

p 2435
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 26, 1999

Suplement nr 13

Redaktorzy: Andrzej Myśliwski i Zbigniew Kmiec

STARZENIE SIĘ W ASPEKTCIE KOMÓRKOWYM

CELLULAR ASPECTS OF AGING

Redaktor: Maria Olszewska

**MECHANIZMY RÓŻNICOWANIA I WZROSTU
KOMÓREK U ROŚLIN**

**PLANT CELLS DIFFERENTIATION
AND GROWTH MECHANISMS**

<http://rcin.org.pl>

26.12.99

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

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 BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*),

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

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

Jacek KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – molecular biology, biochemie – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*).

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

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

Barbara PŁYTYCZ (immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*)

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 6a*)

Jan ŻEROMSKI (patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*)

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. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© 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.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

STARZENIE SIĘ W ASPEKCIE KOMÓRKOWYM

CELLULAR ASPECTS OF AGING

Redaktorzy

*prof. dr hab. med. Andrzej Myśliwski
i prof. Zbigniew Kmieć*



WPROWADZENIE

INTRODUCTION

Proces starzenia się organizmu przebiega na różnych poziomach jego organizacji, od poziomu molekularnego poczynając. Wprawdzie konferencja została poświęcona głównie zmianom na poziomie komórkowym, jednak rozpoczynają ją referaty poświęcone roli wolnych rodników w procesie starzenia się oraz mechanizmom, które ograniczają ich powstawanie. Tak więc tematyka konferencji obejmuje także poziom molekularny, a to dlatego, że jak obecnie się uważa, właśnie wolne rodniki są jednym z głównych czynników powodujących zmiany obserwowane w komórkach w procesie starzenia się organizmu. Referaty poświęcone zmianom na poziomie komórkowym dotyczą komórek układu immunologicznego, rozrodczego oraz zmianom w działaniu hormonów, wynikającym ze zmian w komórkach dla tych hormonów docelowych. Na ile przedstawione zmiany na poziomie molekularnym a wynikające z działania wolnych rodników można odnieść do omawianych zmian w komórkach okaże się w trakcie konferencji, podczas, miejmy nadzieję interesujących dyskusji. Należy podkreślić, że tematyka prezentowanych referatów wiąże się ściśle z zainteresowaniami badawczymi zespołów, które reprezentują referenci. Jest to więc ilustracja problematyki z zakresu gerontologii doświadczalnej, jaka jest przedmiotem badań w naszym kraju.

Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność Profesor Zofii Osuchowskiej i Profesorowi Jerzemu Kawiakowi, organizatorom corocznych konferencji naukowo-szkoleniowych z zakresu cytofizjologii oraz Redaktorom Postępów Biologii Komórki za to, że umożliwili członkom Komisji Biologii Starzenia PAN zaprezentowanie tematyki gerontologicznej na obecnej konferencji.

*Katedra Histologii i Immunologii
Akademii Medycznej w Gdańsku*

*Prof. dr hab. med. Andrzej Myśliwski
Przewodniczący Komisji Biologii Starzenia
Komitetu Patologii Komórkowej
i Molekularnej PAN*

WOLNORODNIKOWE USZKODZENIA ZASAD AZOTOWYCH DNA I ICH ROLA W PROCESIE STARZENIA ORAZ CHOROBY WIEKU PODESZŁEGO

OXIDATIVE DNA BASE MODIFICATIONS AND THEIR ROLE IN AGEING AND DEGENERATIVE DISEASES

Ryszard OLIŃSKI, Marek JURGOWIAK

Katedra i Zakład Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera,
Bydgoszcz

Streszczenie. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w komórkach jako produkt metabolizmu komórkowego. RFT oddziałują na makrocząsteczki komórkowe: białka, lipidy, jądrowy i mitochondrialny DNA, co prowadzić może do uszkodzeń biomolekuł i zaburzenia funkcji komórek. Uszkodzenia wolnorodnikowe składników komórek kumulują się wraz z wiekiem i są przyczyną starzenia się oraz chorób głównie wieku podeszłego.

(*Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 3–22*)(*Advances in Cell Biology 1999; Supl. 13: 3–22*)

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu, wolne rodniki, uszkodzenia DNA, starzenie, choroby degeneracyjne.

Summary. Reactive oxygen species (ROS) are generated inside a living cell as a byproduct of cellular metabolism. ROS can react with various cell components: proteins, lipids, nuclear and mitochondrial DNA what may result in damages of these biomolecules and cell dysfunction. These lesions accumulate with age and have been postulated to be a major type of endogenous damage leading to ageing and degenerative diseases. This review is an attempt to summarize our present knowledge on the free radical-induced DNA damage involved in ageing and degenerative diseases.

(*Advances in Cell Biology 1999; Supl. 13: 3–22*)

Key words: reactive oxygen species, free radicals, DNA damage, ageing, degenerative diseases.

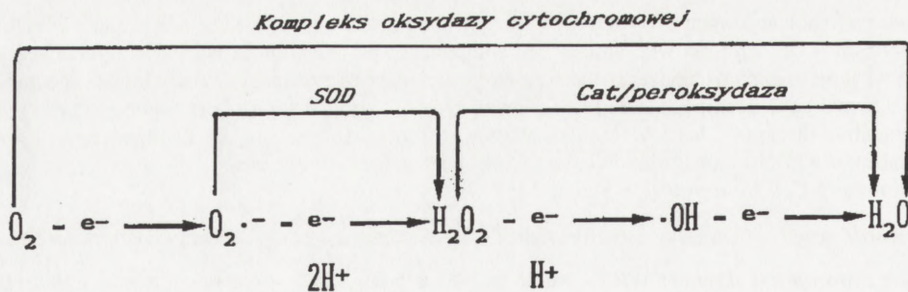
Wykaz stosowanych skrótów: WRT – wolne rodniki tlenowe, RFT – reaktywne formy tlenu, O₂ – anionorodnik ponadtlenkowy, [•]OH – rodnik hydroksylowy, H₂O₂ – nadtlenek wodoru, NO – tlenek azotu, ONOO⁻ – nadtlenoazotyn, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GC/MS – chromatografia gazowa ze spektroskopią masową, HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa, A, T, G, C, U – literowe skróty oznaczają zasady azotowe: adenina, tymina, guanina, cytozyna, uracyl, 8-OH-G –

8-hydroksy-guanina (8-oksoguanina; 7,8-dihydro-8-oksoguanina), **Fapy G** – 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna, **5-OH-C** – 5-hydroksycytozyna, **2-OH-A** – 2-hydroksyadenina, **5-OHMe-Hyd** – 5-hydroksy-5-metylohydantoina.

WSTĘP

Jedna z teorii [21, 22] zakłada, że starzenie się organizmu jest konsekwencją akumulowania w komórkach oksydacyjnych uszkodzeń DNA, białek oraz lipidów i węglowodanów. Te same czynniki mogą stanowić przyczynę chorób wieku podeszłego (nowotwory, miażdżyca, choroby neurodegeneracyjne i inne). Za oksydacyjne uszkodzenia struktur komórkowych odpowiedzialne są wolne rodniki tlenowe (WRT). Wolne rodniki tlenowe mogą powstawać zarówno endogennie, jako produkt uboczny przemian metabolicznych, jak i mogą dostawać się do komórki ze środowiska zewnętrznego (źródła egzogenne). Przyjmuje się obecnie, że w zdrowym organizmie człowieka rocznie powstawać może nawet do 2 kg anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-). Dorosły człowiek (o masie ciała 70 kg), w spoczynku wykorzystuje 3,5 ml O_2 /kg/minutę lub 352,8 l/dzień, lub 14,7 mola/dzień. Jeżeli 1% tlenu pojawia się w formie O_2^- , to: w trakcie jednego dnia wytwarza się 0,147 mola tego rodnika i w okresie 1 roku – 53,66 mola (około 1,72 kg). Podczas wzmożonego wysiłku fizycznego wartość ta może wzrosnąć nawet 10-krotnie [19].

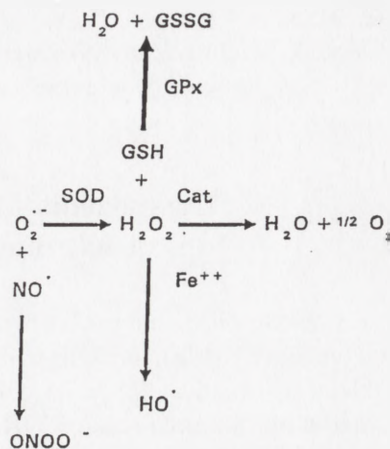
Zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych znajdują się liczne mechanizmy chroniące przed toksycznym działaniem tlenu [4, 52]. Często dochodzi jednak do zaburzenia równowagi między tworzeniem reaktywnych form tlenu (RFT) i działaniem ochronnego systemu antyoksydacyjnego, co określane jest jako „stan szoku tlenowego”. W wyniku szoku tlenowego może dojść do uszkodzenia biomolekuł wchodzących w skład komórki, co z kolei prowadzi do rozwoju



RYSUNEK 1. Schemat szlaku biologicznej redukcji tlenu cząsteczkowego, reaktywne formy tlenu są produktami kolejnych stopni redukcji O_2 : SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, Cat – katalaza

licznych stanów patologicznych. Najgroźniejsze implikacje dla organizmów wielokomórkowych niosą ze sobą reakcje WRT (zwłaszcza rodnika hydroksylowego – OH) z DNA. Takie interakcje prowadzić mogą do utworzenia pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA, wiązań poprzecznych i modyfikacji zasad azotowych. Opisano dotychczas ponad 20 różnego rodzaju oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych [49, 69, 12], ale tylko w kilku przypadkach poznano biologiczne konsekwencje ich obecności w DNA.

Obecnie wskazuje się na mitochondria jako jedno z głównych miejsc generowania WRT w komórce. Struktury te (głównie mitochondrialny DNA – mtDNA) są zatem najbardziej narażone na uszkodzenia przez wolne rodniki, co może być przyczyną roz-



RYSUNEK 2. Metabolizm reaktywnych form tlenu w komórce eukariotycznej; w przemianach RFT uczestniczą specyficzne enzymy oraz związki drobnocząsteczkowe: GSSG – utleniony glutation, GSH – zredukowany glutation, GPx – peroksydaza glutationowa, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, Cat – katalaza

TABELA 1. System ochrony komórki przed działaniem RFT; organizmy aerobowe wykorzystując tlen w procesach oddychania komórkowego (a także w innych procesach metabolicznych) muszą być wyposażone w mechanizmy obrony przed działaniem powstających w komórkach RFT (głównie w mitochondriach) i reagujących ze składnikami komórki: MnSOD – dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca mangan, Cu/ZnSOD – dysmutaza ponadtlenkowa zawierająca miedź i cynk

Typ zabezpieczenia	Główna lokalizacja
Katalaza, MnSOD Witamina E – związana z błoną Cu/ZnSOD	matriks mitochondrialna wewnętrzna błona mitochondrialna przestrzeń wewnętrznej błony mitochondrialnej, cytoplazma
Peroksydaza glutationowa Witamina C, glutation, kwas moczowy i inne	cytoplazma

woju zmian starczych i chorobowych [30, 62].

Oksydacyjne uszkodzenia DNA są jednym z ważniejszych czynników branych obecnie pod uwagę w wyjaśnieniu fizjologicznych zmian związanych ze starzeniem i chorobami degeneracyjnymi wieku starczego. Jedną z lepiej poznanych wolnorodnikowych modyfikacji DNA jest 8-hydrokso-2' deoksyguanozyna (8-OHdG, nazwy zmodyfikowanych składników DNA stosowane są wg oryginalnych prac źródłowych) [33]. 8-OHdG uznana jest jako swoisty biomarker oksydacyjnych uszkodzeń DNA [63], który może być analizowany z zastosowaniem między innymi metod

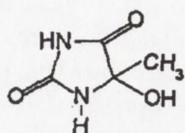
wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) i chromatografii gazowej (GC/MS).

Wyniki wielu badań wskazują na akumulację wraz z wiekiem oksydacyjnych uszkodzeń zarówno w obrębie jądrowego, jak i mtDNA [16, 46].

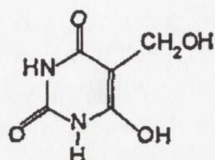
Uszkodzenia DNA przez wolne rodniki i ich mutagenne właściwości

Z powodu olbrzymiej reaktywności WRT (szczególnie $\cdot\text{OH}$) mogą oddziaływać praktycznie z każdą napotkaną makrocząsteczką, a zatem mogą modyfikować kwasy nukleinowe, białka, lipidy i węglowodany. Szczególnie duże zagrożenie dla organizmu niosą z sobą reakcje WRT z DNA. Reagując z DNA wolne rodniki mogą powodować jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA (ss i ds) oraz różnego rodzaju modyfikacje zasad azotowych. Niektóre spośród oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych mają znaczenie mutagenne. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 20 różnego rodzaju oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych, ale biologiczna rola niektórych spośród nich nie jest dostatecznie poznana. Znanym i akceptowanym jest fakt występowania pewnej „puli” oksydacyjnych modyfikacji DNA w prawidłowej komórce (jest to tzw. endogenne poziomy zmodyfikowanych zasad azotowych, w dalszym ciągu nie wiadomo jednak dokładnie, jakiego rzędu są to wielkości).

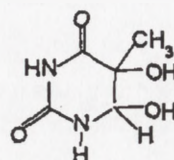
Endogenne poziomy oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych jest wykrywany w każdej komórce. Jest on wyrazem równowagi istniejącej między powstawaniem, w przebiegu wielu procesów metabolicznych, RFT atakujących DNA i usuwaniem uszkodzeń tej biomolekuły przez swoiste enzymy naprawiające DNA. Problemy metodologiczne nie pozwalają na udzielenie precyzyjnej odpowiedzi na pytanie: jak wysoki jest endogenne poziomy potencjalnie mutagenne uszkodzeń DNA? Różne techniki analityczne dają wartości w zakresie od 0,2 – do kilkuset modyfikacji/ 10^6 par zasad [7]. Wydaje się jednak, że poziom ten wykazuje znaczne zróżnicowanie międzyosobnicze [8]. Skąpe jeszcze dane literaturowe pozwalają przypuszczać, że zawartość 8-oksodG może być odwrotnie skorelowana z poziomem niektórych witamin o działaniu antyoksydacyjnym (A, E i C) [15]. Informacja ta wymaga kilku zdań komentarza. Wyniki badań opublikowanych niedawno w *Nature* [55] sugerują, że analiza zawartości jednej tylko zmodyfikowanej zasady (najczęściej jest to 8-oksoG) może doprowadzić do błędnej konkluzji. Z cytowanych powyżej badań wynika bowiem, że suplementacja pacjentom witaminy C doprowadza wprawdzie do statystycznie znamiennego spadku zawartości 8-oksoG, ale i do równoczesnego wzrostu poziomu 8-OHA. Witamina C może mieć działanie zarówno pro-, jak i antyoksydacyjne, co więcej podawana razem z żelazem wpływa na



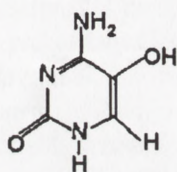
5 - hydroksy - 5 - metylo-
hydantoina



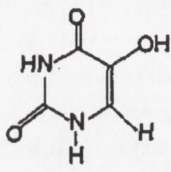
5 - hydroksymetylowuracyl



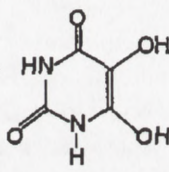
glikol tyminowy



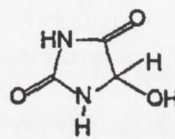
5 - hydroksycytozyna



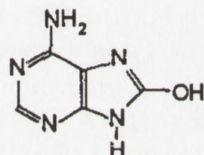
5 - hydroksyuracyl



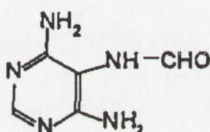
5, 6 - dihydroksyuracyl



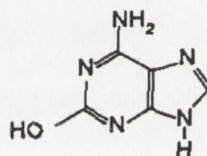
5 - hydroksyhydantoina



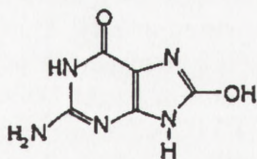
8 - hydroksyadenina



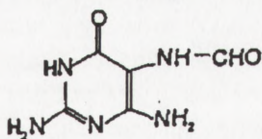
4, 6 - diamino -5- formamidopirymidyna
(Fapy adenina)



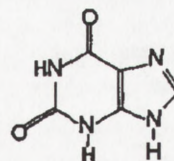
2 - hydroksyadenina



8 - hydroksyguanina



2, 6 - diamino -4- hydroksy -5- formamido-
pirymidyna (Fapy guanina)



ksantyna

RYSUNEK 3. Zmodyfikowane formy zasad azotowych powstające w wyniku oddziaływania z rodnikiem $^{\bullet}\text{OH}$

znaczący wzrost zawartości zmodyfikowanych zasad azotowych. Warto w tym kontekście przypomnieć, że wiele odżywek popularnych w różnych krajach (w tym w Polsce) zawiera duże dawki zarówno witaminy C, jak i związków żelaza. Rezultaty niektórych badań podważają znaczenie suplementacji witamin o znaczeniu antyoksydacyjnym w redukcji oksydacyjnych uszkodzeń DNA [8]. Wykazano ujemną korelację między endogennym (pochodzącym z pożywienia) poziomem witaminy A a zawartością oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad pirymidynowych, przy braku takiej korelacji w przypadku witamin suplementowanych. Pozostaje to w zgodzie z sugestią, że znaczenie fizjologiczne ma obecny w diecie kompleks karotenoidów i fitynianów. Warto dodać, iż badania epidemiologiczne wykazały, że wysokie dawki witaminy A mogą działać prokancerogenicznie [71].

We wcześniejszej pracy Duthie i współaut. [15] nie stwierdzono korelacji między stężeniem witamin o znaczeniu antyoksydacyjnym (A, C i E) a zawartością 8-oksoG.

Najlepiej poznaną modyfikacją DNA o właściwościach mutagennych jest 8-oksoG. W cząsteczce DNA 8-oksoG może występować w dwóch formach: *anty* i *syn*. W formie *syn* 8-oksoG może tworzyć stabilne pary zasad z adeniną (prawdopodobnie także z guaniną) [68]. Jeżeli w procesie replikacji DNA naprzeciw 8-oksoG włączona zostanie adenina, to po dwóch rundach replikacyjnych pojawi się transwersja G→T. Z wolnymi rodnikami reagują nie tylko zasady wchodzące w skład DNA ale również obecne w trójfosfodeoksynukleotydach. 8-oksodGTP jest dobrym substratem dla polimeraz DNA, a możliwość błędnego parowania zmodyfikowanej oksydacyjnie guaniny może prowadzić do jej inkorporacji naprzeciw adeniny i do substytucji A→C po trzech rundach replikacyjnych.

Nieco więcej kontrowersji dotyczy mutagennych właściwości 8-oksoA. Jej obecność w cząsteczce DNA może prowadzić do substytucji A→C i A→G, ale tylko w komórkach eukariotycznych. Polimerazy bakteryjne naprzeciw 8-oksoA wbudowują T.

