloma metodami, między innymi znacząc niewielkie grupy lub pojedyncze komórki w cewie nerwowej barwnikami przyżyciowymi fluoryzującymi, takimi jak DIL i LRD *in vivo* i *in vitro* [5,16,32,45,58,59,61 i inni], klonując poszczególne linie z jednej KGN [23, 63 i inni], przeszczepiając znakowane komórki w ektopową lokalizację [5, 40, 54, 58] i inne.

## 2. Zróżnicowanie i potencje rozwojowe komórek grzebienia nerwowego rozpoczynających migrację

Ukierunkowanie komórek ektodermalnych w linię KGN zachodzi u kręgowców w czasie neurulacji zarodka pod wpływem indukcji nerwowej. U zarodków ptaków uzyskuje się indukcję KGN przed rozpoczęciem gastrulacji nakładając presumpcyjną ektodermę naskórkową na presumpcyjną neuroektodermę [59]. Nie wiadomo jednak jak dalece są ukierunkowane i jakie są potencje rozwojowe KGN obecnych w cewie nerwowej. Są sugestie, że tworzą one subpopulacje różniące się zdolnością adhezji do podłoża [7]. Rozpoczynające migrację KGN wykazują inne właściwości powierzchniowe niż pozostałe komórki cewy nerwowej. Wykazują one obecność epitopu HNK-1 na powierzchni. Zanika na nich charakterystyczna dla cewy nerwowej N-CAM. Pobrane z zarodków na początku migracji KGN i hodowane *in vitro* są pluripotentne i bardzo plastyczne [63,65].

KGN, które wejdą na określony szlak migracji, różnicują się w typ komórek charakterystyczny dla tego szlaku i równocześnie tracą zdolność różnicowania się w innym kierunku. Można przyjąć dwa mechanizmy różnicowania się KGN:

1. Populacja pluripotentnych KGN przypadkowo rozprzestrzenia się różnymi szlakami i różnicuje się zgodnie ze wskazówkami otoczenia. Liczne są na to dowody eksperymentalne [29,38,65].

2. KGN są specyficznie ukierunkowane i mają właściwości wyboru lub co najmniej wykorzystania określonego szczególnego szlaku, którym inne KGN nie mogą migrować. Mimo iż są doniesienia o wczesnej determinacji subpopulacji KGN [38,59], nie ma poparcia eksperymentalnego tej hipotezy.

### 3. Różnicowane się tułowiowych KGN na szlaku brzuszny

KGN tułowiowe, które weszły na szlak brzuszny, zachowują zdolności neurogeniczne i różnicują się *in vivo* w neurony, komórki glejowe i chromafinocyty, a tracą zdolności melanogeniczne [15]. Ostateczny los tułowiowych KGN zależy od kolejności rozpoczęcia ich migracji i drogi, jaką się przesuwają. Pierwsze emigrujące z tułowiowej cewy nerwowej KGN migrują po brzuszno-przyśrodkowej stronie sklerotomu, zasiedlają bliższe jamie brzusznej okolice ciała i dają początek zwojom sympatycznym, splotowi aorty i komórkom chromafinowym rdzenia nadnercza. W następnej fali KGN migrują po brzuszno-przyśrodkowej stronie dermatiotomu, zatrzymują się w okolicy struny grzbietowej i dają początek zwojom korzonków grzbietowych. Seberdzija et al. [60,61] sądzą, że multipotentne KGN ulegają różnicującemu wpływowi środowiska, przez jakie migrują i w jakim się zatrzymują. Świadczą o tym również dawniejsze doświadczenia. Na przykład u zarodka kury po przeszczepieniu tułowiowej cewy nerwowej w okolicę wagalną [1–7 somitu] KGN tułowiowe penetrują do jelita i tworzą sploty nerwowe z cholinergicznymi neuronami [31].

Jakie czynniki działają na KGN w czasie ich różnicowania się w neurony zwojowe, nie zostało jeszcze wyjaśnione. Od dawna wiadomo, że NGF wpływa na ostateczne zróżnicowanie neuronów sympatycznych i wzrost ich aksonów. Nie wiele jednak jest danych na temat działania NGF i czynników pokrewnych na różnicowanie się KGN.

Wyniki badań nad wpływem neurotrofiny NT-3 na różnicowanie się KGN nie są jednoznaczne. NT-3 *in vitro* powoduje zwiększenie liczby mitoz KGN oraz wpływa na ich przeżywanie i różnicowanie się w kierunku neuronów. Prawdopodobnie *in vivo* NT-3 pełni podobną rolę. NT-3 występuje na cewie nerwowej we wczesnym rozwoju zarodków przepiórki, po czym zanika, pojawia się znowu na różnicujących się nerwach obwodowych i zwojach korzonków grzbietowych.

[46]. Neurony zwojowe i ich prekursorowe KGN wykazują ekspresję *trk-c* receptora dla NT-3 [44]. Według Ochel i wsp. [44] NT-3 jest niezbędna dla prawidłowego tworzenia się obwodowych zwojów czuciowych (zwoj dalszy nerwu językogatłowego, zwoje korzeni do grzbietowych kury). We wczesnym okresie gangliogenezy hamuje liczbę mitoz w przyszłych neuronach, przez co zmniejsza ich liczbę w zwoju. Podana w późniejszym okresie rozwoju zarodka zwiększa liczbę neuronów w zwojach korzeni grzbietowych. Autorzy ci uważają, że NT-3 wzmacnia przeżywanie neuroblastów, a jej działanie anty- lub promitotyczne może zależeć od stężenia. Prawdopodobnie *in vivo* nie osiąga stężenia stymulującego mitozy. Podobnie inna neurotrofina BDNF podtrzymuje przeżywalność neuroblastów w zwojach korzeni grzbietowych *in vivo* i *in vitro* [44]. W innych doświadczeniach KGN przepiórki hodowane w obecności SCF<sup>1</sup> różnicowały się w neurony czuciowe wykazujące obecność SSEA-1. Natomiast dodanie do takiej hodowli NT-3 lub NGF hamowało rozwój linii neuroblastycznej. Jedynie BDNF działa w tym samym kierunku co SCF, chociaż nie synergicznie z nim [27].

FGF-2 *in vitro* w obecności surowicy stymuluje proliferację KGN myszy, ale znacznie opóźnia ich różnicowanie się w neurony. Natomiast po usunięciu FGF z medium dodanie do niego LIF przyspieszało różnicowanie się KGN w neurony czuciowe. Tworzyły one najpierw zwarte skupiska, a następnie pojawiały się w nich neurofilamenty (reagujące z przeciwciałem p150NF), białko CGRP, substancja P oraz ulegał ekspresji gen homeotyczny *Pax3*. [38]. *In vivo* u zarodków myszy obecność m-RNA dla FGF-1 i FGF-2 wykrywa się w tułowiowej cewie nerwowej oraz w KGN zagęszczających się w zwoje czuciowe korzeni grzbietowych [38]. U kury na tych ostatnich wykryto receptory dla FGF. Stąd Murphy i wsp. [38] sugerują, że co najmniej w obrębie tworzących się tych zwojów FGF działa auto- lub parakrynowo stymulując proliferację KGN, a LIF i/lub inne cytokiny regulują ich różnicowanie się w neurony.

Cała populacja KGN migrujących brzusznie jest prawdopodobnie zaindukowana w kierunku produkcji katecholamin przez kontakt z somitem i cewą nerwową. Według Le Douarin i Theillet [31] indukcja taka, mimo iż jest konieczna, jest niewystarczająca dla wytwarzania katecholamin w KGN i czynnik powodujący ich ostateczne zróżnicowanie jest obecny w mezodermie tułowiowej. Reissman et al. [50] wykazali, że ostateczne zróżnicowanie prekursorów neuronów w neurony adrenergiczne zachodzi pod wpływem BMP-4 i BMP-7 wydzielanych w ścianie

<sup>1</sup>SCF – *Stem Cell Factor* jest czynnikiem wzrostowym i jest prawdopodobnie tą samą substancją co *Steel Factor* – SLF, *Mast Cell Factor*, *Kit ligand* – Kl. Jest on ligandem dla receptora c-kit. Białko jest syntetyzowane w formie dwóch wariantów zlokalizowanych na powierzchni komórki. Większy wariant zawiera miejsce pozwalające na uwolnienie się SCF z powierzchni komórki do substancji międzykomórkowej, mniejszy tkwi stale w błonie komórkowej [48,68]. SCF znany jest jako czynnik niezbędny dla hemopoetycznych komórek oraz dla proliferacji pierwotnych komórek rozrodczych.

aorty brzusznej i w mezenchymie ją otaczającej. Czynniki te powodują również *in vitro* różnicowanie się KGN w neurony adrenergiczne.

Różnicowanie się KGN w limfocyty (komórki Schwanna) przebiega w trzech etapach [39]. W pierwszym niezróżnicowane KGN przekształcają się w prekursorzy limfocytów. Proces ten zachodzi w czasie migracji, kiedy w populacji komórek z antygenem HNK-1 można wyróżnić subpopulację z białkiem PO (charakterystycznym składnikiem osłonki mielinowej) [2]. W drugim etapie prekursorzy limfocytów przechodzą transformację w limfocyty. Etap ten jest nieodwracalny [40]. Konieczny jest wtedy bezpośredni kontakt komórki prekursorowej z aksonami wyrastającymi z neuronów rdzenia kręgowego. Prawdopodobnie aksony wydzielają substancje przyciągające KGN i hamujące ich dalszą migrację (np. N-CAM, NG-CAM lub inne kadheryny) [2]. Kontakt komórki prekursorowej z aksonem jest również niezbędny dla jej przeżycia. W braku aksonów korzeni brzusznych KGN kury dowędrują do miejsca normalnej lokalizacji tych korzeni, ale następnie obumierają [2]. Bezpośredni kontakt z aksonem aktywuje w prekursorach limfocytów ekspresję białka S100 i niezależnie od tego genu *Krox-20* (odpowiedzialnego za ekspresję palców cynkowych). Aktywacja *Krox-20* zachodzi pod wpływem NDF- $\beta$  wytwarzanym w aksonach korzeni grzbietowych [40]. W trzecim etapie ostatecznego dojrzewania limfocytu zachodzi proces mielinizacji, do czego niezbędna jest aktywność *Krox-20* [39].

Wehrle-Haler i Chiquet [67] wykazali, że w rozwoju nerwów czuciowych ważną rolę odgrywa tenascyna. W zarodkach kury jej ekspresję wykrywa się najpierw w migrujących KGN, a następnie w prekursorach limfocytów leżących na rosnących końcach nerwów obwodowych. Tenascyna pobudza wzrost aksonu oraz powoduje formowanie się włókna nerwowego, ograniczając przypadkową migrację prekursorów limfocytów w mezenchymie bogatej w fibronektynę.

Z KGN tułowiowych migrujących brzusznie powstają także komórki chromafinowe rdzenia nadnercza. U świni i szczura chromafinoblasty wnikaające do zawiązka kory nadnercza mają równocześnie cechy komórek nerwowych (wypustki z neurofilamentami i mikrotubulami) i komórek chromafinowych (ziarna chromafinowe i PNMT). Ostateczne różnicowanie się chromafinocytów odbywa się wyraźnie w ich kontakcie z komórkami kory płodowej nadnercza wydzielającymi steroidy, prawdopodobnie androstenedion, ale jeszcze nie glukokortikosteroidy (3,14). U kury KGN migrujące do zawiązka kory nadnercza wykazują ekspresję HNK-1 oraz w 30–50% komórek ekspresję neuropeptydów (galanina, metenkefalina, enolaza specyficzna dla neuronów, somatostatyna) i w około 30% komórek substancji markerowych dla komórek katecholaminowych (hydroksylaza tyrozynowa i chromogranina A i B) [55]. W zwojach sympatycznych późnych zarodków kury znajdują się jeszcze komórki nie w pełni zróżnicowane, które mogą odpowiedzieć na działanie glukokortykoidów *in vitro* wytworzeniem ziaren chromafinowych. [52]. Wykazano także, że niektóre retinoidy (trans-RA i 13-cis-RA) zwiększają *in vitro*

liczbę KGN tułowiowych różnicujących się w komórki adrenergiczne, a zmniejszając liczbę melanoblastów [51].

#### 4. Różnicowanie się melanocytów

KGN emigrujące z cewy nerwowej w ostatniej kolejności wchodzi na szlak boczny, są to prekursorzy melanoblastów, z których różnicują się melanocyty [60]. Rozpoczynając migrację są one jeszcze pluripotenne i *in vitro* mogą się różnicować zarówno w melanoblasty, jak i w komórki nerwowe [63].

Po oddzieleniu się od cewy nerwowej prekursorzy melanoblastów zatrzymują się i zagęszczają w przestrzeni między cewą nerwową, somitem a ektoderma, nazywanej MSA (*migration staging area* – obszar przeszkolenia w czasie migracji) [16,68,4 – rys. 5]. Nie jest jasne, jakie są przyczyny tego zatrzymania. Być może szlak brzuszny jest wypełniony migrującymi KGN, które wcześniej (u zarodków kury 24 godziny różnicy) opuściły cewę nerwową, jest więc dla prekursorów melanoblastów niekorzystny, a wejście do szlaku bocznego jest jeszcze niedostępne [60].

Zatrzymanie i skupienie KGN w MSA jest ważnym etapem ich różnicowania się w melanoblasty i uzyskiwania zdolności do migracji szlakiem bocznym [16]. W hodowli *in vitro* proste zahamowanie rozprzestrzeniania się KGN powoduje zbijanie się ich w gęste skupiska i różnicowanie w melanoblasty [63]. KGN dopiero jak zostaną zróżnicowane lub co najmniej ukierunkowane w melanoblasty, wchodzi na szlak boczny. Inne KGN, izolowane z tylnych łuków skrzelowych (a więc już niezawierające prekursorów melanoblastów) wszczepione w okolice tułowiowej cewy nerwowej nie są zdolne do wejścia na szlak boczny [16].

Wyjście prekursorów melanoblastów z MSA na szlak boczny może być regulowane przez ECM. Zaczynają one migrację po zmniejszeniu się ilości siarczanu chondroityny i substancji wiążącej lektynę PNA w ECM. Obie te substancje wydzielane przez dermatom opóźniają wejście KGN na szlak boczny. Usunięcie bowiem dermatomyotomu przed rozpoczęciem migracji KGN przyspiesza ich wejście na szlak boczny [16].

O rozpoczęciu różnicowania się pluripotentnych KGN zatrzymanych w MSA świadczą zmiany ich właściwości. Na KGN ptaków pojawia się marker dla melanoblastów epitop MEBL-1 [24], zanika ekspresja siarczanu 6 chondroityny i nie wiążą aglutynującej lektyny PNA [43]. W okolicy tyłomózgowia zarodków myszy wykrywa się w komórkach zatrzymanych w MSA mRNA dla receptora c-kit oraz TRP-2 – białko charakterystyczne dla melanogenezy. [64,68].