Inna modyfikacja adeniny, jaką jest 2-OHA, może tworzyć pary zasad z każdą zasadą wchodzącą w skład DNA. W związku z tym spektrum mutacji, które mogą powstać przy udziale tej zasady, jest znacznie szersze niż omawianych powyżej. 2-OHA obecna w DNA i włączana przez polimerazy do cząsteczki DNA może prowadzić do transwersji A→T i A→C oraz tranzycji A→G i C→T. Równie szerokie spektrum mutacji obejmujące transwersje C→T i tranzycje C→G związane jest z obecnością 5-OHC [68].

Wprawdzie 5-OHU i glikol cytozyny są odpowiedzialne wyłącznie za indukowanie tranzycji C→T, ale częstość mutacji, jakie są wynikiem obecności tych modyfikacji, jest niezwykle wysoka i wynosi około 80%. Dla porównania częstość mutacji indukowanych obecnością 8-oksoG wyliczono na około 1% [68].

Glikol tyminy powoduje silny blok replikacyjny. W określonym kontekście zasad 5-C(Tg)C-3' i 5'-C(Tg)A-3' również ta modyfikacja może prowadzić do tranzycji T→C z częstością 0,3–0,4% [68].

Ponieważ wachlarz substytucji opisanych powyżej jest niemal identyczny ze spektrum najczęściej obserwowanych mutacji spontanicznych [68], można przypuszczać, że indukowane wolnymi rodnikami modyfikacje zasad azotowych stanowią główną przyczynę mutacji endogennych.

Kilka lat temu ilość oksydacyjnych uszkodzeń DNA, wynikających z generowania wolnych rodników w procesach endogennych, szacowano na około 100 tysięcy/komórkę u szczura. Ames i Gold wyliczyli, że w pojedynczej komórce szczura znajduje się 10^5 oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Obecnie weryfikuje się tę wielkość w dół o około rząd wielkości [72]. Analizując zawartość 8-oksoG w moczu Loft i współaut. doszli do wniosku, że w pojedynczej komórce człowieka może powstać kilkaset takich modyfikacji w przeciągu doby [42]. Pamiętajmy o tym, że taka modyfikacja guaniny jest jedną z bardzo wielu możliwych zmian mutagennych indukowanych wolnymi rodnikami tlenowymi. Zdecydowana większość oksydacyjnych uszkodzeń DNA musi więc być usytuowana w nieaktywnej (nie podlegającej ekspresji) części genomu, w przeciwnym razie przeżycie komórek i organizmu nie byłoby możliwe. Niewielka ilość tych promutagennych uszkodzeń może być umiejscowiona w genach supresorowych i onkogenach, co może zapoczątkować transformację nowotworową i niekontrolowaną proliferację komórki zawierającej takie mutacje.

NIEKTÓRE CHOROBY WIEKU PODESZŁEGO

Wiele danych wskazuje na to, że utlenione makrocząsteczki stanowią jeden z czynników wywołujących wiele schorzeń charakterystycznych dla wieku starczego, takich jak: nowotwory, miażdżyca, dysfunkcje mózgu, zapalenie stawów, cukrzyca, choroby układu sercowo-naczyniowego. Zidentyfikowano i opisano dotychczas wiele chorób czy też stanów patologicznych powiązanych z uszkodzeniami DNA, a szczególnie mtDNA. Często są to przypadłości charakterystyczne dla osobników starzejących się (choroby degeneracyjne wieku starczego). Dotyczy to także wielu chorób dotykających ludzi w młodszym wieku, takich np. jak: miopatie, encefalomiopatie, encefalopatie. Jest to grupa tzw. chorób mitochondrialnych o podłożu dziedzicznym.

Do często występujących chorób wieku podeszłego należą nowotwory. Wkład RFT w proces karcynogenezy jest bogato udokumentowany. Ze względu na duży potencjał mutagenny szczególne znaczenie w procesie transformacji nowotworowej komórki mogą mieć oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe [50a, 50b]. Progresa zmian prowadzących do uzłośliwienia komórki zachodzi w przeciągu długiego czasu, nierzadko rozciągającego się na dziesięciolecia, co sugeruje akumulację wielorakich mutacji.

Reaktywne formy tlenu a nowotwory

RFT mogą mieć wpływ na każdy etap złożonego procesu karcynogenezy [41]. Jak wykazano powyżej, WRT mogą uszkadzać DNA, co w konsekwencji może prowadzić do mutacji. Jeżeli taka mutacja wystąpi w genach supresorowych lub/i w onkogenach, może to doprowadzić do inicjacji lub progresji procesu karcynogenezy. Dane eksperymentalne potwierdzają, że rodniki tlenowe indukują mutację w „gorących miejscach” antyongogenu *p53*. Kodon 248 tego genu (CGG) jest miejscem, które najczęściej ulega mutacjom w przypadku kilku ludzkich nowotworów. Okazało się, że stres oksydacyjny indukowany działaniem $H_2O_2/FeCl_3$ na ludzkie fibroblasty jest odpowiedzialny za transwersje $G \rightarrow C$ w drugiej pozycji i tranzycje $G \rightarrow A$ w pozycji trzeciej. Nie wyjaśniono, jaka modyfikacja G prowadzi do takich zmian. Natomiast spektrum mutacji w kodonach 249 (AGG) i 250 (CCC) zdominowane jest transwersjami $G \rightarrow T$ i $C \rightarrow G$, zmianami typowymi dla obecności 8-oksoG i 5-OHC.

W przypadku onkogenu *ras* jednym z kodonów, najczęściej ulegającym mutacjom, jest kodon 12 (GGC), w którym guanina ulega transwersji do tyminy. Włączenie do wektora plazmidowego części onkogenu, zawierającej w miejscu G1 lub G2 kodonu 12, 8-oksoG prowadziło do transwersji GT.

W zgodzie z powyższymi obserwacjami pozostaje fakt, że transwersje $GC \rightarrow TA$, typowe dla błędnego parowania 8-oksodG, są bardzo często przyczyną mutacji antyongogenu *p53* komórek raka płuc i protoonkogenu *ras* w przypadku raka wątroby człowieka. Należy też podkreślić, że ten sam typ zmian jest typowy dla adduktów DNA z benzopirenem i aflatoksyną B1 [51].

RFT mogą mieć bezpośredni wpływ na przekazywanie sygnałów komórkowych i wzrost komórek [54]. Możliwe, że RFT działając jako aktywatory procesu transkrypcji (czynniki transkrypcyjne mogą być aktywowane pod wpływem szoku tlenowego, np. NFκB) wpływają również na regulację cyklu komórkowego [29].

Wyniki badań epidemiologicznych jednoznacznie wskazują, że dieta bogata w antyoksydanty (powiązana z wyższym poziomem tych czynników w surowicy krwi) wpływa na redukcję ryzyka zachorowania na nowotwory [13]. Ciekawe jest, że w osoczu krwi osób palących nałogowo tytoń jest znacznie obniżony poziom antyoksydantów [14].

Jednym z najlepiej poznanych czynników karcynogennych jest dym papierosowy. Dym papierosowy zawiera ponad 3800 składników, w tym potencjalnie karcynogennych jak benzo[a]piren, jak również nasilających formowanie rodników tlenowych, jak np. hydrochinony. Te organiczne rodniki i toksyczne związki powodują powstawanie uszkodzeń DNA, białek i lipidów [37]. Obecnie wiadomo jest, że palenie tytoniu wzmacnia generowanie RFT w mitochondriach tkanek zwierząt ekspozowanych na działanie dymu tytoniowego [18]. Jak wynika z badań LOFTA i współaut. [42], u kobiet palących tytoń poziom wydalanej w moczu 8-OHdG

jest wyższy w porównaniu kobietami nie palącymi. Tempo powstawania oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest zatem wyższe u osób używających tytoń. Potwierdzają to także badania Lee i współaut. [37], w których wykazano, że delecje mtDNA (4977-pz), jak i oksydacyjne uszkodzenia DNA oraz peroksydacja lipidów są powiązane ze starzeniem i nasilone są w tkankach płuc osób palących. Dym tytoniowy zawiera dużą ilość oksydantów i indukuje uszkodzenia DNA także *in vitro* [36].

Na niebagatelną rolę, jaką mogą pełnić oksydacyjnie zmodyfikowane zasady azotowe w procesie karcynogenezy, wskazują wyniki badań, w których wykazano znacznie podwyższony poziom 8-oksodG w tkankach nowotworowych w porównaniu z odpowiadającymi im tkankami prawidłowymi. W tkance płucnej uzyskanej od palaczy stwierdzono najwyższe wartości 8-oksodG [53]. Wykazano także dodatnią korelację między poziomem 8-oksodG u palaczy a jej poziomem u osób niepalących oraz zależność ilości 8-oksodG od liczby wypalanych papierosów w ciągu jednego dnia [3]. Również w nowotworach żołądka, jajników i mózgu wykazano istotne zmiany zawartości 8-oksodG w porównaniu z odpowiadającymi im obrzeżami wolnymi od zmian nowotworowych [53].

Miażdżyca

Nieco uboższa jest dokumentacja dotycząca udziału RFT w patogenezie miażdżycy, chociaż i w tym wypadku istnieją dane literaturowe wskazujące na szok tlenowy jako jeden z czynników sprawczych tej patologii. Jedną z wczesnych zmian przedmiażdżycowych w ścianach naczyń jest akumulacja lipidów (m.in. w postaci zmodyfikowanej przez RFT frakcji LDL) przez makrofagi, w wyniku czego powstają komórki piankowate [35, 58].

W tym kontekście niezwykle intrygujące są hipotezy wskazujące na podobne molekularne podstawy rozwoju nowotworów i miażdżycy. Tym wspólnym mianownikiem mogą być mutacje. Od dawna wiadomo, że zmiany prowadzące do transformacji nowotworowej mają charakter mutacji. Kilkanaście lat temu wysunięto hipotezę zakładającą, że również miażdżyca może rozwijać się na tle zmian indukowanych uszkodzeniami DNA, które utrwalone zostają w postaci mutacji. Zmiany te przypominają rozwój guza łagodnego [11, 58]. Ostatnio pojawiły się, skąpe jeszcze, dane eksperymentalne potwierdzające słuszność tej hipotezy. Jak wynika z danych opublikowanych w 1997 roku, jednym z czynników mutagennych prowadzących do rozwoju płytek miażdżycowych może być 8-oksodG [11]. W DNA izolowanym ze śródbłonna naczyń krwionośnych pobranych od chorych cierpiących na miażdżycę ilość 8-oksodG była niezwykle wysoka. Stwierdzono również dodatnią korelację między zawartością tej zmodyfikowanej zasady a typowymi dla miażdżycy czynnikami ryzyka.

Wyniki badań opisane w innym artykule [8] wskazują, że ryzyko zgonów na choroby serca, odmienne w różnych krajach Europy, koreluje z zawartością 8-oksodG,

w DNA limfocytów (wartość korelacji między ilością 8-oksoG i tzw. współczynnikiem CHD (*coronary heart disease*) wynosi 0,9). Wyniki te sugerują, że zawartość oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad azotowych może być dobrym biomarkerem nie tylko chorób nowotworowych, ale i miażdżycy oraz chorób serca.

Cukrzyca

U chorych na cukrzycę stwierdza się podwyższoną ilość anionorodnika ponadtlenkowego oraz podwyższoną zawartość dialdehydu malonowego (markera peroksydacji lipidów) w surowicy krwi [4]. Uważa się, że stres oksydacyjny związany z cukrzycą jest odpowiedzialny za powikłania miażdżycowe, które są najczęstszą przyczyną śmierci cukrzyków. Okazuje się, że w DNA izolowanym z limfocytów tej grupy pacjentów obserwowano podwyższoną zawartość 8-oksoG oraz innych oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad [8a]. Poziom takich modyfikacji był dodatnio skorelowany z zawartością glukozy we krwi pacjentów.

Wyższy poziom 8-oksodG stwierdzono również w moczu pacjentów chorych na cukrzycę [38].

Choroby neurodegeneracyjne (dysfunkcje mózgu)

W przeprowadzonych badaniach biochemicznych wykazano, że RFT mogą być przyczyną patologii dotyczących mózgu. Z kolei podczas badań epidemiologicznych zwrócono uwagę na ochronne efekty działania spożywanych owoców, warzyw bądź przeciwutleniaczy w zapobieganiu nasilenia szoku tlenowego w takich schorzeniach, jak: choroba Parkinsona, choroba Alzheimera i rodzinny wariant stwardnienia zanikowego bocznego (choroba Lou Gehriga). U pacjentów cierpiących na wymienione jednostki chorobowe obserwuje się podwyższoną zawartość 8-oksodG [66]. Obecność znacznych ilości tej zmodyfikowanej zasady w neuronach osób chorych na choroby neurodegeneracyjne mogą wyjaśniać wyniki eksperymentów opublikowane przez cytowanych powyżej autorów. Autorzy ci zaobserwowali, że L-DOPA i jej metabolity są odpowiedzialne za generowanie znacznej ilości oksydacyjnych uszkodzeń DNA w obecności H_2O_2 i jonów miedzi (lub jonów żelaza). W neuronach stężenie L-DOPA jest wysokie. Intensywny metabolizm tlenowy może być odpowiedzialny za wytwarzanie sporych ilości nadtlenu wodoru, a w wyniku uszkodzenia tkanki mózgowej (co jest charakterystyczne dla chorób neurodegeneracyjnych) może dojść do uwolnienia jonów miedzi czy też jonów żelaza. U osobników cierpiących na chorobę Parkinsona poziom uszkodzeń DNA powstających na skutek działania RFT jest podwyższony w rejonach mózgu obfitujących w neurony dopaminergiczne [61].

W niedawno opublikowanych wynikach badań wskazuje się na rolę wolnorodnikowych uszkodzeń DNA w patogenezie choroby Alzheimera [44, 45]. U pacjentów

z chorobą Alzheimera wzrasta poziom markerów peroksydacji lipidów, jak i oksydacyjnych uszkodzeń DNA. W tym drugim przypadku analizowano poziom 8-OHdG. Mózg osób cierpiących na chorobę Alzheimera podlega działaniu nasilonego stresu oksydacyjnego. Zaburzone zostają również mechanizmy naprawy DNA. Markery stresu oksydacyjnego są identyfikowane w mózgu pacjentów i pochodzą zarówno z jądrowego, jak i mtDNA [44].

W jednych z nowszych badań analizowano poziom 8-OHdG w nienaruszonym DNA i jako „wolny produkt” naprawy DNA zachodzącej w komórkach. Statystycznie istotny wzrost poziomu 8-OHdG (5,3 razy) obserwowano w DNA osób z objawami choroby Alzheimera w porównaniu z osobnikami kontrolnymi tej samej grupy wiekowej. Co ciekawe, poziom 8-OHdG jako wolnego produktu naprawy DNA (zachodzącej z udziałem specyficznych glikozylaz) był znacząco niższy (2,4 razy) u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera. Opisywane wyniki badań wskazują na gromadzenie w DNA mózgu osób z chorobą Alzheimera nienaprawionych uszkodzeń. Dane te sugerują jednocześnie, że w przypadku choroby Alzheimera nasila się w mózgu pacjentów stres oksydacyjny i jednocześnie niewydolne są mechanizmy naprawcze usuwające z DNA uszkodzone zasady [44, 45].

W badaniach immunocytochemicznych przeprowadzonych przez WADE i współaut. [73] wykazano wzrost liczby cząsteczek 8-OHdG w mitochondriach neuronów ze zmianami typowymi dla choroby Alzheimera w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Cytowani autorzy stwierdzili także delecje 5Kb w mitochondrialnym DNA neuronów hipokampu. Delecje charakterystyczne były dla neuronów wykazujących jednocześnie pozytywną reakcję immunocytochemiczną na obecność 8-OHdG. Można zatem przypuszczać, że oksydacyjne modyfikacje mtDNA są wczesnym czynnikiem prowadzącym do neuropatologicznych zmian typowych dla choroby Alzheimera.

USZKODZENIA DNA A STARZENIE

W roku 1967 zasugerowano po raz pierwszy, że uszkodzenia DNA mogą być pierwotną przyczyną starzenia się (patrz artykuł przeglądowy [31]). Indukowane działaniem RFT uszkodzenia DNA obejmują: pęknięcia pojedynczej i pęknięcia obu nici w helisie DNA, powstanie miejsc apurynowych i apirymidynowych (AP) oraz modyfikacje zasad [17]. Pomimo działania komórkowych systemów antyoksydacyjnych, w komórkach utrzymuje się pewien poziom oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA [56, 70], który wzrasta w starzejących się komórkach. Stały poziom 8-OHdG w DNA jest o około 35% wyższy w starych komórkach w porównaniu z młodymi komórkami w hodowli [6]. W starzejących

się w hodowli fibroblastach człowieka powstaje 4-krotnie więcej 8-OHdG każdego dnia w porównaniu z młodymi komórkami.

Hayflick już kilkadziesiąt lat temu wykazał, że hodowane *in vitro* fibroblasty człowieka mają pewien ściśle określony i ograniczony potencjał podziałowy. Następnie w wielu pracach wykazano, że dotyczy to także innych typów komórek [23]. Po okresie szybkiego wzrostu *in vitro* tempo proliferacji komórek gwałtownie spada. Komórki ostatecznie wchodzi w fazę całkowitego zahamowania podziałów. Zjawisko to określa się jako starzenie na poziomie komórkowym lub jako starzenie *in vitro*. Jednakże w organizmach starych wiele komórek jest w dalszym ciągu zdolnych do podziałów. Charakterystyczna jest odwrotna korelacja między liczbą podziałów komórek a wiekiem organizmu dawcy [24]. Wykazano również, że liczba podziałów fibroblastów hodowanych jest wyższa w przypadku gatunków długo- niż krótko żyjących. Na przykład u człowieka wynosi od 40 do 65 podziałów przy maksymalnej długości życia ok. 120 lat, a u myszy 14–28 podziałów przy maksymalnej długości życia 3,5 lat [34]. W tym aspekcie interesujące są wyniki badań poziomu 8-OHdG w DNA diploidalnych fibroblastów (TIG-1) człowieka w różnych stadiach starzenia *in vitro* [27]. Mianowicie stwierdzono znaczący wzrost zawartości 8-OHdG w DNA starzejących się komórek. Poziom ten oznaczono na $0,5 \times 10^{-6}$ i $1,6 \times 10^{-6}$ 8-OHdG /dG odpowiednio w młodych (22 podziały) i starszych (50 cykli podziałowych) komórkach. W tych samych badaniach stwierdzono, że znacząco obniżyła się aktywność mechanizmów naprawczych podczas starzenia komórkowego. Zjawisko to może tłumaczyć wzrost poziomu 8-OHdG, wraz z wiekiem komórek. Podobnie do opisanych powyżej badań, Fraga i współaut. [16] wykazali wzrost poziomu 8-OHdG w różnych narządach szczura podczas starzenia się. Dane te wskazują na istnienie podobnych mechanizmów starzenia *in vitro* i na poziomie organizminalnym.

W tkankach organizmu człowieka i wielu zwierząt doświadczalnych zaobserwowano nasilenie wraz z wiekiem oksydacyjnych uszkodzeń jądrowego i mitochondrialnego DNA np. w mózgu człowieka [46] i wątrobie szczura [56]. Poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA był w tych przypadkach 10-krotnie wyższy w mitochondriach w porównaniu z DNA jądrowym. Co ciekawe, wyższy z wiekiem poziom uszkodzeń DNA odnotowano u szczurów, których dieta pozbawiona była witaminy E (witamina E wykazuje działanie antyoksydacyjne) w porównaniu ze zwierzętami, których dieta zawierała tę witaminę.