Nie wiadomo jednak, jakie czynniki wpływają na ukierunkowanie, a następnie różnicowanie się KGN zatrzymanych w MSA. Mogą to być czynniki wzrostowe. W tym rejonie wykazano obecność zasadowego FGF [66]. TGF  $\beta$ -1 dodany do hodowli tułowiowych KGN zmniejsza liczbę prekursorów melanoblastów, natomiast

przeciwciała anti-TGF stymulują rozwój melanocytów [28]. Inny czynnik wzrostowy SCF<sup>1</sup> zmniejsza adhezję melanocytów płodu i noworodka człowieka do FN i kolagenu IV, a zwiększa do lamininy. Reguluje ekspresję integryn na poziomie białka [57]. Działa również na KGN *in vitro* stymulując proliferację i przeżywanie tych, które wykazują ekspresję c-kit i TRP-2. Komórki te dla przeżycia potrzebują przejściowo związania się SCF z receptorem c-kit [49,68]. Lanngtim-Sedlak et al. [27] uważają, że działanie SCF na KGN linii melanoblastycznej jest złożone. SCF jest niezbędny dla przeżycia tych komórek w pierwszej fazie hodowli, nie ma jednak wpływu na melanogenezę. Kombinacja SCF z neurotrofiną BDGF przedłuża przeżywalność KGN melanoblastycznych, natomiast SCF w obecności neurotrofin NGF i NT-3 traci troficzne działanie na KGN. Skoro SCF jest niezbędny dla przeżycia KGN prekursorów melanoblastów, powinien znajdować się na drodze ich migracji. Wykazano istotnie, że m-RNA dla SCF pojawia się w MSA na 12 godzin wcześniej, niż rozpoczyna się migracja boczna. W dermatomach natomiast ekspresja m-RNA SCF występuje w okresie poprzedzającym migrację KGN i zanika, kiedy dermatom przekształca się w strukturę mezenchymatyczną. SCF w formie rozpuszczalnej zostaje zachowany w ECM [68].

Nieco światła na rolę SCF w różnicowaniu się prekursorów melanoblastów rzuciły obserwacje mutantów myszy z zaburzeniami w produkcji melanocytów. U zarodków mutantów Steel-dickie (Sld) brak jest osadzonej stale w błonie komórkowej części SCF, a produkowany jest wyłącznie rozpuszczalny SCF. Prekursory melanoblastów wobec obecności rozpuszczalnego SCF wchodzą u tych zarodków na szlak boczny, ale następnie nie przeżywają w mezenchymie skóry. Mutanty Steel-null (SI<sup>null</sup>) są pozbawione całkiem SCF. U homozygotycznych zarodków tej mutacji KGN widoczne są w MSA, ale nie migrują dalej i następnie zanikają. Prawdopodobnie nie przeżywają wobec braku SCF. Stąd wyciągnięto wniosek, że SCF rozpuszczalny działa jako atraktant i jest niezbędny dla migracji bocznej KGN, a SCF osiadły w błonie komórkowej jest niezbędny dla przeżycia prekursorów melanoblastów. Na podstawie tych obserwacji Wehrle-Haller i Weston [68] sądzą, że komórki zawierające receptor c-kit i TRP-2 mogą migrować szlakiem brzuszynym i bocznym, jednak przeżywają one tylko na szlaku bocznym, gdzie rozpuszczalny SCF znajduje się w ECM. Komórki, które mają ekspresję c-kit, mogą być selektywnie przyciągane przez SCF [16].

Yoshida et al. [69] badali rolę receptora c-kit w różnicowaniu się melanocytów u myszy. Wykazali, że prekursorzy melanocytów w niektórych fazach rozwoju i zróżnicowania nie potrzebują sygnałów przekazywanych przez receptor c-kit. Obecność receptora c-kit oraz receptorów dla endoteliny (3 i B) konieczna jest dla migracji prekursorów melanoblastów szlakiem bocznym oraz dla proliferacji melanoblastów w naskórku. Migracja prekursorów melanoblastów w tkance łącznej skóry przed zasiedleniem naskórka, jest niezależna od obecności receptora c-kit.

*In vitro* szereg substancji wpływa na przekształcanie się KGN w melanoblasty. Kwas retinowy – RA dodany do hodowli wczesnych tułowiowych KGN powoduje ich różnicowanie się w melanoblasty i w komórki adrenogeniczne. Przy zastosowaniu analizy klonalnej wykazano, że RA działa na KGN pluripotenne, a kierunek różnicowania jest zależny od stadium rozwojowego, w którym poddane są działaniu RA. Tylko wczesne KGN, które nie zatrzymały się w MSA, ulegają zróżnicowaniu w komórki adrenergiczne. Natomiast KGN pobrane z MSA rozwijają się w melanocyty. RA stymuluje syntezę pigmentu w KGN *in vitro* [11].

Niektóre hormony wpływają na różnicowanie się KGN w melanoblasty *in vitro*. Alfa-MSH działa stymulująco i silniej niż L-tyrozyna [18].

Melanocyty i melanoblasty mają większą zdolność migracji niż inne komórki pochodne KGN; zachowują się jak komórki inwazyjne. Starsze KGN, już ukierunkowane w melanoblasty, migrują na znacznie większe odległości niż młodsze. Im dłużej KGN są hodowane *in vitro*, tym bardziej stają się inwazyjne. Melanocyty dojrzewające *in vitro* są zdolne do przekraczania błony podstawnej i zasiedlania ektodermy. Nieznana jest jednak przyczyna tych właściwości. Możliwe, że melanoblasty w czasie różnicowania się mogą nabywać receptory dla cząsteczek adhezyjnych inne niż w pozostałych subpopulacjach KGN, co zwiększa ich mobilność [16].

## 5. Różnicowanie się czaszkowych komórek grzebienia nerwowego

Czaszkowe KGN dają początek zarówno linii nerwowej komórek, jak i mezoektodermie. Ponieważ są one głównym źródłem szkieletu, tkanki łącznej i mięśni gładkich głowy, mają wpływ na tworzenie się "wzoru" głowy. Od dawna zwrócono na to uwagę obserwując liczne wady rozwojowe głowy u ludzi, jak i liczne mutacje u myszy związane z nieprawidłowym rozwojem tych komórek.

Szeroki zakres wyspecjalizowanych komórek, jakie różnicują się z czaszkowych KGN, różni ich potencje rozwojowe od tułowiowych KGN. Różnice są już widoczne w okresie rozpoczynającej się migracji, kiedy czaszkowe produkują znacznie większe ilości FN i prokolagenu I. Czaszkowe i tułowiowe odmiennie reagują na działanie TGF- $\beta$  1, który to czynnik jest niezbędny dla ekspresji FN i prokolagenu I [28]. Le Blanc i wsp. [28] sądzą, że endogenne TGF- $\beta$  jest potrzebny dla ekspresji fenotypu mezenchymalnego czaszkowych KGN.

Gen *Wnt-1*<sup>2</sup> jako jeden z pierwszych wykazuje ekspresję w rozwoju układu nerwowego. Pojawia się ona w zarodkach myszy w płycie nerwowej w obszarze presumywnego śródmózgowia, a następnie w czasie zamykania się cewy nerwowej



na całej jej długości. Następnie ekspresja *Wnt-1*<sup>2</sup> zanika w okolicy dającej początek KGN, co uważa się za pierwszą oznakę wyodrębniania się KGN [13].

Różnicowanie się czaszkowych KGN wiąże się z aktywnością niektórych genów homeotycznych, których ekspresja zachodzi w czasie rozwoju zarodka w rombomerach tyłomózgowia.

Ekspresja genów z rodziny *Pax*, odpowiedzialnych za grzbietowo-brzuszne różnicowanie się cewy nerwowej, występuje w rombomerach i KGN. *Pax-7* ulega ekspresji w nieparzystych, a *Pax-3* we wszystkich rombomerach z wyjątkiem r5. *Pax-3* jest aktywny w KGN i ich neurogennych pochodnych (zwoje czuciowe, komórki Schwanna). Brak genu *Pax-3* jest kompensowany przez *Pax-7*, natomiast brak *Pax-7* powoduje zaburzenia w rozwoju szczęki górnej [35].

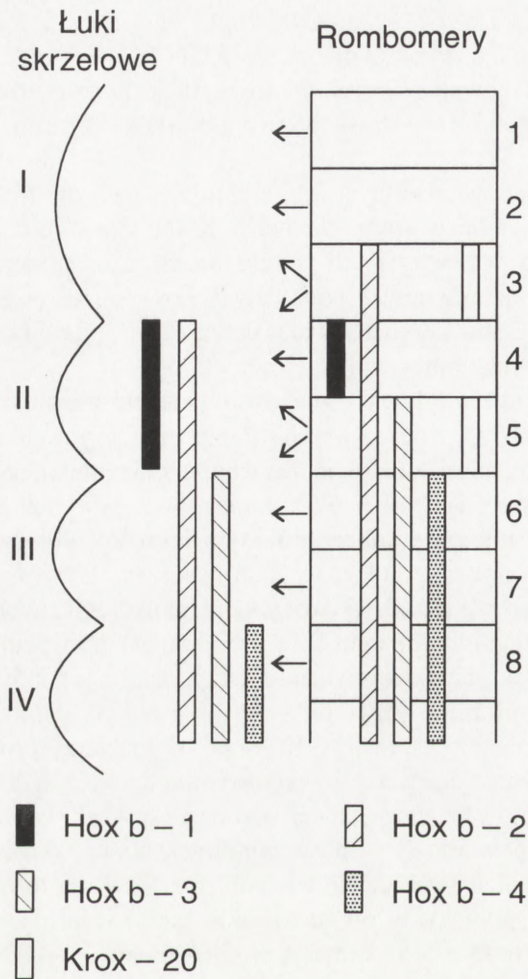
W tyłomózgowiu wczesnych zarodków myszy i ptaków wykazano ekspresję genów homeotycznych z kodu *Hox* (tab. 1) wpływających na segmentację zarodka. Rozpoczęcie ekspresji tych genów zależne jest od kolejności ich ułożenia linearnego w kompleksie [1]. Przednie granice ekspresji genów *Hox* w tyłomózgowiu są wyraźnie zaznaczone i odpowiadają granicom między rombomerami. Im bardziej tylne są rombomery, tym więcej kolejnych genów *Hox* ulega w nich ekspresji. U myszy ekspresja genów *Hox* ujawnia się jeszcze przed wytworzeniem morfologicznych rombomerów, a potem zaznacza granice między nimi [21]. Rombomery transplantomowane w ektotopowe miejsce zachowują charakterystyczną dla nich ekspresję genów *Hox* wskazującą na ich wyjściowe położenie [58].

Na ogół geny *Hox* ulegają takiej samej ekspresji w KGN jak w macierzystym rombomerze. KGN przekazują ten wzór ekspresji do odpowiednich tworzonych przez nie łuków skrzelowych i do zwojów czuciowych nerwów czaszkowych. Wzór ekspresji genów *Hox* jest następnie powtarzany w poszczególnych łukach skrzelowych i w rozwoju pochodzących z nich struktur głowowych (rys. 1). Rola rombomerów polega między innymi na pomocy w organizowaniu takiej informacji pozycjonalnej. Czaszkowe KGN przenosząc tę informację w odróżnieniu od KGN innych rejonów mają "jedyną" zdolność wpływania na wzór formowania się głowy [25,42,47,71].

Rola genów *Hox* nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Czy ekspresja genów *Hox* jest przekazywana z rombomerów do KGN biernie, czy KGN mają odrębną ich regulację, nie jest jeszcze jasne. Dotychczasowe obserwacje wskazują na obydwie te możliwości.

Przednia granica ekspresji genu *Hoxa-2* leży na przedniej krawędzi r2. Przedmigracyjne KGN zawarte w r2 wykazują ją także, natomiast zanika ona po rozpoczęciu migracji i nie obserwuje się jej w KGN zasiedlonych w I łuku skrzelowym.

<sup>2</sup>Gen *Wnt-1* koduje białka sekrecyjne należące do rodziny Wnt, odpowiednik genu segmentacyjnego *Drosophila* wingless [1]. Protoonkogen *Wnt-1* koduje u myszy bogatą w cysteinę sekrecyjną glikoproteinę należącą do dużej rodziny białek sygnalizacyjnych [13].



Rys.1. Schemat ekspresji genów *Hoxb* i *Krox-20* w rombomerach i łukach skrzelowych; strzałki wskazują kierunek migracji komórek z grzebienia nerwowego do łuków skrzelowych

wyodrębnieniem się w niej granic rombomerów. Jego ekspresja jest czasowa i po wytworzeniu się rombomerów zanika. Jednak brak tego genu u zarodków mutacji myszy *Hoxa-1<sup>-</sup>* powoduje zaburzenia w migracji KGN czaszkowych na skutek redukcji r4 i zaniku r5. Jak z tego wynika, czasowa ekspresja genu *Hoxa-1* jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju segmentacji rombomerów 4– 6 i związanej z nimi migracji KGN [36]. Natomiast u zarodków myszy transgenicznych, którym wprowadzono gen *Hoxa-1* wraz z aktywowującym go genem  $\beta$ -aktyny i u których

Jest to, jak się wydaje, właściwość charakterystyczna tylko dla tego rombomeru, gdyż po przemieszczeniu go w ektotopową okolice (r4 + r5), KGN z niego pochodzące tracą również ekspresję *Hoxa-2* na początku migracji [47].

Ekspresja genu *Hoxa-3* u zarodków kury jak i myszy zachodzi w r5 do r8. W subpopulacji KGN migrujących z r5 ku przodowi do II łuku skrzelowego zanika ekspresja *Hoxa-3*, natomiast pozostaje w KGN tworzących zwoje czuciowe VII i VIII nerwów czaszkowych oraz w subpopulacji KGN migrujących z tego rombomeru ku tyłowi do III łuku skrzelowego. W wyniku doświadczalnej zmiany położenia rombomerów wykazano, że zanik ekspresji *Hoxa-3* w jednej populacji KGN z r5 zachodzi pod wpływem środowiska, natomiast ekspresja *Hoxa-3* w KGN z r6 nie podlega takim wpływom i jest autonomiczna [54].

Wydaje się, że geny *Hox* mogą wzajemnie na siebie oddziaływać. W zarodkach myszy gen *Hoxa-1* ulega ekspresji w presumywnym obszarze r4– r7 cewy nerwowej przed

Tabela 1. Ekspresja genów *Hox* i *Krox-20* w rombomerach zarodków ptaków i ssaków (na podstawie [1, 17, 36, 54, 58])

Rombomery	<i>Hoxa-1</i>	<i>Hoxa-2</i>	<i>Hoxa-3</i>	<i>Hoxb-1</i>	<i>Hoxb-2</i>	<i>Hoxb-3</i>	<i>Hoxb-4</i>	<i>Hoxb-7</i>	<i>Krox-2</i>
1									
2		X							
3		X							X
4	X	X	X	X	X	X			
5	X	X	X	x	X	X			X
6	X	X	X	X	X	X	X		
7	X	X	X	X	X	X	X	X	

x – słaba ekspresja przejściowa

uzyskano ektotopową ekspresję *Hoxa-1* w całym zarodku, obserwowano zmiany w ekspresji innych genów *Hox*. Silna ekspresja *Hoxa-2* i *Hoxb-1* wystąpiła w r2 i r3 oraz w ektomezodermalnych KGN z nich pochodzących zmieniając ich właściwości na identyczne z r4. Zmiany te nie dotyczyły neuronów pochodzących z tych rombomerów [36].