Wzrost poziomu markera wolnorodnikowych uszkodzeń DNA, jakim jest 8-OHdG, związany jest z upośledzeniem funkcji organów (np. mózgu czy wątroby) i wzrostem podatności komórek na zmiany mutagenne [32]. Interesujące są wyniki badań dotyczących poziomu 8-OHdG w moczu gryzoni i człowieka. Wykazano w nich, że ze wzrastającym wiekiem organizmu obniża się poziom wydalanego w moczu 8-OHdG [16]. Jednocześnie poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA u osobników starych jest wysoki. Dane te wskazują, że wraz z wiekiem obniża się

znacząco aktywność enzymów odpowiedzialnych za naprawę 8-OHdG. Obecnie powszechnie przyjmuje się, że usuwana z komórkowego DNA 8-OHdG jest wydalana z moczem. Warto w tym miejscu przypomnieć, że w starzejących się organizmachznacząco wzrasta poziom grup karbonylowych białek, np. w mózgu człowieka i zwierząt [47]. Są to produkty oksydacyjnych uszkodzeń białek komórkowych. Jedną z przyczyn zmian starczych w komórkach może być zatem upośledzenie działania mechanizmów chroniących komórki przed toksycznym działaniem RFT.

W badaniach przeprowadzonych na *Drosophila melanogaster* [64] i muchach domowych [2] wykazano, że tempo starzenia się organizmu zależy od tempa metabolizmu (potencjału metabolicznego). Tempo starzenia można modulować przez wpływ na tempo metabolizmu. Działanie na młode muchy promieniowania X (promieniowanie powoduje rozpad cząsteczek wody – radiolizę, w czego efekcie powstają rodniki hydroksylowe) i ekspozycja na wysokie stężenie tlenu podwyższa znacznie poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA w mitochondriach i jądrach komórkowych zbliżając ten poziom do wartości podobnej jak w przypadku starzejących się osobników muchy domowej. Indykatorem oksydacyjnych uszkodzeń DNA był w tym przypadku poziom 8-OHdG. W mtDNA stwierdzono 3-krotnie więcej oksydacyjnych uszkodzeń niż w DNA jądrowym starzejących się osobników. Interesujące jest, że ograniczenie aktywności fizycznej much (zatem tempa ich metabolizmu) wiązało się z wydłużeniem długości życia i obniżeniem poziomu 8-OHdG w mitochondrialnym i jądrowym DNA. Poziom 8-OHdG w komórkach muchy domowej wykazywał odwrotną korelację z długością życia badanych organizmów. Ponadto związany z wiekiem wzrost poziomu 8-OHdG skorelowany był ze wzrostem poziomu białkowych grup karbonylowych. Dane te zdają się popierać hipotezę, że oksydacyjne uszkodzenia makrocząsteczek stanowią znaczący czynnik w procesach starzenia się. Dane te niekoniecznie muszą dotyczyć także organizmów wyższych, w tym człowieka. Interesujące są doniesienia np. wskazujące, że przy długotrwałym wysiłku fizycznym człowieka obniża się ilość powstających 8-OHdG, co jednocześnie wskazywać może na kompensacyjne uruchomienie mechanizmów ochronnych w tym przypadku.

Sohal i współaut. [64] przeprowadzili badania transgenicznych muszek *Drosophila melanogaster* zawierających dodatkowy gen dysmutazy ponadtlenkowej (Cu,ZnSOD) i katalazy. Nadekspresja Cu,ZnSOD oraz katalazy hamuje akumulację 8-OHdG u starzejących się muszek, a także u osobników eksponowanych na działanie promieniowania X. Jednocześnie u transgenicznych osobników zaobserwowano ograniczenie oksydacyjnych uszkodzeń białek. Wiekowo-zależne obniżenie aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (jednego z enzymów w ochronie antyoksydacyjnej) i wzrost tempa generowania w mitochondriach H_2O_2 był niższy u zwierząt transgenicznych w porównaniu z kontrolnymi muszkami. Konsumpcja tlenu była jednocześnie wyższa u zwierząt transgenicznych. Potencjał metaboliczny czy też całkowity poziom konsumpcji tlenu, podczas przeciętnej długości życia był około

30% wyższy u zwierząt eksperymentalnych w porównaniu kontrolnymi. Wyniki te wskazują, że nadekspresja enzymów ochrony antyoksydacyjnej ogranicza akumulację oksydacyjnych uszkodzeń makrocząsteczek i wrażliwość komórek na stres oksydacyjny, przedłużając jednocześnie okres życia badanych muszek. Potwierdzają też koncepcję, że stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem w procesie starzenia się.

W badaniach przeprowadzonych na szczurach Sai i współaut. [60] wykazali, że 8-OHdG gromadzi się w różnych narządach podczas starzenia i poziom tej modyfikacji DNA różni się w zależności od płci.

Poziom oksydacyjnych modyfikacji w DNA organizmów różnych gatunków zależy od tempa metabolizmu (ml O₂ konsumowanego na gram masy ciała w ciągu godziny) i ma wpływ na długość życia [1]. Zmodyfikowane zasady są wycinane z DNA przez enzymy naprawcze i wydalane z organizmu wraz z moczem. W moczu myszy wykazano wydalanie 6,04 nmoli glikolu tyminy/kg/dzień i 2,58 nmoli glikolu tymidyny/kg/dzień. W moczu małpy (*Macaca fascicularis*) stwierdzono wydalanie dziennie 1,12 nmola glikolu tyminy/kg masy ciała i 0,95 nmola glikolu tymidyny/kg. Jeżeli weźmie się pod uwagę masę ciała, z organizmu myszy wydalana jest 18-krotnie większa ilość glikolu tyminy i glikolu tymidyny w porównaniu z organizmem człowieka. Z organizmu małpy wydalana jest 4-krotnie większa ilość glikolu tyminy i glikolu tymidyny w porównaniu z organizmem człowieka. Dane te potwierdzają, że tempo metabolizmu i charakterystyczna dla gatunku długość życia koreluje z poziomem oksydacyjnych uszkodzeń DNA.

W tym aspekcie interesujące są wyniki badań Lofta i współaut. [42], którzy wykazali związek między tempem metabolizmu a tym samym generowania rodników tlenowych w organizmie człowieka, a stopniem oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Stwierdzono występowanie zależności między ilością wydalanej w moczu 8-OHdG i konsumpcją tlenu u kobiet w okresie premenopauzy. Wzrost konsumpcji tlenu (w litrach/24 godz.) związany był z podniesieniem poziomu wydalanej w moczu 8-OHdG. U kobiet palących tytoń ilość wydalanej w moczu 8-OHdG wzrosła o 35% przy wzroście konsumpcji tlenu tylko o 10% w porównaniu z kobietami nie palącymi. Wykazano zatem, że tempo oksydacyjnych uszkodzeń DNA wzrasta wraz z nasileniem procesów oddychania komórkowego i w dużym stopniu zależne jest od palenia tytoniu.

Okazuje się, że liczba uszkodzeń DNA znacząco wzrasta po osiągnięciu przez organizm określonego wieku. Opisano dwukrotny wzrost poziomu 8-OHdG w jądrowym DNA (mózgu, serca, wątroby, nerki) u samców szczurów w wieku 30 miesięcy w porównaniu z osobnikami w wieku od 2 do 24 miesięcy. Znaczna akumulacja 8-OHdG jądrowego DNA rozpoczyna się u badanych zwierząt w wieku powyżej 24 miesięcy [32]. W mózgu człowieka opisano wyraźny wzrost poziomu 8-OHdG w mtDNA osobników w przedziale wiekowym 42–97 lat. Wzrost ten był mniej wyraźny w DNA jądrowym. Ciekawe jest, że szczególnie wysoką aku-

mutację 8-OHdG w mtDNA obserwowano u osobników w wieku powyżej 70 roku życia. Stosunek ilościowy mtDNA/jądrowy DNA zawartości 8-OHdG jest równy 10 u osobników poniżej 70 roku życia i wzrasta do wartości 15 u osobników powyżej 70 roku życia [46].

Intensyfikacja w ostatnich latach badań nad mtDNA wynika ze stwierdzenia faktu stopniowej utraty przez mitochondria starych komórek zdolności do wytwarzania energii [40]. Mitochondria są największym źródłem wolnych rodników, a tempo utleniania DNA tych struktur jest znacznie wyższe niż DNA w jądrze komórkowym. Szacuje się, że poziom markera wolnorodnikowych modyfikacji DNA (8-OHdG) jest 10–16-krotnie wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym, co odpowiada poziomowi uszkodzeń 1 na 8000 zasad [20].

Chociaż w wielu przeprowadzonych dotąd badaniach potwierdza się związaną ze wzrastającym wiekiem akumulację 8-OHdG w mtDNA, to niewiele jest danych dotyczących zmian w mechanizmach naprawiających tę modyfikację DNA starzejących się komórek. Badania zespołu Bohra [65] dotyczyły mitochondriów izolowanych z wątroby i serca szczura. Wykazano, że aktywność enzymów naprawczych (glikozylaza naprawiająca 8-OHdG) jest wyższa u 12 i 23 miesięcznych szczurów w porównaniu do zwierząt młodszych (6 miesięcznych) zarówno w ekstraktach wątroby, jak i serca. Aktywność mitochondrialnej glikozylazy uracylu (mtUDG) nie wykazywała zmian z wiekiem w mitochondriach wątroby, wykazując niewielki wzrost aktywności w ekstraktach serca u szczurów między 6 a 23 miesiącem życia.

Cytowane wyniki badań wskazują, że mimo zdolności mitochondriów do naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA są one jednak akumulowane z wiekiem w mtDNA. Pomimo aktywacji procesów naprawczych 8-OHdG akumulowana jest w starzejących się komórkach. Z przeprowadzonych ostatnio badań porównawczych wynika, że endogenne uszkodzenia oksydacyjne zmodyfikowanych zasad DNA (także innych niż 8-OHdG) jest wyższy w mtDNA w porównaniu z DNA jądrowym [70]. Badania dotyczyły komórek wątrobowych świni. Ciekawe jest, że stosunek ilościowy mtDNA/jądrowy DNA dla zasad o znaczeniu promutagenym (8-OHdG, 5-OHCyt) jest niższy niż w przypadku innych zmodyfikowanych zasad (5-OHHyd, 5-OH-MeHyd, 5-OHMeUra). Wartości te mogą jednak ulegać zmianie w starych organizmach.

- MtDNA jest szczególnie podatny na działanie RFT, ponieważ:
- mitochondria konsumują ~90% tlenu przetwarzanego przez organizm, a 1–2% metabolizowanego tlenu (choć wielkość ta jest obecnie kwestionowana) ulega konwersji do form wolnorodnikowych;
- cząsteczki mtDNA znajdują się w pobliżu wewnętrznej błony mitochondrialnej, w której system transportu elektronów generuje RFT;
- DNA mitochondriów nie jest związany z białkami histonowymi;

- geny mitochondrialne są słabiej chronione niż jądrowe przez system naprawy DNA, który jest jednak w nich obecny, a ostatnie badania wskazywać mogą na jego wydajność większą, niż sądzono dotychczas [10].

Liczne badania wykazały obecność mutacji punktowych i delecji w mtDNA oraz ich związek z procesami starzenia i rozwoju wielu chorób [57, 48, 67, 46].

W szczególności dwa typy tkanek narażone są na oksydacyjne uszkodzenia. Są to tkanka mięśniowa i tkanka nerwowa. Oba typy tkanek zawierają postmitotyczne komórki, w których stale akumulowane są oksydacyjne uszkodzenia DNA. Ponadto tkanki mięśniowa i nerwowa zużywają duże ilości tlenu.

Wykazany został wzrost delecji mtDNA w mięśniach szkieletowych człowieka wraz z wiekiem [9, 5]. Wzrost liczby delecji koreluje ze spadkiem aktywności enzymów łańcucha oddechowego w mięśniach szkieletowych człowieka [39].

W mięśniu sercowym i mięśniu przepony człowieka wzrasta z wiekiem poziom 8-OHdG mitochondrialnego DNA [25, 26]. Białka mitochondriów mięśni szkieletowych człowieka są także podatne na uszkodzenia indukowane przez RFT. Zaobserwowano, że tempo syntezy białek mitochondrialnych w mięśniach szkieletowych człowieka znacząco obniża się w starszych organizmach [59]. W jednym z najnowszych badań potwierdzono wiekowo-zależny wzrost poziomu 8-OHdG, dialdehydu malonowego (MDA, markera peroksydacji lipidów) i grup karbonylowych białek (markera oksydacji białek) w bioptatach mięśni człowieka [47]. Cytowani autorzy wykazali także akumulację oksydacyjnych uszkodzeń DNA w jądrze i mitochondriach mózgu człowieka w starszym wieku [46].

W świetle powyższych danych można przypuszczać, że atak utleniający na DNA, jak i białka oraz lipidy jest przyczyną postępującego z wiekiem spadku wydolności mitochondriów. Gdy liczba uszkodzonych w ten sposób mitochondriów przekroczy pewną wartość krytyczną, zrozumiały staje się fakt niedostatku energii w komórkach starzejącego się organizmu. W trakcie życia człowieka pogłębia się niemiażdżycowa dysfunkcja serca i innych tkanek organizmu, co w konsekwencji może prowadzić do zmian starczych i śmierci organizmu.

LITERATURA

- [1] ADELMAN R, SAUL RL, AMES BN. Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**:206–208.
- [2] AGARWAL S, SOHAL RS. DNA oxidative damage and life expectancy in houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12332–12335.
- [3] ASAMI S, MANABE H, MIYAKE J, TSURUDOME Y, HIRANO T, YAMAGUCHI R, ITOCH H, KASAI H. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1763–1766.
- [4] BARTOSZ G. Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa 1995.

- [5] BOFFOLI D, SCACCO SC, VERGARI R, SOLARINO G, SANTACROCE G, PAPA S. Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1226**: 73–82.
- [6] CHEN Q, FISCHER A, REAGAN JD, YAN L-J, AMES BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4337–4341.
- [7] COLLINS A, CADET J, EPE B, GEDIK C. Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19–21 January. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1833–1836.
- [8] COLLINS A, GEDIK CM, OLMEDILLA B, SOUTHON S, BELLIZZI M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J* 1998; **12**: 1397–1400.
- [8a] COLLINS AR, RASLOVA K, SOMOROVSKA M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 373–377.
- [9] COOPER JM, MANN VM, SCHAPIRA AHV. Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of aging. *J Neurol Sci* 1992; **113**: 91–98.
- [10] CROTEAU DL, BOHR VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; **272** (41): 25409–25412.
- [11] DE FLORA S, IZZOTTI A, WALSH D, DEGAN P, PETRILLI GL, LEWTAS J. Molecular epidemiology of atherosclerosis. *FASEB J* 1997; **11**: 1021–1031.
- [12] DIZDAROGLU M. Mechanisms of free radical damage to DNA. W: DNA and free radicals: Techniques, mechanisms & applications (red. Aruoma O., Halliwell B), OICA Int. Saint Lucia, London, 1998; 3–26.
- [13] DOLL R, PETO R. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risk of cancer in the United States today. Oxford University Press, Oxford 1981.
- [14] DORGAN JF, SCHATZKIN A. Antioxidant micronutrients in cancer prevention. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; **5**: 43–68.
- [15] DUTHIE SJ, MA A, ROSS MA, COLLINS AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996; **56**: 1291–1295.
- [16] FRAGA CG, SHIGENAGA MK, PARK J-W. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4533–4537.
- [17] FRIEDBERG EC, WALKER GC, SIEDE W. DNA repair and mutagenesis. *Am Soc Microbiol* (Washington, DC) 1995.
- [18] GVOZDJAKOVA A., KUCHARSKA J., GVOZDZJAK J. Effect of smoking on the oxidative processes of cardiomyocytes. *Cardiology* 1992; **81**: 81–84.
- [19] HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews* 1994; **52** (8): 253–265.
- [20] HALLIWELL B, ARUOMA OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991; **281**: 9–19.
- [21] HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**: 298–300.
- [22] HARMAN D. Free radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci* 1994; **717**: 1–15.
- [23] HAYFLICK L. Antecedents of cell aging research. *Exp Gerontol* 1989; **24**: 355–365.
- [24] HAYFLICK L. Aging under glass. *Mutation Res* 1991; **256**: 69–80.
- [25] HAYAKAWA M, TORII K, SUGIYAMA S. Age-associated accumulation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in mitochondrial DNA of human diaphragm. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 1023–1029.

- [26] HAYAKAWA M, HATTORIK, SUGIYAMA S, OZAWA T. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 979–985.
- [27] HOMMA Y, TSUNODA M, KASAI H. Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **203** (2): 1063–1068.
- [28] JARUGA P, ZASTAWNY TH, SKOKOWSKI J, DIZDAROGLU M, OLIŃSKI R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 1994; **341**: 59–64.
- [29] JURGOWIAK M, BIAŁKOWSKI K, OLIŃSKI R. Reaktywne formy tlenu a regulacja ekspresji genów. *Post Biochem* 1996; **42**(1): 6–13.
- [30] JURGOWIAK M, OLIŃSKI R. Oksydacyjne uszkodzenia mitochondrialnego DNA związane z rozwojem stanów patologicznych i starzeniem się. *Post Biochem* 1997; **43**: 30–40.
- [31] JURGOWIAK M, OLIŃSKI R. Uszkodzenia jądrowego i mitochondrialnego DNA w procesach starzenia. *Kosmos* 1999; **48** (2): 1–10.
- [32] KANEKO T, TAHARA S, MATSUO M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. *Mutation Res* 1996; **316**: 277–285.
- [33] KASAI H, NISHIMURA S. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. W: Sies H (red), *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*, Academic Press, London 1991: 96–116.
- [34] KANUNGO MS. Theories of aging. W: *Biochemistry of ageing*. Acad. Press. Inc. London 1980: 242–275.
- [35] KEHRER JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology* 1993; **23**(1): 21–48.
- [36] LEANDERSON P, TAGESSON C. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact* 1992; **810**: 197–208.
- [37] LEE H, LIM MLR, LU CH, LIU VWS, FAHN H, ZHANG CH, NAGLEY P, WEI Y. Concurrent Increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging – smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys* 1999; **362** (2): 309–316.
- [38] LEINONEN J, LEHTIMAKI T, TOYOKUNI, S. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1997; **417**: 150–152.
- [39] LEZZA AMS, BOFFOLI D, SCACCO S, CANTATORE P, GADALETA MN. Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 772–779.
- [40] LINNANE AW, MARZUKI S, OZAWA T, TANAKA M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative diseases. *Lancet* 1989; **1**: 642–645.
- [41] LOFT S, POULSEN HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; **74**: 297–312.
- [42] LOFT S, ASTRUP A, BUEMANN B, POULSEN HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J*. 1994; **8**: 534–537.
- [43] LOFT S, ASTRUP A, BUEMANN B, POULSEN HE. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 1994; **8**: 534–537.
- [44] LOVELL MA, GABBITA SP, MARKESBERY WR. Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 1999; **72**: 771–776.
- [45] MARKESBERY WR, CARNEY JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathology* 1999; **9**: 133–146.