Mimo iż poszczególne rombomery i pochodzące z nich KGN zachowują odrębną tożsamość, niektóre ich właściwości mogą być modulowane przez sąsiednie rombomery. Procesem takim jest regulacja częściowej apoptozy KGN z r3 i r5 pod działaniem BMP-4 wydzielanym przez sąsiednie parzyste rombomery [20,21].

Ekspresja niektórych czynników regulujących transkrypcję odpowiada także granicom między rombomerami i jak się przypuszcza, czynniki te są także determinantami fenotypu rombomeru. Geny *Krox-20* u zarodka kury ulegają ekspresji w r3 i r5. W KGN ekspresja *Krox-20* jest ograniczona do komórek migrujących z przedniej części r5. [41,71].

Od dawna wiadomo, że podanie wczesnym zarodkom ptaków kwasu retinowego RA<sup>3</sup> lub jego pochodnych powoduje zaburzenia w rozwoju głowy. Podobnie u ssaków obserwuje się malformacje głowy płodów zarówno przy nadmiarze, jak i braku RA u ciężarnej samicy. Szereg badań poświęcono wpływowi retinoidów na różnicowanie się czaszkowych KGN i ich pochodnych.

<sup>3</sup> RA jest cząsteczką liposolubną, zdolną do przenikania przez błonę komórkową i jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie aktywnie rozpoznaje i aktywuje receptory, między innymi rodzin RAR (receptor kwasu retinowego o palcach cynkowych zdolnych do rozpoznawania specyficznych sekwencji promotorowych RARE) oraz RXR (receptor retinoidu X). W transporcie kwasu retinowego do jądra bierze udział białko CRABP (*cellular retinoic acid binding protein*). RA działa jako regulator transkrypcji, ale także może aktywować ekspresję docelowego genu [1,10,26]. *In vitro* RA ma zdolność bezpośredniego aktywowania genów *Hox*, wiele genów tej rodziny ma elementy RARE [1].

RA działając na całe zarodki (myszy, szczura, kury) powoduje posterioryzację w osi ciała pierwszych rombomerów (r2 i r3 wykazują cechy r4 i r5), na skutek przesunięcia ku przodowi granic ekspresji genów *Hoxb-1* i *Hoxb-2* i *Krox-20* w rombomerach. Pociąga to za sobą zmiany w migracji KGN, a następnie zlanie si I i II łuków skrzелowych w jedną strukturę oraz zmiany w zwojach nerwów czaszkowych (nerwu trójdzielnego na twarzowy) [17]. Nasilenie tych zmian jest zależne od stadium rozwoju cewy nerwowej, w którym działa RA oraz od jego stężenia [37]. W fazie płytki nerwowej u szczura RA powoduje homeotyczną transformację rombomerów i ich KGN. Natomiast RA podane w fazie zamykania się fałdów nerwowych działa na rombomery o już ustalonej identyczności przez co nie wywołuje już zmian posterioryzacyjnych [32]. U kury pod wpływem działania RA w niskich stężeniach (10 mg/ml) na zamykającą się cewę nerwową zanika granica między pierwszym i drugim strumieniem KGN migrujących do I i II łuków skrzелowych. Pod wpływem wyższych stężeń (100 mg/ml) zarodki, które przeżyją, wykazują chaotyczną migrację KGN [17].

Precyzyjne badania przeprowadzili Gale i wsp. [17] wprowadzając RA wraz z barwnikiem przyżyciowym Dil do pojedynczych rombomerów. RA wprowadzony do r2 i r6 nie zmienia szlaku ani właściwości KGN z nich migrujących. Natomiast pod wpływem RA uwidaczniały się dwie odrębne subpopulacje KGN opuszczające r4. Migrujące normalnym szlakiem ku przodowi dawały początek mezoektodermie i pozostawały niezmienione. Druga subpopulacja dającą pochodne neurogenne wyraźnie zmieniona przesuwiała się początkowo ku tyłowi i rozdzielała się pod pęcherzykiem usznym na dwa ciągi: brzuszny i tylny. Autorzy ci wykazali, że pod wpływem RA w r4 zachodzi ektotopowa ekspresja *Krox-20*, zmniejsza się ekspresja *Hoxb-1*, a *Hoxa-2* nie zmienia się. Uważają oni, że zmiany w ekspresji *Krox-20* są odpowiedzialne za nieprawidłowy rozwój neurogennych pochodnych KGN.

Zaburzenia w rozwoju łuków skrzелowych pod wpływem RA, jak wynika z przytoczonych wyżej eksperymentów, są związane z nieprawidłową migracją KGN. Jedną z przyczyn różnic w migracji może być odmienna ekspresja kadheryn na tych subpopulacjach KGN. U zarodków ptaków działanie RA przedłuża ekspresję N-CAM w czaszkowych KGN, przez co komórki te *in vitro* tworzą zbite grupy, nie migrują i tracą możliwości różnicowania się w komórki mezenchymalne [62].

Zmiany we właściwościach KGN prawdopodobnie nie zależą wyłącznie od zmian w ich macierzystych rombomerach. Same KGN, jak się wydaje, mają zdolność reagowania z RA, dzięki obecności jego receptorów. Transkrypt genu *RXR-gama* pojawia się bowiem w zarodku kury w czaszkowych KGN, które rozpoczynają migrację z cewy nerwowej (i stanowić może wcześniejszy ich marker niż *HNK-1*). Transkrypt ten jest obecny w czasie migracji KGN, zanika w różnicującej się linii komórek ektomezodermy, natomiast utrzymuje się w komórkach zwojów czuciowych nerwów czaszkowych [53]. *CRABP-1* u szczura i myszy wykrywany jest w ekto-

mezodermie II–IV łuków skrzelowych i w obszarze czołowo-nosowym, słabo uwiadczenia się w mezenchymie I łuku skrzelowego [32, 33, 34]. Po podaniu RA wczesnym zarodkom szczura hodowanym *in vitro*, u których zachodzi fuzja I i II łuków skrzelowych, CRABP-1 uwiadczenia się także w mezenchymie I łuku skrzelowego. Ekspresja CRABP w rombomerach i łukach skrzelowych po działaniu RA jest zgodna ze zmianą ekspresji genów *Hox* i *Krox-20* [32].

U myszy w fałdach nerwowych i migrujących KGN z 2r i 4r oraz w I i II łukach skrzelowych ulega silnej ekspresji czynnik transkrypcyjny AP-2, ekspresja ta jest indukowana przez RA [56, 70]. U mutantów myszy z celowaną mutacją powodującą całkowity brak genu dla AP-2 (AP-2<sup>-/-</sup>) fałdy nerwowe w części mózgowej nie zamykają się, cały mózg pozostaje otwarty i zaburzony jest rozwój przednich części głowy. W rejonie rdzenia kręgowego cewa nerwowa rozwija się natomiast normalnie. Niektóre KGN migrują i mogą różnicować się w odpowiednim dla nich położeniu w komórki mezenchymalne, lecz te następnie obumierają (apoptoza) w przednim rejonie głowy i w rejonie zwoju nerwu trójdzielnego [56,70], Wskazywałoby to, że w braku AP-2 KGN migrują normalnie, ale nadają wadliwe sygnały i powstałe z nich komórki mezenchymalne nie przeżywają.

Gale i wsp. [18] sądzą, że w okresie rozwoju cewy nerwowej i jej pochodnych w zarodkach kręgowców występuje endogenne RA, którego działanie wymaga związania się z obydwojoma jego receptorami.

Prekursory czaszkowych KGN mają zdolność regeneracji, co wykazano przez wycinanie grzbietowych części rombomerów. Nie spowodowało to zmiany normalnej morfogenezy łuków skrzelowych ani zmiany ekspresji genów *Hoxa-3* i *Hoxb-4*. [9,22].