- [46] MECOCCI P, USHA MacGARVEY MS, KAUFMAN AE, KOONTZ D. Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 1993; **34**: 609–616.
- [47] MECOCCI P, FANO G, FULLE S, SHINOBU L, POLIDORI MC. Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Rad Biol Med* 1999; **26** (3,4): 303–308.
- [48] MIQUEL J. An update on the mitochondrial DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutation Res* 1992; **275**: 209–216.
- [49] OLIŃSKI R. Uszkodzenia DNA indukowane działaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy. *Post Hig Med Dośw* 1993; **47** (6): 463–474.
- [50a] OLIŃSKI R, JARUGA P, ZASTAWNY TH. Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochimica Polonica* 1998; **45**(2): 561–572.
- [50b] OLIŃSKI R, JARUGA P, ZASTAWNY T. Estimation of free radical induced DNA base damages in cancerous- and HIV infected patients and in healthy subjects. W: *Advances in DNA damage and repair* (Dizdaroglu, Karakaya, red.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 1999, 353–369.
- [51] OLIŃSKI R, JURGOWIAK M. Rola reaktywnych form tlenu w procesach mutagenyzy i karcynogenezy. *Post Biochem* 1999; **45**(1): 50–58.
- [52] OLIŃSKI R, JURGOWIAK M. Reaktywne formy tlenu – uniwersalny czynnik patogenny? W: *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie* (Barciszewski J., Łastowski K., Twardowski T., red.) Wyd. Sorus, Poznań 1996, 373–400.
- [53] OLIŃSKI R, ZASTAWNY TH, BUDZBON J, SKOKOWSKI J, ZEGARSKI W, DIZDAROGLU M. DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* 1992; **309**: 193–198.
- [54] PENNISI E. Superoxides relay Ras proteins oncogenic message (news, comment). *Science* 1997; **275**: 1567–1568.
- [55] PODMORE ID, GRIFFITHS HR, HERBERT KE, MISTRY N, MISTRY P, LUNEC J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties [letter]. *Nature* 1998; **392**: 559.
- [56] RICHTER C, PARK J-W, AMES BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6465–6467.
- [57] RICHTER C. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Res* 1992; **275**: 249–255.
- [58] ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; **362**: 801–809.
- [59] ROOYACKERS OE, ADEY DB, ADES PA, NAIR KS. Effect of age on *in vivo* rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 15364–15369.
- [60] SAI K, TAKAGI A, UMEMURA T, HASEGAWA R, KUROKAWA Y. Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1992; **11**: 139–143.
- [61] SANCHEZ-RAMOS JR, OVERIK E, AMES BN. A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinsons disease brain. *Neurodegeneration* 1994; **3**: 197–204.
- [62] SHIGENAGA MK, HAGEN TM, AMES BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10771–10778.
- [63] SHIGENAGA MK, AMES BN. Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine: a biomarker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Free Rad Biol Med*. 1991; **10**: 211–216
- [64] SOHAL RS, AGARWAL A, AGARWAL S, ORR WC. Simultaneous overexpression of copper- and zink-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1995; **270** (26): 15671–15674.

- [65] SOUZA-PINTO NC, CROTEAU DL, HUDSON EK, HANSFORD RG, BOHR VA. Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Research* 1999; **27**(8): 1935–1942.
- [66] SPENCER JP, JENNER A, ARUOMA OI. Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett* 1994; **353**: 246–250.
- [67] WALLACE DW. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992; **256**: 628–632.
- [68] WANG D, KREUTZER DA, ESSIGMANN JM. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Res* 1998; **400**: 99–115.
- [69] ZASTAWNY TH. Oksydacyjne uszkodzenia DNA – wolnorodnikowe modyfikacje zasad i deoksyrybozy. *Post Biochem* 1997; **43**(4): 238–250.
- [70] ZASTAWNY TH, DĄBROWSKA M, JASKÓLSKI T, KLIMARCZYK M, KULIŃSKI L, KOSZELA A, SZCZĘŚNIEWICZ M, ŚLIWIŃSKA M, WITKOWSKI P, OLIŃSKI R. 1998. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Rad Biol Med* **24** (5): 722–725.
- [71] PAOLINI M, CANTELLI-FORTI G, PEROCCHI P, PEDULLI GF, ABDEL-RAHMAN SZ, LEGATOR MS. Co-carcinogenic effect of β -carotene. *Nature* 1999; **398**: 760–761.
- [72] HELBOCK HJ, BECKMAN KB, SHIGENAGA MK, WALTER PB, WOODALL AA, YEO HC, AMES BN. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 288–293.
- [73] WADE R, HIRAI K, PERRY G, SMITH MA. Accumulation of 8-hydroxyguanosine in neuronal cytoplasm indicates mitochondrial damage and radical production are early features of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; **57**: 511.

Adres autora: ul. Kartowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

ROLA MECHANIZMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W PROCESIE STARZENIA SIĘ. BADANIA MODELOWE

THE ROLE OF ANTIOXIDANT MECHANISMS IN AGING. MODEL STUDIES

Tomasz BILIŃSKI

Instytut Biologii i Ochrony Środowiska,
Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Rzeszowie

Streszczenie: Wykład dotyczy roli dysmutaz ponadtlenkowych i katalaz w procesie starzenia się organizmów. Koncentruje się jednak wyłącznie na wynikach eksperymentów przeprowadzonych na organizmach modelowych, w których dokonano zmian poziomu wymienionych enzymów w celu określenia konsekwencji tych zmian dla ich czasu życia. Wyniki badań nad *Drosophila melanogaster* i *Saccharomyces cerevisiae* wykazały, że kluczową rolę w zapobieganiu procesowi starzenia się odgrywają jedynie dysmutazy ponadtlenkowe. Zwiększona ekspresja genu dysmutazy ponadtlenkowej (CuZnSOD) prowadzi do wydłużenia czasu życia *Drosophila*, podczas gdy brak tego enzymu skraca jej życie. Badania na drożdżach wykazały, że pozbawienie komórek obu form dysmutaz ponadtlenkowych (CuZnSOD i MnSOD) prowadzi do znacznego skrócenia czasu życia a efekty mutacji w obu genach mają charakter addytywny. Wyniki tych badań dostarczają zatem argumentów przemawiających za wolnorodnikową teorią starzenia Harmana.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; *Supl. 13: 23–28*)

Słowa kluczowe: dysmutazy ponadtlenkowe, katalazy, starzenie.

Summary: This paper describes consequences of experiments in which cellular levels of superoxide dismutases and catalases were modified in *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae* in order to establish the role of these enzymes in aging process. The results of both studies clearly show that only superoxide dismutases play important roles in preventing aging. Deficiency in cytosolic superoxide dismutase (CuZnSOD) strongly reduces life span of both organisms. In yeast similar effects are observed in mutants deficient in mitochondrial enzyme (MnSOD). Simultaneous deficiency in both cellular enzymes gives in yeast additive effects. The results are consistent with free radical theory of aging.

(*Advances in Cell Biology* 1999; *Supl. 13: 23–28*)

Key words: superoxide dismutase, catalase, aging.

Badania nad mechanizmami starzenia się organizmów są obecnie jednym z obiektów zainteresowania społeczeństwa, szczególnie w krajach zamożnych. Klasyczna gerontologia praktycznie nie dysponuje żadnymi możliwościami badań eksperymentalnych w tej dziedzinie. Ograniczyć się zatem musi do opisu zjawiska i analizy zmian zachodzących w starzejącym się organizmie. Analiza ta obejmuje również badania molekularne pozwalające na identyfikację genów odpowiedzialnych za przedwczesne starzenie się osobników. Możliwe są jednak badania nad generatywnym starzeniem się komórek pobranych z organizmu człowieka określane jako badania *in vitro*. Wyniki dotychczasowych badań nad przyczynami starzenia wyraźnie sugerują udział reakcji wolnorodnikowych w tym procesie [1, 3]. Trudno jednak w tego typu badaniach wykazać w sposób jednoznaczny, co jest przyczyną procesu starzenia, a co mu towarzyszy.

Nowoczesna biologia rozwinęła się dzięki odkryciom dokonany w oparciu o badania nad organizmami modelowymi i zastosowaniu w nich metod genetycznych. Podobnie w badaniach nad przyczynami starzenia się sięgnięto po organizmy modelowe. Wynika to przede wszystkim z konieczności maksymalnego skrócenia czasu eksperymentu. Dla przykładu eksperyment, w którym określa się czas życia komórki drożdżowej trwa maksymalnie pięć dni, gdy podobne badania u prostego wielokomórkowca nicienia *Caenorhabditis elegans*, czy muszki owocowej *Drosophila melanogaster* trwają już tygodnie. Badania nad myszami trwają jeszcze dłużej. Drugim argumentem za posługiwaniem się organizmami modelowymi w badaniach jest możliwość ujednoczenia tła genetycznego badanych organizmów. Wysoki stopień heterozygotyczności naturalnych populacji jest tak wysoki, że wyciąganie jednoznacznych wniosków z badań genetycznych staje się niemożliwe. Pozostaje wtedy jedynie statystyka i badania olbrzymich liczb osobników.

Jednym z najprostszych organizmów eukariotycznych stosowanych w biologii molekularnej są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Trudno sobie wyobrazić tak szybki postęp w badaniach nad cyklem komórkowym eukariontów czy biogenezą mitochondriów bez badań nad mutantami drożdży. Opierając się na założeniu, że drożdże mogą być również użytecznym obiektem badań nad procesem starzenia się Jaźwiński zweryfikował wyniki badań nad zdolnością do podziałów komórek drożdżowych prowadzone przez Mortimera i Johnstona [11] wykazując, że przyczyną ograniczenia liczby podziałów komórek drożdżowych nie jest akumulacja blizn podziałowych nasyconych chityną, lecz gromadzenie się czynnika starzenia [6]. Badania Jaźwińskiego wykazały, że młoda komórka (pączek) nie może dzielić się w sposób nieograniczony, a liczba wytworzonych przez nią pączków wynosi około 40. Ponadto w miarę podziałów rośnie czas potrzebny do wytworzenia kolejnego pączka. Stare komórki mają wyraźnie pomarszczoną powierzchnię. Co ciekawe pączki wytwarzane pod koniec życia komórki również charakteryzują się zwolnionymi podziałami i powrót do normy wymaga rozcięcia czynnika starzenia. Komórki te jednak wykazują się zmniejszoną liczbą podziałów [8]. Od momentu

opisania tych zjawisk drożdże stały się obiektem licznych badań nad starzeniem [14]. Bez wątplenia drożdże nie mogą służyć jako obiekt badań nad starzeniem się organizmów wielokomórkowych jako całości, a nawet ich użyteczność jako modelu badań nad postmitotycznym starzeniem się komórek wielokomórkowców budzi poważne zastrzeżenia metodyczne [10].

Uzyskane wyniki stworzyły jednak podstawę dla badania różnych aspektów procesu starzenia się komórek z zastosowaniem różnorodnych metod nowoczesnej biologii molekularnej. Pod względem metodycznym są one bliskie badaniom nad procesem starzenia się generatywnego komórek ssaków określanymi jako badania *in vitro*. W przypadku drożdży termin ten nie wydaje się właściwy.

Wyniki badań nad genami długowieczności uzyskane w oparciu o wymienione organizmy modelowe pozwalają na dokonanie pewnych podsumowań. Wydaje się, że przeciętny czas życia organizmu jest wypadkową dwu przeciwstawnych czynników. Pierwszy z nich to intensywność procesów metabolicznych, która wiąże się z generowaniem reaktywnych form tlenu. W konsekwencji prowadzi to do uszkodzeń makromolekuł. Przeciwstawnym procesem jest obrona komórek przed stresem zapobiegająca bądź usuwająca powstałe uszkodzenia [7].

Należy zaznaczyć, że oba wymienione procesy są uwarunkowane genetycznie [9], choć końcowy efekt, jakim jest czas życia osobników i całej populacji podlega modyfikacjom pod wpływem zmian w środowisku i jest w znacznym stopniu zależny od diety i nawyków.

Aktualne badania nad procesem starzenia się koncentrują się głównie na badaniu genetycznych mechanizmów regulacji metabolizmu, które determinują intensywność procesów metabolicznych bądź określają poziom oporności danego organizmu na stres. Innym obiektem zainteresowań są identyfikacja zmian prowadzących do obniżenia zdolności podziałowych komórek oraz wyjaśnienie mechanizmów ich powstawania. Dotychczasowe wyniki badań nie pozwalają jednak na jednoznaczne określenie, czy obserwowane i to nieraz spektakularne zmiany obserwowane w starych komórkach są przyczyną, czy też towarzyszą procesowi starzenia się. Przykładem tego może być odkrycie nagromadzenia się kolistych pozachromosomowych cząsteczek rDNA w starych komórkach [15], gdyż nie zawsze odzwierciedla ono czas życia danego szczepu drożdży. Podobnie skracanie się telomerów nie może być uniwersalnym procesem odpowiedzialnym za starzenie się komórek, gdyż nie obserwuje się go np. w komórkach drożdżowych.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy na temat mechanizmów starzenia się można założyć, że uszkodzenia oksydacyjne będące wypadkową generowania oksydantów w procesach metabolicznych i zdolności do obrony komórek przed stresem stanowią jeden z głównych czynników określających czas życia organizmu. Brakuje jednak bezpośrednich dowodów na słuszność tego założenia.

W tym miejscu należy wyraźnie określić, jakie mechanizmy składają się na pojęcie obrony przed stresem. W największym uproszczeniu obrona przed stresem

obejmuje zapobieganie powstawaniu uszkodzeń oraz naprawę już powstałych. Na potencjał obronny komórki składa się zatem synteza wielu białek o różnorodnych funkcjach. W dalszej części artykułu skoncentruję się jedynie na roli przedstawicieli jednej z tych grup, a mianowicie białkach odpowiedzialnych za usuwanie reaktywnych form tlenu, którym można przypisać rolę pierwotnych oksydantów, od których rozpoczyna się kaskada oksydacyjna prowadząca w konsekwencji do akumulacji uszkodzeń ważnych elementów komórkowych. Uważa się, że główną rolę w tej grupie odgrywają białka odpowiedzialne za usuwanie takich reaktywnych form tlenu jak rodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru. Czy przypisywana im funkcja zapobiegania procesom wolnorodnikowym decyduje w sposób istotny o czasie życia komórek? Istnieje wiele pośrednich dowodów sugerujących, pozytywną odpowiedź na to pytanie. Użycie organizmów modelowych pozwala jednak na podjęcie próby bezpośredniego sprawdzenia, czy licząca blisko pięćdziesiąt lat wolnorodnikowa teoria starzenia się Harmana [4, 5], wsparta najnowszymi wynikami badań nad mechanizmami starzenia się opisuje w sposób właściwy główne przyczyny tego procesu.

Pierwszą próbą eksperymentalnego powiązania poziomu dysmutaz ponadtlenkowych i katalaz z czasem życia organizmu przeprowadzono na muszce *Drosophila melanogaster*. Pierwsze wyniki zwiększenia ekspresji [16] genów dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy wskazywały, iż większość transformantów, w których jednocześnie zwiększono poziom dysmutazy i katalazy, wykazuje wydłużony czas życia. Nadekspresja genów katalazy nie miała istotnego wpływu na czas życia [12]. Ostatnie jednak wyniki potwierdziły kluczową rolę dysmutazy ponadtlenkowej jako istotnego czynnika odpowiedzialnego za wydłużenie czasu życia tego organizmu [13].

Doświadczenia te wskazują zatem, że zwiększona zdolności komórek do usuwania rodnika ponadtlenkowego wydłuża czas życia organizmu. Usunięcie tego enzymu prowadzi do jego skrócenia.

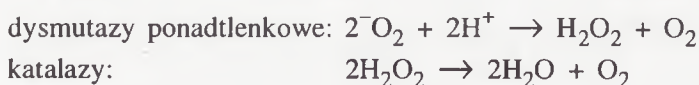
Badania nad rolą enzymów antyoksydacyjnych w procesie starzenia się komórek drożdżowych na podstawie metodyki opracowanej przez M. Jaźwińskiego przeprowadzono przy użyciu mutantów pozbawionych cytosolowej dysmutazy ponadtlenkowej CuZnSOD [2], mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej MnSOD [18], cytosolowej katalazy T i peroksysomalnej katalazy A [17]. Zdolność nadtlenu wodoru do penetracji błon biologicznych powoduje, iż funkcja detoksykacji H_2O_2 w niewielkim stopniu zależy od komórkowej lokalizacji enzymu i dlatego też trudno zaobserwować jakiegokolwiek negatywne efekty uszkodzenia tylko jednej z katalaz. W badaniach, w których badano rolę katalaz, stosowano zatem mutanty pozbawione obu enzymów jednocześnie.

Badania nad generatywnym czasem życia drożdży polegają na określaniu liczby potomnych komórek. Miarą starzenia się komórek jest zatem nie czas, lecz zdolność do dokonania odpowiedniej liczby podziałów komórkowych. Oczywiście znając

czas podziału można łatwo określić chronologiczny czas życia danej komórki czy szczepu drożdży, lecz walor poznawczy tego parametru jest mniej ważny.

Uzyskane przez zespół autora wyniki [19] wyraźnie wskazują, że obie dysmutazy ponadtlenkowe są niezbędne dla zachowania typowego dla danego szczepu czasu życia. Usunięcie każdej z nich zmniejsza zdolności podziałowe komórki przeszło dwukrotnie. Natomiast nie obserwuje się statystycznie znamiennych zmian tego parametru w mutantach pozbawionych obu katalaz. Zupełnym *novum* tych badań jest wykazanie addytywności efektów mutacji prowadzących do braku obu komórkowych form tego enzymu. W efekcie podwójny mutant ma czas życia czterokrotnie krótszy od mutantu pozbawionego jedynie mitochondrialnej dysmutazy ponadtlenkowej. W tym miejscu warto podkreślić użyteczność tego organizmu modelowego, w którym można uzyskiwać odpowiedzi na pytania, które są nie do pomyślenia w przypadku badań nad organizmami wyższymi. Drożdże, które są fakultatywnymi aerobami, mogą wykorzystywać proces fermentacji jako jedyne źródło energii. Dlatego też mutacje dezorganizujące funkcje mitochondrialne, jak np. mutacja w genie kodującym mitochondrialną dysmutazę ponadtlenkową MnSOD, nie prowadzi do śmierci komórki. Możliwe jest również konstruowanie mutantów pozbawionych kilku enzymów jednocześnie.

Wcześniejsze badania nad współdziałaniem dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy w starzeniu się *Drosophila melanogaster* [16] były wynikiem istnienia funkcjonalnych zależności między dysmutazami ponadtlenkowymi i katalazami. Substratem katalaz jest bowiem nadtlenek wodoru będący produktem działania dysmutaz ponadtlenkowych.



W efekcie działania obu enzymów potencjalnie toksyczny anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru są przekształcane w nietoksyczne formy tlenu. Wykazane w tej pracy pozytywne efekty podniesienia poziomu obu enzymów sugerowały sprawdzenie, czy mimo braku negatywnych skutków pozbawienia komórek drożdżowych aktywności katalatycznej dla ich czasu życia usunięcie aktywności katalaz wpłynie na dalsze obniżenie czasu życia mutantów pozbawionych CuZnSOD. Uzyskane wyniki w sposób jednoznaczny wykazały, że rola katalaz w procesie starzenia się komórek drożdżowych nie jest znacząca. Najnowsza praca na temat starzenia się *Drosophila melanogaster* negująca istotną rolę katalazy w tym procesie [13] wydaje się wskazywać, że zjawisko to ma charakter uniwersalny.

PIŚMIENNICTWO

- [1]ASHOK BT, ALI R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999; **34**: 293–303.
- [2]BILIŃSKI T, KRAWIEC Z, LICZMAŃSKI A, LITWIŃSKA J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **130**: 533–539.
- [3]CARLSON JC, RILEY JC. A considation of some notable aging theories. *Exp Gerontol* 1998; **33**: 127–134.
- [4]HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**: 298–300.
- [5]HARMAN D. Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann NY Acad Sci* 1994; **717**: 1–15.
- [6]JAZWINSKI SM. The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetica* 1993; **91**: 35–51.
- [7]JAZWINSKI SM. Longevity, Genes, and Aging. *Science* 1996; **273**: 54–59.
- [8]KENNEDY BK, AUSTRIACO NR, JR., GUARENTE L. Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1985–1993.
- [9]KENNEDY BK, AUSTRIACO NRJ, ZHANG J, GUARENTE L. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 1995; **80**: 485–496.
- [10]LONGO VD, BUTLER GRALLA E, SELVERSTONE VALENTINE J. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species *in vivo*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12275–12280.
- [11]MORTIMER RK, JOHNSTON JR. Life span of individual yeast cells. *Nature* 1959; **183**: 1751–1752.
- [12]ORR WC, ARNOLD LA, SOHAL RS. Relationship between catalase activity, life span and some parameters associated with antioxidant defenses in *Drosophila melanogaster*. *Mech Ageing Dev* 1992; **63**: 287–296.
- [13]PARKES TL, ELIA AJ, DICKINSON D, HILLIKER AJ, PHILLIPS JP, BOULIANNE GL. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nature Genetics* 1998; **19**: 171–174.
- [14]SINCLAIR D, MILLS K, GUARENTE L. Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol* 1998; **52**: 533–560.
- [15]SINCLAIR DA, GUARENTE L. Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell* 1997; **91**: 1033–1042.
- [16]SOHAL RS, AGARWAL A, AGARWAL S, ORR WC. Simultaneous overexpression of copper- and zinc-containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15671–15674.
- [17]TRACZYK A, BILIŃSKI T, LITWIŃSKA J, SKONECZNY M, RYTKA J. Catalase T deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Microbiol Polon* 1985; **34**: 231–241.
- [18]VanLOON APM, PERSOLD-HURT B, SCHATZ GA. A yeast mutant lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 3820–3824.
- [19]WAWRYN J, KRZEPIŁKO A, MYSZKA A, BILIŃSKI T. Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochim Polon* 1999; **46**: 249–253.

Adres autora: 35-310 Rzeszów ul. Rejtana 16

ZMIANY EKSPRESJI RECEPTORÓW NA POWIERZCHNI LIMFOCYTÓW T W PROCESIE STARZENIA SIĘ CZŁOWIEKA

AGE-RELATED CHANGES OF THE SURFACE RECEPTORS OF T LYMPHOCYTES

Jolanta MYŚLIWSKA

Zakład Immunologii, Katedra Histologii i Immunologii
Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Przez całe życie człowieka trwa proces modelowania odpowiedzi immunologicznej, której ostateczną formę poznajemy u ludzi w wieku podeszłym. Zjawiskami nierozłącznie związanymi z tym procesem są limfopoeza oraz różnicowanie i dojrzewanie limfocytów. Badania immunogerontologiczne ostatnich lat wykazały, że wraz z wiekiem dochodzi do ujawniania się zmian w populacjach komórek T zarówno w zakresie ekspresji antygenów powierzchniowych tych komórek, jak również ich funkcji. Limfocyty T stają się heterogenną populacją, obejmującą komórki tworzone w grasicy, jak również pozagrasiczo. Poza tym samoograniczająca się intensywność swoistej odpowiedzi cytotoksycznej mediowanej przez efektorowe limfocyty T cytotoksyczne zostaje zastąpiona przez mniej swoiście rozpoznające komórki T pozagrasicze. W przedstawionym poniżej przeglądzie zaprezentowano zmiany dokonujące się w procesie starzenia w zakresie fenotypu powierzchniowego komórek T w odniesieniu do pełnionych przez te komórki funkcji.

(Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 29–48)

Słowa kluczowe: starzenie, receptory na powierzchni limfocytów T.

Summary: Age-related remodelling of the immune response is associated with changes in the composition of the T cell compartment. T cells of the thymic origin are complemented by those borne in the extrathymic lymphopoietic organs. Thymic T cells undergo appreciable reshaping of their surface receptors – either TCR (receptor responsible for the binding of specific antigens) as well as costimulatory molecules. Extrathymic T cells, which stand at a position of intermediate cells between the highly specific thymus-derived T cells and non-specifically recognizing antigens NK cells, differ in their surface receptors from those of the thymic origin. The present review describes the differences between the above mentioned T cells and relates their receptor status with the function.

(Advances in Cell Biology 1999; Supl. 13: 29–48)

Key words: ageing, T cell receptors.

WPLYW WIEKU NA ZDOLNOŚĆ GRASICY DO GENEROWANIA LIMFOCYTÓW T

Znaczenie grasicy jako źródła limfocytów T dla obwodowych tkanek limfatycznych wydaje się rozciągać aż do późnego okresu życia. Wskazywać na to może fakt, że w badaniach autopsyjnych u osób powyżej 70. roku życia, wykrywano w inwolucyjnej grasicy zachowane skupiska limfocytów w korze i rdzeniu [29]. Rozrost tkanki tłuszczowej w zrazikach grasicy dokonuje się do 50. roku życia, po czym ilość tkanki tłuszczowej, jak również limfatyczne nie ulega zmianie [30]. Ostatnio wprowadzona do badań immunogerontologicznych na materiale ludzkim technika pomiaru episomalnych fragmentów DNA, które zostają wycięte w trakcie rearanżacji genów kodujących regiony zmienne receptora TCR [37], umożliwia śledzenie długości życia (ilości podziałów) limfocytów grasicznych [31]. DNA episomalne nie podwaja się w trakcie replikacji, ulegając po każdym podziale rozcięciu w komórce. Badania wykonane tą techniką wykazały, że nawet u 80-letnich osób dochodzi do rearanżacji genów kodujących regiony zmienne receptorów TCR. A więc trwa proces różnicowania i dojrzewania limfocytów T [12]. Według obliczeń tkanka limfatyczna grasicy powinna być aktywna w dostarczaniu do tkanek obwodowych limfocytów T aż do około 120 roku życia [21]. Najwięcej dowodów jednak na rolę grasicy w procesie starzenia dostarczyły badania na myszach. Wykazały one, że imigracja komórek pro-T ze szpiku zaczyna zmniejszać się przed osiągnięciem dojrzałości płciowej, po czym stopniowe ubywanie liczby migrujących komórek trwa do końca życia. W czasie dojrzewania płciowego dochodzi do zmniejszenia puli komórkowej w grasicy [45]. U 24-miesięcznej myszy tego samego szczepu, a więc odpowiednika 70-letniego człowieka, grasicca wciąż jednak istnieje, zachowując około 1% swojej zdolności do dostarczania na obwód limfocytów T, podtrzymywania ich wzrostu i różnicowania [23]. Badania funkcji przeszczepu grasicy, który umieszczano u bezgrasicznych „nagich” (*nude*) myszy, wykazały, że przeszczepione grasicie od najstarszych 24-miesięcznych myszy, choć ciągle aktywne w dostarczaniu komórek T na obwód [22], różniły się zdolnością w indukowaniu subpopulacji limfocytów. Tak więc, indukowały one łatwiej komórki CD4⁺ niż CD8⁺. Następstwem tego procesu była zmiana stosunku subpopulacji limfocytów CD4⁺ do CD8⁺ we krwi na korzyść komórek pomocniczych CD4⁺. W obecności przeszczepów grasicy od starych myszy różnicowało się mniej komórek T naiwnych [33]. Wśród generowanych limfocytów CD4⁺ dochodziło do przewagi komórek TH2 nad TH1 [24]. Fakt, że zależne od wieku zmiany w zakresie subpopulacji limfocytów T u człowieka są podobne do tych, które opisano u myszy biocrow

przeszczepów starych grasic, w zestawieniu z wynikami cytowanych już badań autopsyjnych, pozwala domniemywać, że u człowieka grasicca odgrywa rolę narządu limfoproliferacyjnego przynajmniej do siódmej dekady życia. Wskazuje na to utrzymywanie się na niezmiennym poziomie bezwzględnej liczby limfocytów T ($CD3^+$) aż do 70. roku życia. Poczawszy od ósmej dekady życia bezwzględna liczba limfocytów T obniża się, osiągając najniższe wartości u osób ponad 100-letnich [16,67]. U ludzi w wieku podeszłym obserwuje się także wzrost bezwzględnej liczby i odsetka komórek $CD4^+$, spadek bezwzględnej liczby komórek i odsetka $CD8^+$. Stosunek $CD4^+/CD8^+$ wzrasta [56,67]. Z wiekiem dochodzi do wzrostu odsetka komórek pamięci w puli $CD4^+$ ($CD4^+CD45RO^+$) oraz $CD8^+$ ($CD8^+CD45RO^+$). Obniża się natomiast odsetek komórek naiwnych T $CD4^+$ ($CD4^+CD45RA^+$) oraz $CD8^+$ ($CD8^+CD45RA^+$) [10,46,67].

LIMFOCYTY T NAIWNE I PAMIĘCI W PROCESIE STARZENIA

Jak dotąd w literaturze, rozróżnienie form „naiwnych” i „pamięci” limfocytów T opiera się na założeniu, że oba typy komórek różnią się ekspresją izoform antygeny powierzchniowego CD45. Izofорма CD45RA o wysokiej masie cząsteczkowej, charakteryzuje komórki naiwne, zaś w komórkach pamięci, które przeszły etap stymulacji antygenowej, w wyniku alternatywnego cięcia transkryptyu ujawnia się cząstka o niskiej masie – CD45RA.

Badania ostatnich lat udowodniły, że obecność izoform CD45RA/RO nie jest wystarczającym kryterium, szczególnie w odniesieniu do limfocytów $CD8^+$, do klasyfikacji komórek naiwnych i pamięci. O ile bowiem obecność izoformy CD45RO charakteryzuje limfocyty pamięci (komórki $CD8^+CD45RO^+CD28^+$) o zachowanej zdolności proliferacyjnej, o tyle izofорма CD45RA występuje nie tylko na powierzchni naiwnych limfocytów T, ale także ulega re-ekspresji na wspomnianych już komórkach pamięci, po utracie przez nie zdolności proliferacyjnej i nabyciu aktywności efektorowej (komórki $CD8^+CD45RA^+CD28^-$) [20]. Proliferujące komórki pamięci $CD8^+$ charakteryzują się ponadto obecnością antygeny CD27 i ich fenotyp powierzchniowy można ująć jako: $CD8^+CD45RO^+CD28^+CD27^+$. Wywodzące się z komórek pamięci efektorowe cytotoksyczne limfocyty T $CD8^+$ charakteryzują się fenotypem $CD8^+CD45RA^+CD28^-CD27^-$. Szczególnie ważnym, z punktu widzenia rozważań gerontologicznych, stadium rozwoju limfocytów $CD8^+$ jest przejście formy $CD8^+CD45RO^+CD28^+$ w formę $CD8^+CD45RO^+CD28^-$ charakterystyczną dla efektorowych cytotoksycznych limfocytów T. Wzrost odsetka subpopulacji komórek $CD8^+CD28^-$, jedna z najlepiej udokumentowanych zmian towarzyszących procesowi starzenia, był podstawą do przyjęcia przez niektórych

autorów poglądu, że zanikanie ekspresji cząstki CD28 na powierzchni limfocytów T jest najbardziej wiarygodnym markerem „pamięci immunologicznej” [10,16]. Tymczasem, jak wynika z przedstawionych powyżej danych, komórki pamięci CD8⁺ są CD28-pozytywne, a dopiero nabycie przez nie efektorowej funkcji cytotoksycznej prowadzi do utraty ekspresji cząstki CD28.

KOMÓRKI CD8⁺ EFEKTOROWE I PAMIĘCI W PROCESIE STARZENIA

Wydaje się, że najbardziej wiarygodnym markerem starzenia się limfocytów T jest zanikanie ekspresji receptora kostymulującego limfocyty T – cząstki CD28. W badaniach poświęconych receptorowi CD28 obserwowano spadek ekspresji tego receptora oraz obniżenie się liczby komórek wyrażających tę ekspresję [6,13]. Zmiany te dotyczą głównie subpopulacji limfocytów CD8⁺. Cząstka CD28 jest receptorem, zaangażowanym w proces adhezji, do ligandu – CD80/CD86 – na powierzchni komórek prezentujących antygeny. Połączenie się receptora CD28 ze swoim ligandem wzmacnia sygnał stymulujący limfocyty T, w procesie prezentacji antygeny, przez receptor TCR. Osiągnięcie optymalnej stymulacji komórek T, przy braku receptora CD28, wymaga około 100-krotnie wyższego stężenia antygeny w porównaniu z odpowiedzią proliferacyjną mediowaną przez receptory TCR wspólnie z receptorem CD28 [26]. W badaniach nad receptorem CD28, brak lub obniżanie się jego ekspresji wiązano z obniżeniem się zdolności proliferacyjnej limfocytów T oraz spadkiem zdolności do produkcji Interleukiny 2 [50]. Stąd, wnioski wypływające z tych badań sytuowały zmianę ekspresji CD28 na limfocytach T w kategorii zaburzeń odpowiedzi immunologicznej.

Wobec zmieniających się poglądów na rozwój limfocytów T CD8⁺ konieczna wydaje się re-interpretacja tych poglądów. Proces starzenia wiąże się ze wzrostem odsetków komórek CD8⁺ CD45RO⁺CD28⁻ oraz CD8⁺ CD45RA⁺CD28⁻ [15,43]. Populacja CD8⁺ CD45RO⁺ obejmuje komórki pamięci oraz prekursorów komórek cytotoksycznych, zaś populacja CD8⁺CD45RA⁺ może reprezentować zarówno komórki naiwne, jak i wyspecjalizowane cytotoksyczne komórki efektorowe [20]. Narastanie więc w procesie starzenia odsetka komórek pamięci i ich prekursorów implikuje raczej zwiększenie potencjału swoistej odpowiedzi cytotoksycznej, aniżeli miałyby świadczyć o sugerowanym, do niedawna, defekcie immunologicznym. Zjawiskiem, które potwierdza słuszność poglądu o wzroście gotowości limfocytów T do odpowiedzi cytotoksycznej z wiekiem, jest klonalność komórek CD8⁺. Klonalny charakter odpowiedzi immunologicznej limfocytów T CD8⁺ zostanie omówiony w dalszych rozdziałach.

TABELA 1. Związek pomiędzy funkcją a ekspresją receptorów CD28 na powierzchni limfocytów T CD8⁺ w procesie starzenia

Charakterystyka populacji limfocytów	
Populacja CD8 ⁺ CD28 ⁺	Populacja CD8 ⁺ CD28 ⁻
Spadek odsetka komórek CD8 ⁺ CD28 ⁺ z wiekiem	Wzrost odsetka komórek CD8 ⁺ CD28 ⁻ z wiekiem
Poliklonalny charakter receptora TCR	Oligoklonalny i monoklonalny charakter receptora TCR
Brak ziarnistości azurofilnych i granul perforynowych – brak gotowości do podjęcia funkcji cytotolitycznej	Zawierają ziarnistości azurofilne i granule perforynowe – co wskazuje na ich gotowość do funkcji cytotolitycznej
Brak ekspresji cząstek adhezyjnych	Ekspresja cząstek adhezyjnych – np. CD54, CD58, CD11a oraz CD11b
Intensywnie proliferują <i>in vitro</i> pod wpływem antygeny	Wykazują anergię i nie proliferują pod wpływem antygeny – anergię można przezwyciężyć podaniem IL2 oraz IL15 do hodowli <i>in vitro</i>
Stymulacja antygenowa może indukować ekspresję wczesnych markerów aktywacji – CD69, HLA-DR, CD71	Nie wykazują ekspresji wczesnych markerów aktywacji – CD69, HLA-DR, CD71 – oraz późnego markera aktywacji – cząstki CD29

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę komórek CD8⁺CD28⁻ oraz CD8⁺CD28⁺.

Przedstawione w tabeli takie cechy komórek CD8⁺CD28⁻, jak obecność granul perforynowych i ziaren azurofilnych, ekspresja cząstek adhezyjnych, wskazują, że komórki te reprezentują wyspecjalizowane, zdolne do aktywności cytotoksycznej oraz kooperacji międzykomórkowej formy limfocytów T CD8⁺. Komórki te nie podlegają aktywacji mitogenicznej, czego objawem jest niezdolność do indukcji ekspresji wczesnych i późnych markerów aktywacji, pod wpływem stymulacji antygenowej [25,51]. Stymulowane antygenowo komórki CD8⁺CD28⁻ są bardziej wrażliwe na apoptozę aniżeli komórki CD8⁺CD28⁺ [5].

Stopień obniżenia aktywności proliferacyjnej komórek CD8⁺ pozostaje w korelacji z wielkością skrócenia telomerów [44,62]. Komórki CD8⁺CD28⁻ mają krótsze telomery aniżeli formy CD28⁺ u tego samego osobnika [70]. Wielkość skrócenia telomerów w komórkach CD28⁻, do którego w populacjach proliferujących dochodzi w następstwie intensywnych podziałów komórkowych [70], wskazuje, że komórki CD28⁻ są pochodnymi dynamicznie proliferujących prekursorów.

Możliwość współistnienia na komórkach CD8⁺CD28⁻ antygeny CD57 sugeruje, że omawiane komórki są identyczne z rozrastającą się z wiekiem [41] populacją CD8⁺CD28⁻CD57⁺ o domniemywanym pozagracicznym pochodzeniu. Należy oczekiwać dalszych badań, które wyjaśnią słuszność powyższego założenia oraz pozwolą

określić, czy subpopulacja ta reprezentuje komórki pochodzenia grasiczego czy też istotnie są to limfocyty T pozagracicze.

KOMÓRKI CD4⁺ PAMIĘCI W PROCESIE STARZENIA

Glikoproteina CD7 występuje na powierzchni prawie wszystkich limfocytów T osobników młodych. Jest ona związana z kinazą tyrozynową, dla której głównym substratem jest fosfataza tyrozynowa – cząstka CD45, przenosząca sygnał aktywacji limfocytów T [35]. Wraz z wiekiem progresywnie wzrasta odsetek komórek CD7⁻ w populacji limfocytów T [32]. Zmiany te dotyczą głównie subpopulacji komórek CD4⁺. Większość komórek CD4⁺, która utraciła glikoproteinę CD7, należy do populacji o fenotypie CD45RO⁺. Są to więc komórki TH pamięci. Osiągnięcie przez komórki CD4⁺ formy „pamięci” wiąże się ze zmianą ich funkcji. Związek między funkcją i ekspresją receptorów CD7 na limfocytach T w procesie starzenia przedstawiono w tabeli 2.

Zwiększenie się w procesie starzenia puli komórek CD4⁺CD7⁻ [32], produkujących Interleukinę 5 [54] oraz Interleukinę 10 [55] ujawnia fenotyp komórek TH2, podbudowując pogląd o zależnym od wieku wzmożeniu odpowiedzi typu TH2.