Dalsze różnicowanie się komórek mezoektodermalnych, pochodnych czaszkowych KGN w różne fenotypy jest opisane od strony zmian morfologicznych. Można przypuszczać, że odbywa się pod wpływem wielu lokalnie występujących czynników. Ostatnio pojawiło się doniesienie o wpływie tenascyny-C na różnicowanie się komórek mezoektodermalnych w chrząstkę i kości błoniaste łuku szczękowego u zarodków kury [19].

## 6. Różnicowanie się wagalnych komórek grzebienia nerwowego

KGN z rejonu wagalnego dają początek podobnie jak czaszkowe KGN licznym rodzajom komórek [patrz 4].

Ito i Sieber-Blum [23] badali w hodowlach klonalnych potencje rozwojowe KGN, które dotarły do III i IV łuku skrzelowego. Stanowią one heterogenną populację komórek już ukierunkowanych i komórek pluripotentnych. Pierwsza segregacja KGN

na ukierunkowane w melanoblasty i neuroblasty zachodzi w okresie przedmigrującym lub/i w czasie rozpoczęcia migracji. KGN ukierunkowane w neurony zachowują epitop HNK-1 i wykazują ekspresję SSEA-1. Następnie w obrębie łuków skrzelowych ukierunkowane zostają prekursorzy miocytów gładkich. Najpóźniej różnicują się komórki przeznaczone na utworzenie tkanki łącznej. Ostateczne zróżnicowanie komórek zależy od miejsca ich końcowej lokalizacji.

KGN migrujące brzusznie z poziomu 1–7 somitu dają początek komórkom nerwowym i glejowym splotów nerwowych jelitowych. Ta subpopulacja komórek jest prawdopodobnie przyciągana przez substancje wydzielane w jelicie w drodze chemotaxis. U zarodków ptaków bowiem tułowiowe KGN przeniesione w rejon wagałny migrują do jelita [31]. Po wnikięciu do ściany jelita KGN zachowują ekspresję HNK-1, są przypuszczalnie jeszcze pluripotentne, a ostateczne ich zróżnicowanie w neurony zachodzi dopiero pod wpływem mikrośrodowiska jelita [8].

KGN wchodzące do jelita wykazują obecność neurofilamentów, receptora o niskim powinowactwie dla neurotrofiny ( $p^{75\text{LNGFR}}$ ), enzymów biorących udział w biosyntezie katecholamin (hydroksylazy tyrozynowej, hydroksylazy dopaminy  $\beta$ -DBH) oraz receptora kinazy tyrozynowej c-RET, białka MASH-1. Są one zdolne do specyficznego pobierania  $^3\text{H}$ -epinefryny. Właściwości te są również charakterystyczne dla KGN prekursorów linii sympato-adrenalnej [6, 12]. Dopiero po zasiedleniu się w ścianie jelita różnicują się w neurony cholinergiczne.

Według Durbec et al. [12] są dwa źródła neuronów jelitowych. Jedna subpopulacja pochodzi z GN tylnej części tyłomózgowia (1–5 somitu), druga z poziomu 6 i 7 somitu. Różnią się obecnością receptora c-RET, którego ekspresja zachodzi wyłącznie w drugiej subpopulacji. Rola receptora c-RET nie jest wyjaśniona, być może jest on potrzebny dla przeżywania tej podlinii KGN. U myszy mutantów *c-ret*<sup>-/-</sup> w rejonie somitów 6 i 7 powstają co prawda KGN, ale nie są one zdolne do migracji poza jelito przednie i zasiedlenia jelita środkowego i tylnego. [12]. Blaugrund et al. [6] wyróżnili dwie podlinie w subpopulacji z *c-ret*. Początkowo KGN z *c-ret* nie mają ekspresji *Mash-1*. Pojawia się ona w pierwszej fali emigrujących KGN wraz z ekspresją antygeny powierzchniowego SA (charakterystycznego dla prekursorów neuronów sympatycznych). W podlinii tej następnie zanika ekspresja SA, a pojawia się ekspresja antygeny powierzchniowego B2. Ta podlinia daje początek neuronom serotoninogennym, brakuje jej u myszy z celowaną mutacją *Mash-1*<sup>-/-</sup>. Druga później migrująca podlinia KGN nie wykazująca ekspresji *Mash-1* różnicuje się w neurony zawierające CGRP.

Funkcjonalne rozgraniczenie między wagałnymi a tułowiowymi odcinkami NC jest niewyraźne. Prekursorzy komórek zwoju górnego szyjnego pnia współczulnego i prekursorzy neuronów splotów jelitowych stanowią przejściowo jedną pulę komórek wykazującą obecność c-RET. Durbec i wsp. [12] wykazali, że obie te podlinie pochodzą z poziomu 6 i 7 somitu i gromadzą się początkowo w mezenchymie

między aortą grzbietową a jelitem przednim. Obie te linie komórek objęły wspólną nazwą linii sympatoenteralnej.

## ZAKOŃCZENIE

Komórki pochodzące z grzebieni nerwowych stanowią bardzo ciekawy i dogodny model wielorakich badań biologicznych. Można prześledzić ich rozwój od komórek pluripotencyjnych i niezróżnicowanych w wysoce wyspecjalizowane różnorodne fenotypy. Stanowią one obiekt dla badań nad procesami różnicowania się zarówno nad wpływem genów, jak i mikrośrodowiska na te procesy. Prześledzenie ich rozwoju i różnicowania daje możliwość dokładniejszego poznania prawidłowego rozwoju niektórych narządów, ale także i zaburzeń, i defektów rozwojowych (defekty rozwoju głowy, *megacolon* i inne). Są również przedmiotem zainteresowania onkologów ze względu na nowotwory (*neuroblastoma*, *phaeochromocytoma*, *paraganglioma*, *melanoma* i inne) powstające na skutek ich nieprawidłowego różnicowania się i rozwoju, co nie było przedmiotem tego artykułu.

## Podziękowanie

Dziękuję pani dr. Annie Duszewskiej za pomoc w wyszukiwaniu literatury.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BALLY-CUIF L. Les Genes du developpement. Nathan Universite, 1995, Paris.
- [2] BHATTARAYA A, BACKENBURY R, RATNER N. Axon arrest the migration of Schwann cell precursor, *Development* 1994; **120**: 1411–1420.
- [3] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Ultrastructural and histochemical investigations of the development of the medullary part of the adrenal gland in domestic pig (*Sus scrofa dom.*) during the prenatal period. *Folia Morph* 1989; **48**: 59–87.
- [4] BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z. Komórki grzebienia nerwowego. I. Powstawanie i migracja. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 173–191.
- [5] BIRGBAUER E, SECHRIST J, BRONNER-FRASSER S. Rhombomeric origin and rostrocaudal reasortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. *Development* 1995; **121**: 935–945.
- [6] BLAUGRUND E, PHAM TD, TENNYSON VM, LO L, SOMMER L, ANDERSON DJ, GERSHON MD. Distinct populations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineal markers and *Mash-1*-dependence. *Development* 1996; **122**: 309–320.
- [7] BRAUER Ph R, MARKWALDRR. Attachment of neural crest cells to endogenous extracellular matrix. *Anat Rec* 1987; **219**: 275–285.