TABELA 2. Związek pomiędzy funkcją i zmianą ekspresji receptorów CD7 na powierzchni limfocytów T w procesie starzenia

Charakterystyka populacji limfocytów	
Populacja CD4 ⁺ CD7 ⁺	Populacja CD4 ⁺ CD7 ⁻
Komórki o średniej ekspresji antygeny CD45 – populacja wzbogacona w komórki naiwne (CD4 ⁺ CD45RA ⁺)	Komórki o wysokiej ekspresji antygeny CD45 – populacja wzbogacona w komórki pamięci (CD4 ⁺ CD45RO ⁺)
W jej składzie jest tylko niewielki odsetek komórek CD57 ⁺	Populacja wzbogacona w komórki CD57 ⁺
Populacja reaktywna na Interleukinę 2	Populacja nieznacznie odpowiadająca na stymulację przez Interleukinę 2
Populacja o małym odsetku komórek aktywowanych	Populacja wzbogacona w komórki aktywowane – z markerami wczesnej aktywacji na powierzchni: CD25, CD71, HLA-DR
Komórki te produkują niewielkie ilości Interleukiny 5	Komórki te są producentami Interleukiny 5 oraz Interleukiny 10
Komórki produkują IL2	Niewielka produkcja IL2
Populacja aktywnie proliferująca	Populacja o ograniczonej możliwości odpowiedzi proliferacyjnej

Rozrastająca się z wiekiem subpopulacja limfocytów T $CD4^+ CD7^-$ przypomina swoją charakterystyką komórki T $CD8^+ CD28^-$. Subpopulacja ta wydaje się być preaktywowana *in vivo*, w wyniku przewlekłej stymulacji antygenowej. Jest ona wzbogacona w komórki z ekspresją wczesnych markerów aktywacji [32]. Badania *in vitro* wykazały, że wielokrotna stymulacja izolowanych limfocytów T krwi obwodowej prowadzi do akumulacji form $CD7^-$ wśród limfocytów $CD4^+$, zaś nie wśród $CD8^+$ [55]. Uwiarygodniły więc one pogląd o aktywowanym stanie tych komórek.

Zjawisko akumulacji komórek o fenotypie $CD4^+ CD7^-$ obserwowano w naturalnych układach przewlekłej stymulacji antygenowej, jakim są niektóre choroby, jak np. reumatoidalne zapalenie stawów [36] oraz choroba – przeszczep przeciw gospodarzowi [3]. Obecność antygeny CD57 na omawianych komórkach może sugerować jeszcze inną ich cechę, jak dotąd jednak nie udowodnioną, ich pochodzenie pozagrasicze.

WPLYW STARZENIA NA KLONALNY CHARAKTER PROLIFERACJI KOMÓREK PAMIĘCI

Stymulacja antygenowa przez antygeny wirusowe w ostrej fazie infekcji wirusowej prowadzi do ekspansji pewnej liczby klonów limfocytów T pamięci, reprezentujących jedną lub kilka rodzin jednostki $V\beta$ receptora TCR. Klony takie, a więc mono- lub oligoklonalne względem budowy $V\beta$, tworzą głównie komórki $CD8^+$. Limfocyty T $CD4^+$ proliferują mniej intensywnie niż komórki $CD8^+$ i ich odpowiedź nie wykazuje cech klonalności. Klony takie obserwowano w infekcjach wywołanych wirusem grypy, Epsteina Barra oraz cytomegalii. Klony te u osób młodych wykazywały tendencję do zanikania po ustąpieniu infekcji [39]. W badaniach immunogerontologicznych wykazano, że we krwi obwodowej u 70% zdrowych osób powyżej 65 roku życia można wykryć, wśród limfocytów T $CD8^+$, formy o oligoklonalnej zdolności receptora TCR do wiązania antygeny [52,65]. Klonalna ekspansja komórek $CD8^+$ występuje zarówno w puli $CD45RA^+$ (mogą to być komórki naiwne oraz efektorowe cytotoksyczne), jak i $CD45RO^+$. U jeszcze starszych osób, powyżej 80. roku życia wykrywano nawet klony komórek $CD4^+$ [68]. Analiza antygenów powierzchniowych tych klonów wykazała, że większą ekspansję przejawiały klony $CD8^+ CD28^-$ aniżeli klony puli $CD45RO^+$. Obecność oligoklonalnych receptorów TCR na komórkach $CD8^+ CD28^-$ wskazuje, że są one stymulowane przez ograniczoną liczbę antygenów [4].

Ekspansja klonów limfocytów T $CD8^+ CD28^-$ z mono- lub oligoklonalnymi receptorami TCR może pociągnąć szereg skutków. Klony limfocytów $CD8^+$ u ludzi starszych są wprawdzie komórkami o wzmożonej gotowości, ukierunkowanymi

na odpowiedź cytotoksyczną, jednak odpowiedź immunologiczna jest skierowana tylko na niewielką liczbę antygenów. Ciągłe utrzymywanie się klonów może doprowadzić do zubożenia puli limfocytów $CD8^+$ naiwnych. Zjawisko to, z kolei, może być jedną z przyczyn obniżonej zdolności do odpowiedzi na neoantygenu – a więc antygenu po raz pierwszy stymulujące układ immunologiczny.

Niektórzy autorzy postrzegają proces starzenia się układu immunologicznego jako wyczerpanie się puli komórek $CD28^+$ z powodu przewlekłej stymulacji antygenowej. Inną przyczyną wyczerpania się wspomnianej puli limfocytów T ma być upośledzenie zdolności grasicy do generowania limfocytów. Pawelec i wsp. [51] jako zbliżone do tego stanu zjawisko przedstawiają zmiany zachodzące w niektórych chorobach o podłożu przewlekłej stymulacji antygenowej, jak np. przewlekła białaczka limfatyczna [58], reumatoidalne zapalenie stawów [64], choroba Crohna [57] oraz przedkliniczny okres w przebiegu zakażenia wirusem HIV [72]. W chorobach tych pojawiają się klony komórek T $CD28^-$ o oligoklonalnej budowie receptorów TCR [64]. Pula komórek T $CD28^+$ ulega wyczerpaniu, co prowadzi do pojawiania się objawów niedoborów immunologicznych.

Wydaje się jednak, że sugerowane przez ten zespół podobieństwo między zjawiskami immunologicznymi zachodzącymi w procesie fizjologicznego starzenia a zjawiskami patologicznymi odbiega od stanu faktycznego. Zależny od wieku spadek odsetka komórek $CD28^+$ nie ma związku z chorobami i może występować u ludzi, którzy przeżyli w dobrym stanie zdrowia ponad 100 lat [16]. Ponownie nasuwa się wniosek, że wyczerpanie się puli komórek $CD8^+CD28^+$ w procesie starzenia wynika raczej z intensyfikacji rozwoju form terminalnie zróżnicowanych $CD28^-$ – zdolnych do aktywności cytotoksycznej. Komórki T $CD8^+$ powinny więc zabezpieczyć starzejący się organizm przed infekcjami wirusowymi, zakażeniami bakteryjnymi oraz procesem nowotworowym, mimo że ich bezwzględna liczba oraz odsetek obniżają się w procesie starzenia [40,67]. Jeśli jednak ich potencjał okaże się niewystarczający [40], jego uzupełnieniem może być rozrastająca się z wiekiem pula limfocytów T $CD8^+$ pochodzenia pozagrasiczego. Zostanie ona omówiona w dalszej części artykułu.

ZMIANA WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK PAMIĘCI W PROCESIE STARZENIA

Nasuwa się jednak pytanie, czy komórki pamięci u osób w wieku podeszłym są identyczne pod względem jakości z ich odpowiednikami występującymi u osób młodych. Badania prowadzone głównie na komórkach T $CD4^+$ sugerują, że populacje te różnią się. W tabeli 3 zestawiono cechy komórek pamięci $CD4^+$ pochodzących od młodych i starszych osób.

TABELA 3. Cechy komórek pamięci CD4⁺ pochodzących od młodych i starszych osobników

Charakterystyka komórek pamięci CD4 ⁺	
Komórki CD4 ⁺ młodych	Komórki CD4 ⁺ starych
Wysoka ekspresja CD45RO	Niska ekspresja CD45RO
Wysoka ekspresja CD45RB	Niska ekspresja CD45RB
Wysoka ekspresja CD28 połączona z silnym sygnałem kostymulacyjnym przez tę cząstkę do proliferacji i produkcji Interleukiny 2	Niska ekspresja CD28 lub jej brak połączona z obniżoną odpowiedzią proliferacyjną oraz niską produkcją Interleukiny 2 na stymulację antygenową
Przez kostymulację szlakiem CD28 dochodzi do niewielkiej aktywacji procesu apoptozy	Stymulacja poprzez szlak CD28 prowadzi do wzmożonej śmierci apoptotycznej
Czynniki nieswoiste, np. Con A stymulują intensywną proliferację tych komórek	Czynniki nieswoiste tylko w nieznacznym stopniu indukują proliferację tych komórek
W obu rodzajach komórek, bez względu na wiek ich gospodarzy dochodzi do podobnego skrócenia telomerów w stosunku do ich długości w limfocytach CD4 + CD45RA	

Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 2, komórki pamięci CD4⁺ osób starszych różnią się ekspresją antygenów powierzchniowych CD45. Znaczenie tej odrębności dla funkcji nie jest znane. Komórki CD4⁺ pamięci osób starszych charakteryzują się mniejszą aktywnością proliferacyjną oraz obniżoną zdolnością do produkcji Interleukiny 2 w porównaniu z analogicznymi komórkami osób młodych [51]. Potrzeba jednak dalszych badań porównawczych, obejmujących także komórki CD8⁺ pamięci, aby uchwycić istotę różnicy między strukturą antygenową i funkcją limfocytów T u młodych i starych.

LIMFOCYTY TH1 ORAZ TH2 W PROCESIE STARZENIA

Grupa immunogerontologów zajmujących się wpływem wieku na proces produkcji cytokin przez limfocyty TH wykazała, że podobnie jak w przypadku młodych myszy z grasicami przeszczepionymi od starych osobników, również u ludzi – dochodzi wraz z wiekiem do przeprofilowania odpowiedzi komórek TH. Procesowi starzenia towarzyszy wzrost [8,38] produkcji cytokin charakterystycznych dla komórek TH2 [47], takich jak: Interleukina 4 (IL4), Interleukina 5 (IL5), Interleukina 6 (IL6), Interleukina 10 (IL10), przy spadku ilości cytokin produkowanych przez komórki TH1 – głównie Interleukiny 2 (IL2) [40,53]. Cytokiny typu TH2 stymulują limfocyty B, monocyty/makrofagi, komórki tuczne i eozynofile – hamując jednocześnie aktywność cytotoksyczną komórek NK, monocytów oraz limfocytów T [47,63]. Nadmiar

cytokin typu TH2 może być źródłem różnych patologii, towarzyszących procesowi starzenia, jak np. rozwój chorób rozrostowych limfocytów B, monoklonalnej gamopatii, chorób autoimmunizacyjnych oraz alergicznych [19]. Z kolei niska aktywność komórek TH1 może prowadzić do niedoborów w zakresie odporności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej [40,51]. Badania Pagenelli i współautorów [49] wykazały, że klony komórek CD4 indukowane *in vitro* spośród komórek krwi, od osób ponad 100-letnich produkują cytokiny typu TH0 – a więc zarówno charakterystyczne dla TH1 oraz TH2. Zdaniem autorów umożliwia to większą elastyczność układu immunologicznego w dostosowywaniu się do pokonywania infekcji bakteryjnych lub wirusowych.

ZNACZENIE ZMIAN W PROPORCJACH KOMÓREK NAIWNYCH I PAMIĘCI DLA FUNKCJI UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO W PROCESIE STARZENIA

Zależny od wieku spadek odsetka komórek T naiwnych wiąże się z istotnymi konsekwencjami czynnościowymi. Dowodem na to są wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo*. Tak np. obniżenie proliferacji limfocytów po stymulacji fitohemagglutyniną (PHA) i konkanawaliną A (Con A) *in vitro* [51] jest między innymi wynikiem spadku liczebności komórek T naiwnych, gdyż oba te mitogeny preferencyjnie stymulują komórki T naiwne [7]. Zasadniczą konsekwencją obniżenia liczby komórek T naiwnych *in vivo* jest upośledzenie odpowiedzi pierwotnej na antygeny [2]. Wzrost liczby komórek pamięci pociąga, natomiast, za sobą zwiększoną reaktywność limfocytów po ponownym kontakcie z antygenem. Komórki pamięci szybko się aktywują, przy stężeniu antygenów znacznie niższym aniżeli wymagają tego komórki naiwne [26]. Posiadając zwiększoną ekspresję cząstek adhezyjnych [60], mają zdolność przylegania do śródbłonek naczyń, a więc mogą szybciej docierać do miejsc zapalnych. Jednak, z drugiej strony zwiększona pula komórek pamięci może doprowadzić do nadprodukcji niektórych cytokin. Limfocyty T naiwne są odpowiedzialne za produkcję interleukiny 2, cytokiny stymulującej proliferację i dojrzewanie limfocytów T, a także wzmagającej funkcje limfocytów B oraz komórek odporności nieswoistej. Komórki pamięci, choć początkowo produkują IL2, w miarę stymulacji antygenowych przestawiają się na produkcję interleukiny 4, cytokiny hamującej aktywność układu limfocytów T i stymulującej produkcję przeciwciał [59]. Komórki pamięci charakteryzują się także intensywną produkcją interferonu γ (IFN γ), cytokiny stymulującej komórki T oraz NK [14,60]. Tak więc, przesunięciom w składzie subpopulacji limfocytów T naiwnych i pamięci towarzyszy zmiana spektrum produkowanych cytokin. Szczególne znaczenie dla patologii może mieć nadprodukcja Interferonu γ (IFN γ). Cytokina ta stymuluje makrofagi i komórki NK

[17] wzmagając efekt cytotoksyczny [34], z drugiej jednak strony, indukując ekspresję cząstek MHC [27] może inicjować reakcje autoimmunizacyjne.

Zasadniczy spadek odsetka komórek T pamięci dokonuje się między 20. a 30. rokiem życia, po czym po okresie *plateau*, powyżej 70. roku życia dochodzi ponownie zaznaczenia się powyższych tendencji [10,16]. U w pełni zdrowych najstarszych seniorów dożywających 100 lat obniżenie się puli komórek naiwnych nie jest jednak tak znaczne jak u młodszych seniorów [10,56]. Fakt ten wskazuje, że optymalnie funkcjonujący układ immunologiczny wymaga większej ilości komórek naiwnych do zapewnienia stanu zdrowia.

LIMFOPOEZA POZAGRASICZA

Rozważania na temat zmian towarzyszących procesowi starzenia w puli limfocytów T – nasuwają pogląd o pogłębiającym się wraz z wiekiem niedoborze ilościowym oraz upośledzeniu funkcji tych komórek. Konsekwentnie, można oczekiwać, że proces starzenia niesie bardzo wysokie zagrożenie rozwoju chorób uwarunkowanych omawianymi zmianami. Tymczasem, układ immunologiczny u znacznej większości osób, które przekroczyły 70. rok życia, może wykazywać dużą plastyczność odpowiedzi na stymulację antygenową. Choroby immunologiczne nie należą przecież do głównych zagrożeń związanych z wiekiem. A więc może istnieć alternatywa, w stosunku do grasicy, źródło limfocytów T? Dopiero niedawno zrodziła się świadomość istnienia pozagrasicznej limfopoezy. Najnowsze badania nad właściwościami ludzkich limfocytów T sugerowały istnienie populacji limfocytów T o innych własnościach niż klasyczne komórki T grasiczo-pochodne. Badania na zwierzętach ugruntowały ten pogląd [48,69]. Różnice pomiędzy klasycznymi i pochodzenia pozagrasicznego limfocytami T, uzyskane w wyniku badań na myszach, przedstawiono w tabeli 4.

Jeśli chodzi o człowieka, to trudno uzyskać bezpośrednie dowody na istnienie takiej populacji, choć dane pośrednie już na ten temat się pojawiły. Komórki T pozagrasiczne nie występują po urodzeniu, zaś wzrost ich liczby obserwuje się w okresie inwolucji grasicy. Wykazują one mniejszą specyficzność receptorów TCR aniżeli komórki T grasicze, ale jednak ich sposób rozpoznania antygenów jest bardziej swoisty aniżeli komórek NK. Stąd, przyjmuje się, że są one postaciami pośrednimi pomiędzy komórkami T a limfocytami NK [1]. Komórki te charakteryzuje zdolność do rozpoznawania peptydów autoantygenów (antygenów na komórkach własnych gospodarza) [28]. Stąd, można przyjąć, że mogą one z jednej strony odgrywać znaczną rolę w odporności przeciwnowotworowej oraz przeciwwirusowej.

TABELA 4. Porównanie właściwości komórek T pochodzenia grasiczego oraz pozagraciczego

Komórki pozagracicze CD3+NK1.1+TCR ^{INT} IL2β	Komórki pochodzenia grasiczego CD3+TCR ^{HIGH} IL2Rβ-
Komórki te charakteryzują się średnią ekspresją receptorów TCR oraz konstytutywną obecnością podjednostki β receptora dla IL2	Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją receptorów TCR oraz brakiem ekspresji podjednostki β receptora dla IL2
Powstają w jelitach, wątrobie, węzłach chłonnych, płucach	Powstają w grasicy
Nie wiadomo, w jaki sposób podlegają pozytywnej i negatywnej selekcji	Podlegają selekcji pozytywnej i negatywnej w grasicy
Ograniczony czas życia	Długi okres przeżycia, mogą się akumulować w stanie anergii
Charakteryzują się najczęściej fenotypem: CD3 ⁺ CD4 ⁻ lub CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	Charakteryzują się fenotypem: albo CD3 ⁺ CD4 ⁺ albo CD3 ⁺ CD8 ⁺
Aktywowane <i>in vivo</i>	Nie aktywne <i>in vivo</i>
Nie nabywają w wyniku aktywacji podjednostki α receptora dla IL2 (IL2Rα)	Nabywają w wyniku aktywacji podjednostki α i β receptora dla IL2 (IL2Rαβ)
Ich TCR wykazują ograniczoną swoistość	Ich TCR wykazują swoistość
Przedstawiona charakterystyka pochodzi z badań na myszach, w których komórki T pozagracicze uważane są za formy pośrednie pomiędzy linią T oraz NK – stąd marker NK1.1 w nazwie tych komórek Odpowiedniki u ludzi: CD3+CD56+ ; CD3+CD57+ (CD3+HNK-1+)	

Ich nadaktywność, z drugiej strony, może doprowadzić do indukcji odpowiedzi autoimmunizacyjnej.

Badania na myszach wykazały, że autoreaktywne klony pozagracicznych limfocytów CD4⁺ pojawiają się u schyłku życia tych zwierząt, a więc około 30. miesiąca. Na ich pozagracicze pochodzenie wskazuje fakt, że tymektomia wyzwała ich rozwój [11]. Onkostatyna M [9] wzmagą proliferację pozagracicznych autoreaktywnych klonów limfocytów CD4⁺. Przypuszcza się, że komórki te, podobnie jak grasiczopochodne limfocyty T, mogą po opuszczeniu miejsca ich narodzin ponownie przejść etapy pozytywnej i negatywnej selekcji poza grasicą – w centrach rozrodczych narządów limfatycznych [73]. Ograniczona swoistość receptorów TCR charakteryzująca te komórki wraz z ich autoreaktywnością sugeruje ich rolę w rozpoznawaniu zbliżonej pod względem budowy grupy własnych peptydów. Może tu chodzić o proces pozbywania się nieaktywnych lub uszkodzonych komórek i tkanek. U człowieka ilość tych komórek wzrasta w przebiegu przewlekłej choroby przeszczep przeciw gospodarzowi [28]. Sugeruje się, że wzrastające z wiekiem [61] u człowieka populacje komórek T CD57⁺ (CD3⁺CD57⁺) prawdopodobnie są pochodzenia szpikowego, zaś komórki T CD56⁺ (CD3⁺CD56⁺) wywodzą się z limfopojezy wątrobowej [1]. Komórki T CD57⁺ wykazują żywą dynamikę proliferacji i dojrzewania. One jako pierwsze spośród limfocytów T pojawiają się we krwi chorych po przeszczepach

szpiku, wyprzedzając klasyczne grasiczo-pochodne limfocyty T. [18]. Badania na grupie osób w wieku podeszłym zestawione z grupą stulatków [42] wykazały, że dominującą u obu grup wiekowych, wśród komórek T, jest subpopulacja $CD8^+CD57^+$ uważana za powstałą poza grasicą. Im lepszy stan zdrowia badanych stulatków, tym większy odsetek i bezwzględną liczbę stanowiły komórki $CD8^+CD57^+$. Wydaje się więc, że komórki T pochodzenia pozagrasicznego, których funkcja na razie jest przedmiotem spekulacji, odgrywają ważną rolę dla zachowania zdrowia, w okresie inwolucji grasicy.

LITERATURA

- [1] ABOT, WATANABE H, SATO K, IIAI T, MORODA T, TAKEDA K, SEKI S. Extrathymic T cells stand at an intermediate phylogenetic position between natural killer cells and thymus-derived t cells. *Natural Immunity* 1995; **14**: 173–187.
- [2] ARMITAGE KB, DUFFY EG, MINCEK MA, MILLER CB, van den KUYP F, HOM DL, MUNGER JA, EDMONDS KL, FERGUSON LS, RICH A, ELLNER JJ. Transient normalization of lymphocyte blastogenic and specific antibody responses following boosting of healthy elderly subjects with tetanus toxoid. *J Gerontol* 1993; **48**: M19–M25.
- [3] BARROU B, LEGAC E, BLANC C, BITKER MO, LUVIANI C, CHATELAIN C, DEBRE P, AUTRAN B. Expansion of $CD4^+CD7^+$ T helper cells with a TH0-TH2 function in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 1995; **27**: 1676–1677.
- [4] BATLIWALLA F, MONTEIRO J, SERRANO D, GREGERSEN PK. Oligoklonality of $CD8^+$ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation? *Hum Immunol* 1996; **48**: 68–76.
- [5] BOISE LH, NOEL PY, THOMPSON CB. CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**: 620–625.
- [6] BOUCHER N, DUFEU-DUCHESNE T, VICAUT E, FARGE D, EFFROS RB, SCHACHTER F. CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol* 1998; **33**: 267–282.
- [7] BYRNE JA, BUTLER JL, COOPER MD. Differential activation requirements for virgin and memory T cells. *J Immunol* 1988; **141**: 3249–3257.
- [8] CASTLE S, UYEMURA K, WONG W, MODLIN R, EFFROS R. Evidence of enhanced type 2 immune response and impaired upregulation of a type 1 response in frail elderly nursing home residents. *Mech Ageing Dev* 1997; **94**: 7–16.
- [9] CLEGG CH, RULFES JT, WALLACA PM, HAUGEN HS. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 1996; **384**: 261–263.
- [10] COSSARIZZA A, ORTOLANI C, PAGANELLI R, BARBIERI D, MONTI D, SANSONI P, FAGIOLO U, CASTELLANI G, BERSANI F, LONDEI M, FRANCESCHI C. CD45 isoforms expression on $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev* 1996; **86**: 173–195.
- [11] CRISI GM, CHEN LZ, HUANG C, THORBECKE GJ. 1998. Age-related loss of immunoregulatory function in peripheral blood $CD8^+$ T cells. *Mech Ageing Dev* 1998; **103**: 235–254.
- [12] DOUEK DC, MCFARLAND RD, KEISER PH, GAGE EA, MASSEY JM, HAYNES BF, POLIS MA, HAASE ATFEINBERG MB, SULLICAN JL, JAMIESON BD, ZACK JA, PICKER LJ, KOUP RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; **369**: 690–695.

- [13] ENGWERDA CR, HANDWERGER BS, FOX BS. Age-related decrease in rescue from T cell death following costimulation mediated by CD28. *Cell Immunol* 1996; **170**: 141–148.
- [14] ENGWERDA CR, FOX BS, HANDWERGER BS. Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice. *J Immunol* 1996; **156**: 3621–3630.
- [15] FAGNONI FF, VESCOVINI R, MAZZOLA M, BOLOGNA G, NIGRO E, LAVAGETTO G, FRANCESCHI C, PASSERI M, SANSONI P. Expansion of cytotoxic CD8+CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* 1996; **88**: 501–507
- [16] FRANCESCHI C, MONTINI D, SANSONI P, COSSARIZZA A. The immunology of exceptional individuals : the lesson of centenarians. *Immunol Today* 1995; **16**: 12–16.
- [17] FREY JR., KAMBER M, PECK R. Recombinant interferons or interleukin-2 increase cytotoxicity by human monocytes and NK cells. *Lymphokine Res* 1987; **6**: 215–227
- [18] GOROCHOW G, DEBRE P, LEBLOND V, SADAT-SOWTI B, SIGAUX F, AUTRAN. Oligoclonal expansion of CD8⁺ CD57⁺ cells with restricted T-cell receptor β chain variability after bone marrow transplantation. *Blood* 1994; **83**: 587–595.
- [19] GRAEVE L, BAUMANN M, HEINRICH P.C. Interleukin-6 in autoimmune disease. Role of IL-6 in physiology and pathology of the immune defense. *Clin Investig* 1993; **71**: 664–671.
- [20] HAMANN D, ROOS M TH L, VAN LIER RAW. Face and phases of human CD8⁺ T-cell development. *Immunology Today* 1999; **20**: 177–180.
- [21] HARTWIG M, STEINMANN G. On a casual mechanism of chronic thymic involution in man. *Mech Ageing Dev* 1994; **75**: 151–156.
- [22] HIROKAWA K, SATO K, MAKINODAN T. Influence of age of thymic grafts on the differentiation of T cells in nude mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; **24**: 251–262.
- [23] HIROKAWA K, UTSUYAMA M, KASAI M. Role of the thymus in aging of the immune system. W: Biomedical Avances in Aging. (Goldstein A.L. wyd.) New York. Plenum Press 1990; 375–384.
- [24] HIROKAWA K, UTSUYAMA M, KASAI M, KURASHIMA C. Aging and immunity. *Acta Pathol Jap* 1992; **42**: 537–548.
- [25] HOSHINO T, YAMADA A, HONDA J, IMAI Y, NAKAO M, INOUE M, SAGAWA K, YOKOYAMA M, OIZUMI K, ITOH K. Tissue-specific distribution and age-dependent increase of human CD11b⁺ T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 2237–2246.
- [26] IEZZI G, KARJALAINEN K, LANZAVECCHIA A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cell. *Immunity* 1998; **8**: 89–95.
- [27] IJZERMANS JNM, MARQUET R. Interferon-gamma. A review. *Immunobiol* 1989; **179**: 456–473.
- [28] IZQUIERDO M, BALBOA MA, FERNANDEZ-RANADA JM, FIGUERA A, TORRES A, IRIONDO A, LOPEZ-BOTET M. Relation between the increase of circulating CD3⁺CD57⁺ lymphocytes and T cell dysfunction in recipients of bone marrow transplantations. *Clin Exp Immunol* 1990; **82**: 145–150.
- [29] KAY MMB. Immunological aspects of aging. W : Aging, Immunity, and Arthritic Disease 1980 Vol. 11 (Wyd. Kay MMB, Galpin J, Makinodan T) Raven Press.
- [30] KENDALL MD, JOHNSON HRM, SINGH J. The weight of the human thymus gland at necropsy. *J Anatomy* 1980; **131**: 485–489.
- [31] KONG FK, CHEN CLH, COOPER MD. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* 1998; **8**: 97–104.
- [32] KUKEL S, REINHOLD U, OLTERMENNI I, KREYSLER WH. Progressive increase of CD7 T cells in human blood lymphocytes with ageing. *Clin Exp Immunol* 1994; **98**: 163–168.
- [33] KURASHIMA C, UTSUYAMA M, KASAI M, ISHIJIMA S.A., KONNO A, HIROKAWA K. The role of thymus in the aging of Th cell subpopulations and age-associated alteration of cytokine production by these cells. *Int Immunol* 1995; **7**: 97–104.
- [34] KRISHNARAJ R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. *Mech Ageing Dev* 1997; **96**: 89–101.

- [35] LAZAROVITS AI, OSMAN N, LE FEUVRE CE, LEY SC, CRUMPTON MJ. CD7 is associated with CD3 and CD45 on human T cells. *J Immunol* 1994; **153**: 3956–3966.
- [36] LAZAROVITS AI, WHITE MJ, KARSH J. CD7-negative cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; **35**: 615–624.
- [37] LIVAK F, SCHATZ DG. T-cell receptor alpha locus V (D)J recombination by by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 609–618.
- [38] LLORENTE L, RICHAUD-PATIN Y, ALVARADO C, VIDALLER A, JAKEZ-OCAMPO J. Autoantibody production in healthy elderly people is not promoted by Interleukin 10 although this cytokine is expressed in them by a peculiar CD8+CD3+ large granular cell subpopulation. *Scand J Immunol* 1997; **45**: 401–407.
- [39] MAINI MK, CASORATI C, DELLABONA P, WACK A, BEVERLEY PCL. T-cell clonality in immune responses. *Immunol Today* 1999; **20**: 262–266.
- [40] MBWUIKE IN, ACUNA CL, WALZ KC, ATMAR RI, GREENBERG SB, COUCH RB. Cytokines and impaired CD8⁺ CTL activity among elderly persons and the enhancing effect of IL12. *Mech Ageing Dev* 1997; **94**: 25–39.
- [41] MERINO J, MARTINEZ-GONZALES MA, RUBIO M, INOGES S, SANCHEZ-IBARROLA A, SUBIRA ML. Progressive decrease of CD8^{high} CD28+CD57- cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 1998; **112**: 48–51.
- [42] MIYAJI C, WATANABE H, MINAGAWA M, TOMA H, KAWAMURA T, NOHARA Y, NOZAKI H, SATO Y, ABO T. Numerical and functional characteristics of lymphocyte subsets in centenarians. *J Clin Immunol* 1997; **17**: 420–429.
- [43] MIYUKI A, PHILLIPS JH, LANIER L. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 1993; **150**: 1147–1159.
- [44] MONTEIRO J, BATLIWALLA F, OSTRER H, GREGERSEN PK. Shortened telomers in clonally expanded CD28(-)CD8(+) T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28(+)CD8(+) counterparts. *J Immunol* 1996; **156**: 3587–3590.
- [45] MYŚLIWSKA J. Changes in the mouse thymus observed during puberty. *Endokrinologie* 1979; **73**: 55–60.
- [46] NIJHUIC EP, REMARQUE EJ, HINLOOPEN B, VAN den POU W, KRAAN T, VAN LIER RAW, LIGTHART GJ, NAGELKERKEN L. Age-related increase in the fraction CD27-CD45 T cell differentiation *in vitro*. *Clin Exp Immunol* 1994; **96**: 528–534.
- [47] O'GARRA A. Cytokines induce the development of functionally heterogenous T helper cell subsets. *Immunity* 1988; **8**: 275–283.
- [48] OHTSUKA K, SATO K, WATANABE H, KIMURA M, ASAKURA H, ABO T. Unique order of the lymphocyte subset induction in the liver and intestine of mice during *Listeria monocytogenes* infection. *Cell Immunol* 1995; **161**: 112–124.
- [49] PAGANELLI R, SCALA E, ROSSO RI, COSSARIZZA A, BERTOLLO D, BARBIERI A, FABRIZI A, LUISI EA, FAGIOLO U, FRANCESCHI C. A shift to TH0 cytokine production by CD4+ cells in human longevity: studies on two healthy centenarians. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2030–2034.
- [50] PAWELEC G, ADIBZADEH M, SOLANA R, BECKMAN I. The T cell in the ageing individual. *Mech Ageing Dev* 1997; **93**: 265–271.
- [51] PAWELEC G, EFFROS RB, CARUSO C, REMARQUE E, BARNETT Y, SOLANA R. T cells and aging. *Frontiers in Bioscience* 1999; **4**: 216–269 (<http://www.bioscience.org>).
- [52] POSNETT DN, SINHA R, KABAK S, RUSSO C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans – the T cell equivalent to benign monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 1994; **179**: 609–618.
- [53] REA IM, STEWART M, CAMPBELL P, ALEXANDER HD, CROCKARD AD, MORRIS TCM. Changes in lymphocyte subsets, Interleukin 2, and soluble Interleukin 2 receptor in old and very old age. *Gerontology* 1996; **42**: 69–78.

- [54] REINHOLD U, LIU L, SESTERHENN J, ABKEN H. The CD7⁺ T cell subset represents the majority of IL-5-secreting cells within CD4⁺CD45RA⁻ T cells. *Clin Exp Immunol* 1996; **106**: 555–559.
- [55] REINHOLD U, ABKEN H. CD4(+)CD7(-) T cells : A separate subpopulation of memory T cells. *J Clin Immunol* 1997; **17**: 265–271.
- [56] RINK L, SEYFARTH M. Characteristics of immunologic test values in the elderly. *Z Gerontol Geriatr* 1997; **30**: 220–225.
- [57] ROMAN LI, MANZANO L, DE LA HERA A, ABREU L, ROSSI I, ALVAREZ-MON M. Expanded CD4(+)CD45RO(+) phenotype and defective proliferative response in T lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1008–1019.
- [58] ROSSIE, MATUTESE, MORILLAR, OWUSUANKOMAH K, HEFENRAN AM, CATOV-SKY D. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996; **10**: 494–497.
- [59] SALMON M, KITAS GD, BACON PA. Production of lymphokine mRNA by CD45R⁺ and CD45R⁻ helper T cells from human peripheral blood and by human CD45 T cell clones. *J Immunol* 1989; **143**: 907–912.
- [60] SANDERS ME, MAKGOBA MW, SHARROW SO, STEPHANY D, SPRINGER TA, YOUNG HA, SHAW S. Human memory T lymphocytes express increased level of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules (UCHL1, Cdw29, and Pgp1) and have enhanced IFN γ production. *J Immunol* 1988; **140**: 1401[1407].
- [61] SANSONI P, COSSARIZZA A, BRIANTI V, FAGNONI FI, SNELLI G, MONTI D, MARCATO A, PASSERI G. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 1993; **82**: 2767–2773.
- [62] SATOH H, HIYAMA K, TAKEDA M, AWAYA Y, WATANABE K, IHARA Y, MAEDA H, ISHIOKA S, YAMAKIDO M. Telomere shortening in peripheral blood cells was related with aging but not with white blood cell count. *Jpn J Hum Genet* 1996; **41**: 413–417.
- [63] SCHEID C, YOUNG R, MC DERMOTT R. Immune function of patients receiving recombinant human interleukin 6 (IL6) in a phase I clinical study : induction of C-reactive protein and IgE and inhibition of natural killer and lymphokine -activated killer cell activity. *Cancer Immunol Immunother* 1994; **38**: 119–126.
- [64] SCHMIDT D, GORONZY JJ, WEYAND CM. CD4(+)CD7(-)CD28(-) T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2027–2037.
- [65] SCHWAB R, SZABO P, MALAVALAN JS, WEKSLER ME, POSNETT DN, PANNETIER C, KOURIRLSY P, EVEN J. Expanded CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 1997; **158**: 4493–4499.
- [66] STEINMANN G, HARTWIG M. Immunology of centenarians. *Immunol Today* 1995; **16**: 549.
- [67] UTSUYAMA M, HIROKAWA K, KURASHIMA C, FUKUYAMA M, INAMATSU T, SUZUKI K, HASHIMOTO W, SATO K. Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood. *Mech Ageing Dev* 1992; **63**: 57–68.
- [68] WACK A, COSSARIZZA A, HELTAI S, BARBIERI R, DADDATO S, FRANCESCHI C, DELLABONA P, CASORATI G. Age-related modifications of the human $\alpha\beta$ T cell repertoire due to different clonal expansion in the CD4⁺ and CD8⁺ subsets. *Int Immunol* 1998; **10**: 1281–1288.
- [69] WATANABE H, IIAI T, KIMURAM, OHTSUKA K, TANAKA T, MIYASAKA M, TSUCHIDA M, HANAWA H, ABO T. Characterization of intermediate TCR cells in the liver of mice with respect to their unique IL-2R expression. *Cell Immunol* 1993; **143**: 331–342.
- [70] WENG N, HATHCOCK KS, HODES RJ. Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: A mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* 1998; **9**: 151–157.

- [71] YU SG, ABEL L, GLOBERSON A. Thymocyte progenitors and T cell development in aging. *Mech Aging Dev* 1997; **94**: 103–111.
- [72] ZANUSSI S, SIMONELLI C, DANDREA M, CAFFAU C, CLERICI M, TIRELLI U, DE PAOLIP. CD8(+) lymphocyte phenotype and cytokine production in long-term non-progressor and in progressor patients with HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1996; **105**: 220–224.
- [73] ZHENG B, HAN SH, ZHU Q, GOLDSBY R, KELSOE G. Alternative pathways for the selection of antigen-specific peripheral T cells. *Nature*; **384**: 263–266.

Adres autorki:

80-210 Gdańsk, Dębinki 1

WYBRANE ASPEKTY STARZENIA SIĘ KOMÓREK GONADY MĘSKIEJ

SOME ASPECTS OF AGING IN CELLS OF MALE GONAD

Maciej KURPISZ, Dorota FISZER

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie: W pracy scharakteryzowano podstawowe procesy starzenia w komórkach Leydiga, Sertoliego i gametogenicznych. Wszystkie one uczestniczą w licznych interakcjach odbywających się za pośrednictwem czynników auto-, para- i endokrynowych. Współzależność między czynnikami pro- i anti-apoptotycznymi, cechy konstytucyjne, mutacje *de novo*, czynniki środowiskowe (ksenoestrogeny) powoduje wypadkową, która staje się decydująca dla zakończenia spermatogenezy na różnym etapie życia dorosłego osobnika.

(*Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 47–56*)

Słowa kluczowe: starzenie, komórki Leydiga, komórki Sertoliego, apoptoza.

Summary: We have characterized basic aspects of aging in Leydig cells, Sertoli cells and gametogenic ones. They all are involved in extensive interactions mediated in autocrine, paracrine and endocrine fashion. Interplay of pro- and anti-apoptosis factors together with constitutive background, *de novo* mutations and environmental substances (xenoestrogens) is critical for the endpoint of spermatogenesis on different stage of our life.