- [8] CHALAZONITIS A, ROTHMAN T P, CHEN J, LAMBALLE F, BARBACID M, GERSHON MD. Neurotrophin-3 induces neural crest derived cells from rat gut to develop *in vitro* as neurons or glia. *J Neurosci* 1994; **14**: 6571–6584.
- [9] COULY G, GRAPIN-BOTTON A, COLTEY P, LE DOUARIN NM. The regeneration of the cephalic neural crest, a problem revisited; the regenerating cells originate from the contralateral or from the anterior neural fold. *Development* 1996; **122**: 3393–4307.
- [10.] CZEKAJ P. Interakcje receptorów hormonów tarczycy i pochodnych witaminy A i D. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 261–278.
- [11] DUPIN E, Le DOUARIN ML. Retinoic acid promotes the differentiation of adrenergic cells and melanocytes in quail neural crest culture. *Dev Biol* 1995; **168**: 529–548.
- [12] DURBEC PL, LARSSON-BLOMBERG LB, SCHUCHARDT A, CONSTANTIN F. Common origin and developmental dependence on *c-ret* subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 1996; **122**: 349–358.
- [13] ECHELARD Y, VASSILEVA G, Mc MAHON AP. Cis-activating regulatory sequences governing *Wnt-1* expression in the developing mouse CNS. *Development* 1994; **120**: 2213–2224.
- [14] EHRlich ME, EVIGER M, REGUNATHAN S, TEITELMAN G. Mammalian adrenal chromaffin cells coexpress the epinephrine-synthesizing enzyme and neuronal properties *in vivo* and *in vitro*. *Dev Biol* 1994; **163**: 480–490.
- [15] ERICKSON CA. From onset to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation. *Pigm Cell Res* 1993; **6**: 336–347.
- [16] ERICKSON CA, GOINS TL. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development* 1995; **121**: 915–924.
- [17] GALE E, PRINCE V, LUMSDEN A, CLARKE J, HOLDER N, MADEN M. Late effects of retinoic acid on neural crest and aspects of rhombomere identity. *Development* 1996; **122**: 783–793.
- [18] GENDRE L, SCHOWING J. Influence of chick embryo extract, melanocyte stimulating hormone and L-tyrosine on the differentiation of the mouse neural crest into melanocytes. *Europ Arch Biol* 1993; **104**: 83–91.
- [19] GLUHAK J, MAIS A, MINA M. Tenascin-C is associated with early stages of chondrogenesis by chick mandibular ectomesenchymal cells *in vivo* and *in vitro*. *Dev Dynam* 1996; **205**: 24–40.
- [20] GRAHAM A, LUMSDEN A. Interactions between rhombomeres modulate *Krox-20* and follistatin expression in the chick embryo hindbrain. *Development* 1996; **122**: 473–480.
- [21] GRAHAM A, PAPALOPULU N, KRUMLAUF R. The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organisation and expression. *Cell* 1989; **57**: 367–378.
- [22] HUNT P, FERRETTI P, KRUMLAUF R, THOROGOOD P. Restoration of normal hox code and branchial arch morphogenesis after extensive deletion of hindbrain neural crest. *Dev Biol* 1995; **168**: 584–597.
- [23] ITO K, SIEBER-BLUM M. Pluripotent and developmentally restricted neural-crest-derived cells in posterior visceral arches. *Dev Biol* 1993; **136**: 191–200.
- [24] KITAMURA K, TAGIGUCHI-HAYASI K, SUZAKI M, YAMAMOTO H, TAKEUCHI T. Avian neural crest cells express a melanogenic trait during early emigration from neural tube: observation with new monoclonal antibody, MEBL-1. *Development* 1992; **114**: 367–378.
- [25] KÖNIGES G, LUMSDEN A. Rhomboccephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. *Development* 1996; **122**: 3229–3242.
- [26] KWIATKOWSKA J. Kwas retinowy reguluje procesy wzrostu i różnicowania. *Post Biochem* 1992; **38**: 32–36.
- [27] LANGSTIM-SEDLAK CJ, SCHROEDER B, SASKOWSKI JL, CARNAHAM JF, SIEBER-BLUM M. Multiple actions of stem cell factor in neural crest cell differentiation *in vitro*. *Dev Biol* 1996; **174**: 345–459.



- [28] LE BLANC G, HOLBERT TE, DARLAND T. Role of the transforming growth factor-beta family in the expression of cranial neural crest - specific phenotypes. *J Neurobiol* 1994; **25**: 497-510.
- [29] LE DOUARIN NM. Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 1986; **231**: 1515-1522.
- [39] LE DOUARIN NM, DUPIN E. Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J Neurobiol* 1993; **24**: 146-161.
- [31] LE DOUARIN NM, THEILLET MA. Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neuroectodermal mesenchyme derivatives, using a biological cell marking technique. *Dev Biol* 1974; **41**: 162-184.
- [32] LEE M, OSUMI-YAMASHITA N, NONOMYA Y, MOON CK, ERICKSON U, ETO K. Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. *Development* 1995; **121**: 825-837.
- [33] LEONARD L, HORTON C, MADEN M, PIZZEY JA. Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. *Dev Biol* 1995; **168**: 514-518.
- [34] LYN S, GINGERE V. Localization of CRABP I and CRABP II mRNA in the early mouse embryo by whole-mount *in situ* hybridization; Implication for teratogenesis and neuronal development. *Dev Dynam* 1994; **199**: 280-291.
- [35] MANSOURI A, STOYKOVA A, TORRES M, GRUSS P. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in *Pax7*<sup>-/-</sup> mutant mice. *Development* 1996; **122**: 831-838.
- [36] MARK M, LUFKIN T, VOESCH JL, RUBERTE E, OLIVO JCh, DOLLE P, GORGY Ph. jr. LUMSDEN A, CHAMBON P. Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development* 1993; **110**: 319-328.
- [37] MARSHALL H, NOCHEV S, SHAM MH, MUCHORE L, LUMSDEN A, KRUMLAUF R. Retinoic acid alters hindbrain *Hox* code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* 1992; **360**: 737-741.
- [38] MURPHY M, REID K, FORD M, FURNESS JB, BARTLETT PF. FGF-2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 1994; **120**: 3519-3528.
- [39] MURPHY P, TOPILKO P, SCNEIDER-MAUNOURY S, SEITANADOU T, BARON-VAN EVERCOOREN A, CHARNAY P. The regulation of *Krox-20* expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development* 1996; **122**: 2847-2857.
- [40] NEWGREEN DF, MINICHELLO J. Control of epitheliomesenchymal transformation. I. Events in onset of neural crest migration are separable and inducible by protein kinase inhibitor. *Dev Biol* 1995; **170**: 91-101.
- [41] NIETO MA, SECHRIST J, WILKINSON DG, BRONNER-FRASER M. Relationship between spatially restricted *Krox-20* gene expression in branchial neural crest and segmentation in the chick embryo hindbrain. *EMBO* 1995; **14**: 1697-1710.
- [42] NODEN DM. Interactions and fates of avian craniofacial. *Development* 1988; **103**: 121-140.
- [43] OAKLEY RA, LASKY CJ, ERICKSON CA, TOSNEY KW. Glycoconjugates mark a transient barrier to neural crest migration in chick embryo. *Development* 1994; **120**: 103-114.
- [44] OCKEL M, LEWIN GR, BARDE YA. *In vivo* effects of neurotrophin-3 during sensory neurogenesis. *Development* 1996; **122**: 301-307.
- [45] OSTROVSKY D, SANGER J, LASH JW. Somatogenesis in the mouse embryo. *Cell Diff* 1988; **23**: 17-26.
- [46] PINCO O, CARMELI C, ROSENTHAL A, KALCHEIM C. Neurotrophin 3 affects proliferation and differentiation of distinct neuronal crest cells and is present in early neural tube of avian embryos. *J Neurobiol* 1993; **24**: 1626-1641.
- [47] PRINCE V, LUMSDEN A. *Hoxa-2* expression in normal and transposed rhombomeres; independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* 1994; **120**: 911-923.

- [48] RATAJCZAK M, GERWIRTZ AM. Rola receptorów obdarzonych wewnętrzną aktywnością kinazy tyrozynowej w regulacji krwiotworzenia u człowieka. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 279–295.
- [49] REID K, NISHIKAWA SI, BARTLETT FF, MURPHY M. Steel factor directs melanocyte development *in vitro* through selective regulation in the number of c-kit + progenitors. *Dev Biol* 1995; **189**: 568–579.
- [50] REISSMANN E, ERNSBERGER U, FRANCIS-WEST PH, RUEGER D, BRICKELL PM, ROHRER H. Involvement of bone morphogenetic protein - 4 and bone morphogenetic protein -7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* 1996; **122**: 2079–2088.
- [51] ROOCKWOOD JM, MAXWELL GD. Analysis of the effects of retinoic-acid on the development of the adrenergic cells from avian neural crest. *Exp Cell Res* 1996: 250–258.
- [52] ROSS S, FISCHER A, UNSICKER K. Sympathoadrenal progenitors in embryonic chick sympathetic ganglia show distinct responses to glucocorticoid hormones. *J Neurocyt* 1995; **24**: 245–256.
- [53] ROWE A, BRICKELL PM. Expression of the chicken retinoid x receptor -gamma in migrating neural crest cells. *Anat Embryol* 1995; **192**: 1–8.
- [54] SALDIVAR JR, KRULL CE, KRUMLAUF R, ARIZA -MC NAUGHTON L, BRONNER-FRASER M. Rhombomere of origin determines autonomous versus environmentally regulated expression of *Hoxa-3* in the avian embryo. *Development* 1996; **122**: 895–904.
- [55] SANCHEZ-MONTESINOS I, MERDA-VELASCO JA, ESPINA-FERRA J, SCOPSI L. Development of the sympatho adrenal system in chick embryo: An immunocytochemical study with antibodies to pan-neurocrine markers, catecholamines-synthesizing enzymes, proprotein-processing enzymes and neuropeptides. *Anat Rec* 1996; **245**: 94–101.
- [56] SCHORLE H, MEIER P, BUCHERTI M, JAENISCH R, MITCHELL PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 1996; **381**: 235–238.
- [57] SCOTT G, EWING J, RYAN D, ABOUD C. Stem cell factor regulates human melanocytes-matrix interactions. *Pigm Cell Res* 1994; **7**: 44–51.
- [58] SECHRIST J, SCHERSON T, BRONNER-FRASER M. Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. *Development* 1994; **120**: 1777–1790.
- [59] SELLECK MAJ, BONNER-FRASER M. Origins of the avian neural crest. The role of neural plate- epidermal interaction. *Development* 1995; **121**: 525–538.
- [60] SERBEDZIJA GN, BRONNER-FRASER M, FRASER S.E. Developmental potential of trunk neural crest in the mouse. *Development* 1994; **120**: 1709–1718.
- [61] SERBEDZIJA GN, FRASER S, BRONNER-FRASER M. Pathway of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dyes labelling. *Development* 1990; **108**: 605–612.
- [62] SHANKAR KR, CHUONG CM, JASKOLL T, MELNICK M. Effect of *in ovo* retinoic acid exposure on forebrain neural crest; *in vitro* analysis reveals up-regulation of N-Cam and loss of mesenchymal phenotype. *Dev Dynam* 1994; **200**: 89–102.
- [63] SIEBER-BLUM M, COHEN AM. Clonal analysis of quail neural crest cells; they are pluripotent and differentiate *in vitro* in the absence of non crest cells. *Dev Biol* 1980; **80**: 86–106.
- [64] STEEL KP, DAVIDSON DR, JACKSON IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. *Development* 1992; **115**: 1111–1119.
- [65] STEMPEL DL, ANDERSON DJ. Lineage diversification of the neural crest : *in vitro* investigation. *Dev Biol* 1993; **159**: 12–23.
- [66] STOCKER KM, SHERMAN L, REES S, CIMENT G. Basic FGF and TGF- $\beta$  1 influence commitment to melanogenesis in neural crest derived cells of avian embryo. *Development* 1991; **111**: 635–645.

- [67] WEHRLE- HALER B, CHIQUET M. Dual function of tenascin. Simultaneous promotion of neurite growth and inhibition of glial migration. *J Cell Sci* 1993; **106**: 597–610.
- [68] WEHRLE-HALLER B, WESTON JA. Soluble and cell bound forms of steel factor activity play distinct roles in melanocytes precursor dispersal and survival on the lateral neural crest migration pathway. *Development* 1995; **121**: 731–742.
- [69] YOSHIDA H, KUNISADA T, KUSAKABE M, NISHIKAWA S, NISHIKAWA SI. Distinct stages of melanocyte differentiation revealed by analysis of nonuniform pigmentation patterns. *Development* 1996; **122**: 11207–11214.
- [70] ZHANG M, HAGOPIAN - DONALDSON S, SERBEDZIJA G, EISEMORE J, PLEHN-DUJOWICH D, Mc MAHON A, FLAVELL RA, WILLIAMS T. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 1996; **381**: 238–241.
- [71] ZHANG M, KIM HJ, MARSHALL H, GEDRON-MAGUIRE M, LUCAS DA, BARON A, GUDAS LJ, GRIDLEY T, KRUMLAUF R, GRIPPO JR. Ectopic *Hoxa-1* induces transformation in mouse hindbrain. *Development* 1994; **120**: 2431–2442.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 12.11.1996 r.*

*Przyjęto 02.04.1997 r.*

*Adres autora: Mickiewicza 21 m 12, 01-517 Warszawa*



## KOMUNIKATY

### Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, za wyróżniającą się oryginalną pracą z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

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 pracą 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 zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- \* 8. Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- \* 9. Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postępach Biologii Komórki".
- \* 10. Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

## KURS CYTOMETRII

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Cytometrii zawiadamia, że w okresie: 10–13 czerwca 1997 r. odbędzie się kurs cytometrii z udziałem wykładowców z zagranicy organizowany przez:

dr J. Dobruckiego w Instytucie Biologii Molekularnej UJ w Krakowie  
(31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3, tel. 34 13 05);

14–15 czerwca odbędzie się związana z kursem Konferencja na temat Cytometrii w Warszawie; informacji udziela dr J. Skierski pod adresem  
*Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel. 41 29 89.*

*Zarząd Polskiego Towarzystwa Cytometrii*

### **Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK**

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwalana zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.











## 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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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. 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 i rysunków na dyskietce (wskazówki na s. 300) przyspieszy publikację. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji 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, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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. I, 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 i pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA 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 doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 4 okł.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania: Dołączono 2 kopie maszynopisu, Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została tabel i rycin. **tak nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**  
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane 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 "Postępkach Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

## TREŚĆ

W tym Zeszycie	97
LEHMANN P.: Molekularne podstawy odporności roślin na choroby – Struktura i funkcja roślinnych genów odporności	99
BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E., ZALEWSKA A.: Mastocyty i fibroblasty – Obojętni sąsiedzi czy przyjaźni partnerzy?	127
WÓJCIK C.: Udział cząsteczek adhezyjnych w wybranych procesach rozwojowych	145
WOJDA A.: Inaktywacja chromosomu X (aktualne doniesienia)	173
BILIŃSKA B.: Regulacja procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga ssaków – Rola białka STAR	183
MIDRO A. T.: Wpływ nosicielstwa translokacji chromosomowych wzajemnych na potomstwo człowieka	203
KILIAŃSKA Z., SZYM CZYK P.: Niskocząsteczkowe jądrowe RNA (snoRNA) – Właściwości i funkcje	227
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Komórki grzebienia nerwowego I. Powstawanie i migracja	259
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Komórki grzebienia nerwowego. II. Różnicowanie	279
Komunikaty	299
Wskazówki przygotowania rysunków	300

## Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1997*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1997 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1997:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 50 zł,  
a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 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 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

**Indeks 369705**