(*Advances in Cell Biology 1999; Suppl. 13: 47–56*)

Key words: aging, Leydig cells, Sertoli cells, apoptosis.

1. WSTĘP

Starzenie się w aspekcie wypełniania funkcji reprodukcyjnej przez mężczyznę zachodzi w znacznie bardziej subtelny sposób niż u kobiet. U osobników męskich zachodzi bowiem stopniowe obniżanie funkcji rozrodczych, które mogą być zachowane nawet w 7 dekadzie życia [14]. Z tym ostatnim fenomenem związany

jest mniej biologicznie rygorystyczny (tym większe odchylenia w obserwowanej populacji wśród poszczególnych osobników) sposób przechodzenia w fazę obniżenia funkcjonowania narządów rozrodczych tzw. andropauzę. Brak wydolności funkcji rozrodczych u mężczyzny może być spowodowany i/lub modyfikowany poprzez zajęcia zawodowe, tzw. styl życia, wśród którego należy wyróżnić stosowanie używek (palenie papierosów i picie alkoholu), sposób ubierania się, a nawet podróżowania (codzienny lub okazjonalny, rodzaj transportu) itp. Dla określenia procesów starzenia się, związanego z wypełnianiem funkcji rozrodczych wyosobniono 3 podstawowe terminy obejmujące funkcjonowanie poszczególnych grup narządów [9] związanych z wytwarzaniem różnorodnych mediatorów hormonalnych:

a) andropauza, związana z obniżeniem poziomów hormonów gonadotropowych (zwłaszcza LH przy stałym lub podwyższonym poziomie FSH) w surowicy krwi z równoczesnym niskim wydzielaniem testosteronu przez komórki jądra (Leydiga), co sugeruje zmniejszoną wydolność hormonalną gonady męskiej,

b) adrenopauza, związana jest z obniżonym poziomem krążącego (we krwi) dehydroepiandrosteronu (DHEA) lub jego siarczanu; (Obniżone wydzielanie DHEA(S) przez nadnercza nie idzie bynajmniej w parze z obniżonym poziomem hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), który związany jest z regulacją krążącego we krwi kortyzolu)

c) somatopauza, trzeci filar układu endokrynowego, zapewniający syntezę czynnika vitalności, za jaki uważa się insulinopodobny czynnik wzrostu I (IGF-I), syntetyzowany w wątrobie pod indukującym wpływem hormonu wzrostu (GH), wydzielanego przez przysadkę. W przyczynie powstawania somatopauzy podnosi się niewydolność osi podwzgórzowo-przysadkowej, przy czym tzw. nadrzędny mechanizm czasu biologicznego zlokalizowany jest w podwzgórzu, ponieważ somatotropina przysadkowa może być wydzielana w wystarczającej ilości nawet u bardzo podeszłych wiekiem starców przy podawaniu peptydów stymulujących uwalnianie GH. Ponieważ istnieją poważne różnice gatunkowe w wyrażaniu symptomów andropauzy u poszczególnych ssaków, należy zauważyć problem, że u ludzi większość obserwacji dotyczy stwierdzanego niedoboru (na obwodzie) wolnego testosteronu przy braku zmian (lub podwyższeniu) poziomów gonadotropin, co sugeruje pierwotny defekt gonady (komórek Leydiga). U szczura z kolei (u większości ras, jakkolwiek nie u wszystkich) niedobór krążącego testosteronu, przypisuje się suboptymalnej stymulacji jego sekrecji w gonadzie wskutek obniżenia poziomu LH, co sugeruje pierwotny defekt na poziomie osi podwzgórzowo-przysadkowej [2].

Jak wiadomo, prominentną rolę w regulacji mikrośrodowiska kanalika plemnikotwórczego odgrywiają komórki podporowe Sertoliego, które mogą jednak podtrzymywać procesy rozwojowe tylko dla ograniczonej liczby komórek gametogenicznych. Jakikolwiek zakłócenia w procesach rozwojowych układu rozrodczego mogą prowadzić do obniżenia liczby komórek Sertoliego, co implikuje indywidualną zdolność osobnika do produkcji określonej liczby komórek rozrodczych

przez całe dorosłe życie [6]. U większości ssaków, namnażanie komórek Sertoliego występuje w trakcie życia płodowego i wkrótce po urodzeniu, u człowieka ostatnia fala namnażania ma miejsce około pokwitania i odąd liczebność komórek Sertoliego staje się stałym parametrem gonady. U szczura komórki Sertoliego namnażają się ok. 19–20 dnia ciąży a proces ten zanika około dnia 15 po urodzeniu. Biorąc pod uwagę stosunkowo długi okres czasu dojrzewania gonady u człowieka (około kilkunastu lat), przedział czasu, w którym komórki Sertoliego narażone są na szkodliwy wpływ ze strony środowiska jest znaczny. Ostatnio zatem zyskała na wadze hipoteza wpływu na osobniczy rozwój komórek Sertoliego (a przez to i osiągnięcie indywidualnej liczby wytwarzanych męskich komórek rozrodczych) przez tzw. ksenoestrogeny środowiskowe. Potwierdzeniem pośrednim tej hipotezy staje się wzrastająca liczba osobników z wnetrostwem, spodziectwem oraz nowotworami jądra na wczesnym etapie ontogenezy.

2. PROCESY STARZENIA ZACHODZĄCE W KOMÓRKACH LEYDIGA

Jak wspomniano we wstępie, przyjmuje się, że u człowieka (i prawdopodobnie u brązowego szczura norweskiego) proces starzenia leży w pierwotnym defekcie gonady (śródmiaższa), co objawia się obniżeniem sekrecji i poziomu krążącego (na obwodzie) wolnego testosteronu przy nieznacznym wahaniach poziomu hormonów gonadotropowych [2]. (Bardziej szczegółowe badania udowadniają, że poziom np. hormonu LH jest niezmienny w swojej całkowitej puli, jednak jedynie tylko jego frakcja zachowuje bioaktywność). Jednak pojawia się pytanie dlaczego obniżające się w plazmie poziomy testosteronu nie stymulują na zasadzie odruchu regulacyjnego, zwiększenia się poziomu LH czy też GnRH (tzw. gonadoliberyny, czyli czynnika uwalniającego hormony gonadotropowe). Przy braku działania mechanizmów wyrównawczych nasuwa się wniosek, że także w podwzgórzcu, w wyniku procesów starzenia, musi dochodzić do obniżenia progu czułości na 'łuk odruchowy' wywołany przez testosteron. Tak więc oś przysadkowo-podwzgórzowa musi także ulegać zmianom, zachodzącym pod wpływem procesu starzenia. Innym argumentem dla obserwacji istotnego obniżenia poziomu wolnego testosteronu we krwi jest wzrost (zależny od wieku) poziomu tzw. globuliny wiążącej hormony płci (SHGB), niemniej ponieważ klirens testosteronu nie wzrasta wraz z wiekiem, fakt obniżenia się wolnej frakcji testosteronu wskazuje jednak na jego deficyt. Mechanizm obniżonej steroidogenezy przez komórki Leydiga być może jest kluczem dla zrozumienia procesu obniżenia funkcji reprodukcyjnych. Warto tu zaznaczyć, że u naczelników istnieje niejeden mechanizm steroidogenezy, wiodący do produkcji testosteronu. Znane są szlaki metaboliczne tzw. delta⁵ (uzyskanie testosteronu z androstendiolu)

oraz delta⁴ (uzyskanie testosteronu z androstenedionu). Istnieją pewne obserwacje sugerujące, że u starzejących się osobników, zwłaszcza dochodzi do obniżenia wydolności szlak delta⁵, przy czym szlak delta⁴ pozostaje na niezmiennym poziomie. W wyniku stymulacji gonadotropiną kosmówkową (hCG) i cytrynianem klomifenu (pośrednio stymulującym produkcję testosteronu przez podwyższenie poziomu LH) gonady męskiej u starzejących się osobników stwierdzono obniżoną odpowiedź sekrecji testosteronu, co nasuwa podejrzenie stopniowej redukcji liczebności komórek Leydiga wraz z wiekiem. Wydaje się, że obniżenie liczby komórek Leydiga wraz z wiekiem nie jest wynikiem odróżnicowywania się komórek Leydiga, a formą ich degeneracji. Jednocześnie stwierdza się wzrastającą liczbę wielojądrzastych, zwakuolizowanych komórek podporowych z obfitymi kroplami tłuszczowymi. W cytoplazmie (jak i w jądrze komórkowym) komórek Leydiga stwierdza się pojawianie ciałek wtrętowych, odkładanie ziaren lipofuscyny, pomniejszenie gładkiej siateczki retikuloplazmatycznej i zmniejszenie liczby mitochondriów.

Jak sygnalizowano wcześniej [12], tkanka śródmiąższowa gonady męskiej u szczura reaguje inaczej niż u naczelnych. U większości ras (zwłaszcza rasy Sprague Dawley) obserwuje się równoległy spadek poziomu krążącego testosteronu jak i hormonu lutotropowego, co sugeruje wydatniejszy udział dysregulacji osi podwzgórzowo-przysadkowej w procesie starzenia, u tego gatunku. Jednak jeśli pierwotnym defektem była oś przysadkowo-podwzgórzowa (i obniżenie LH), to stymulacja gonady męskiej u tego gatunku przez podawany egzogeny LH (czy też hCG) winno przywrócić prawidłowe poziomy testosteronu. Ten efekt nie został jednak doświadczalnie udowodniony (u szczurów ras Long Evans, Wistar, Sprague-Dawley). W większości badań poświęconych starzejącym się szczurom udowodniono niezmienną liczebność komórek Leydiga w gonadzie, przy tendencji nawet do zwyżkowania liczby (przerost kompensacyjny?), co może sugerować strukturalny defekt komórek Leydiga (wraz z wiekiem), jakkolwiek na przykład produkcja cAMP w odpowiedzi na stymulację hCG lub LH przez komórki Leydiga (u starych osobników) pozostaje niezmienną.

Szczególnie instruktywna wydaje się różnica między poszczególnymi rasami szczurów w zaprzestawaniu funkcji rozrodczych i w transformacji komórek gonady w kierunku rozrostowym [2]. U starzejących się szczurów rasy Fischer, 100% osobników rozwija guza jąder w wieku 24 miesięcy. Niektóre badania udowadniają, że rozwój guza powstaje w wyniku podwyższonego poziomu (w surowicy) hormonów steroidowych (np. progesteronu), który poprzez sprzężenie negatywne wyłącza oś podwzgórzowo-przysadkową, w tym utrudniając produkcję testosteronu. Na przykład szczury rasy Sprague-Dawley (żyjące do 27 miesięcy), w wieku 24 miesięcy u 25% osobników rozwijają guz przysadki (adenoma), przy czym stają się one otyłe, zwiększa się objętość krwi, przez co obniża się stężenie krążącego testosteronu. Szczury tej rasy, w wieku podeszłym, mają również tendencję do guzów gonady, jednak z mniejszą częstością niż rasy Fischer. W odróżnieniu od obu tych ras,

brązowe szczury norweskie raczej nie mają tendencji do guzów litych w obrębie układu rozrodczego, a przyrost wagi ciała u starszych osobników jest umiarkowany.

3. KOMÓRKI SERTOLIEGO; APOPTOZA A PROCES STARZENIA

Rola komórek Seroliego jest kluczowa dla funkcji jądra i spełnia się poprzez interakcję z testosteronem oraz folikulotropinę, która determinuje z kolei liczbę tych komórek. Równowaga biologiczna i utrzymywanie stałej liczby komórek Seroliego jest zapewniana w negatywnym sprzężeniu pomiędzy FSH a estrogenami, produkowanymi przez komórki podporowe [6]. Komórki Seroliego wchodzi w liczne interakcje z szeregiem komórek obecnych na terenie gonady [1]. Oczywiście najważniejszą z tych interakcji jest oddziaływanie komórek Seroliego z komórkami rozrodczymi, ponad to utrzymują one także kontakt ze swoimi własnymi wypustkami, tworząc barierę tkankową, jak również pojawiają się interakcje między komórkami podporowymi a mioidalnymi komórkami peritubularnymi (istnieje pośredni kontakt między tymi komórkami przez błonę podstawną). Istnieją także skomplikowane relacje pomiędzy komórkami Seroliego i Leydiga, zwłaszcza w trakcie determinacji rozwoju gonady męskiej i późniejszego jej dojrzewania. Testosteron i FSH nie oddziałują bezpośrednio na komórki rozrodcze i potrzebują pośrednictwa komórek Seroliego, które jako jedyne posiadają receptory na FSH, zarówno na powierzchni komórki jak i w jądrze komórkowym. Androgenowy receptor w jądrze komórkowym występuje jako zaktywowany ligandem czynnik transkrypcyjny, natomiast na powierzchni komórki receptor dla FSH sprzężony jest z białkiem G. W powyższy sposób może nastąpić uruchomienie transkrypcji wielu genów przez komórki Seroliego. Poprzez komórki Seroliego przepływają zatem skomplikowane sygnały, przekazywane dla różnicujących się komórek gametogenicznych, natomiast komórka Seroliego przez swoje receptory może generować impuls pozytywny dla proliferacji lub różnicowania tych komórek (za pośrednictwem czynnika wzrostu i proto-onkogenów) lub też sygnał śmierci. Ta równowaga jest utrzymywana zarówno wobec komórek gametogenicznych jak i wobec komórek Leydiga. Na przykład czynnik wzrostu SF (*Steel factor*) ulega ekspresji na komórkach Seroliego i poprzez swój receptor c-kit, obecny na spermatogoniach powoduje utrzymywanie puli spermatogonii (proliferacja) oraz ich różnicowanie [11]. Ponadto na komórkach Seroliego obecne są inne ważne czynniki wzrostu, jak IGF-I, naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i wiele innych. Wszystkie one są inhibitorami apoptozy, ponieważ są czynnikami indukującymi wzrost komórkowy poprzez receptory, które znajdują się na komórkach gametogenicznych z poszczególnych faz różnicowania. Jednak przełączenie się komórek Seroliego

na tzw. sygnał śmierci poprzez FasL stanowi również o odwrotnej funkcji tej komórki (receptor Fas znajduje się w spermatocytach). Nasilenie apoptozy może z kolei odbywać się przez zwiększoną temperaturę, ekspozycję na substancje toksyczne (np. ksenoestrogeny), niedobór hormonalny (w tym hormonów płciowych). Zwłaszcza te dwa ostatnie czynniki, towarzyszące procesowi starzenia, mogą wywoływać nasilenie procesów apoptozy.

Istnieje szereg czynników, które można sklasyfikować jako proapoptotyczne lub hamujące proces apoptozy [7], jednak ich rola może się zmieniać w zależności od stadium zróżnicowania nabłonka plemnikotwórczego, ponad to liczba czynników i genów zaangażowanych w proces apoptozy jest nader liczna i stale się poszerza. Do hamujących proces apoptozy należy zestaw czynników należący do rodziny Bcl-2, kodowany przez gen *bcl-2*, który kontroluje także proces różnicowania komórek hematopoetycznych oraz komórek nerwowych. Zidentyfikowano szereg homologów białek rodziny Bcl-2, jedna z nich zwana Bax, wiąże się jako heterodimer z Bcl-2, a stosunek białek Bcl-2 do Bax jest decydująca dla skierowania komórek na tor życia lub śmierci. I tak podwyższone poziomy Bcl-2 powodują utrzymywanie się komórek przy życiu, natomiast przewaga Bax powoduje przyspieszenie ich śmierci. Z kolei inny czynnik, Bcl-x, powoduje podobny efekt jak Bax. Gen *bcl-x* ulega alternatywnemu składaniu i koduje dwa różne białka Bcl-xL oraz Bcl-xS, z czego pierwszy z nich promuje przeżycie komórki, natomiast drugi jest antagonistą Bcl-2. W myszach transgenicznym, stwierdzono, że Bcl-2 ulega ekspresji głównie w spermatogoniach i wczesnych spermatocytach, jednak w naturze Bcl-2 i Bcl-x nie ulegają ekspresji w spermatogoniach. Jednak Bax może poprzez asocjacje z innymi czynnikami należącymi do rodziny Bcl-2 powodować śmierć spermatogonii. Podobnie mogą zachodzić procesy apoptozy w komórkach Leydiga, jednak nie stwierdzono czynników Bcl-2 i Bcl-xL w interstycjum (promujące przeżycie), jakkolwiek przejściowo na komórkach Leydiga było obecne białko Bax (wywołujące śmierć komórki) pod wpływem cytotoksycznej dla komórek Leydiga substancji EDS (14; etanodimetanosulfonate). Oprócz tego do rodziny białek biorących udział w regulacji apoptozy należą rodzina kaspaz i ostatnio badane w naszym zespole białko p53. Jednak białko to ujawnia zwłaszcza swoją rolę w przypadku mutacji, tj. przy odtransformowaniu komórek w kierunku nowotworowym. Uważa się, że prawidłowe p53 kontroluje pozytywnie Bax (w tym znaczeniu nasilałoby apoptozę) [18].

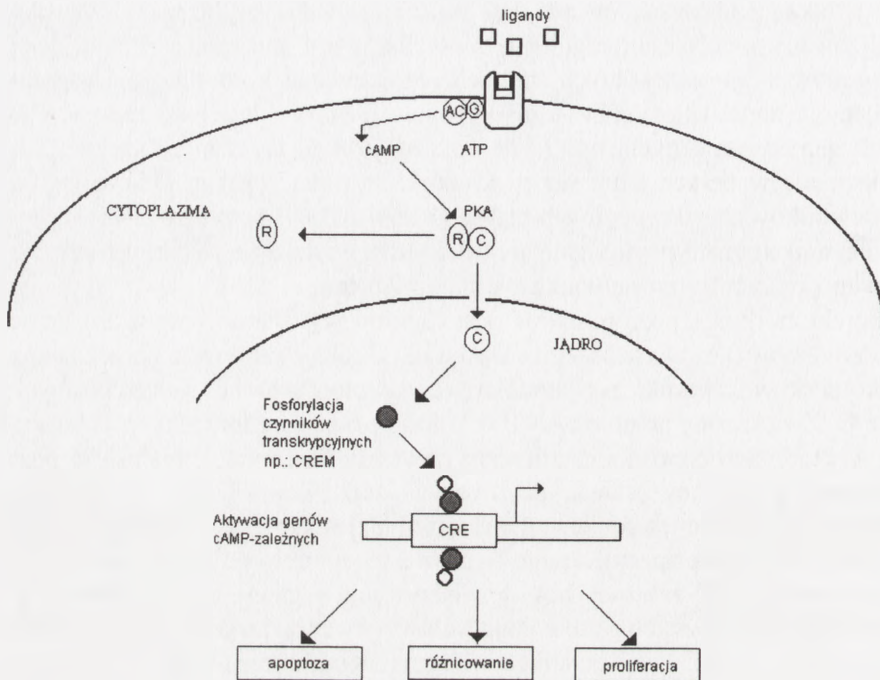
4. ROLA BIAŁKA CREM W SPERMATOGENEZIE: APOPTOZA A RÓŻNICOWANIE KOMÓREK

W przebiegu prawidłowego procesu spermatogenezy część komórek (szczególnie w fazie mejozy) ulega apoptozie. W ten sposób eliminowane są komórki niepra-

widłowe, a także hamowana ewentualna niekontrolowana proliferacja. Wysoko wyspecjalizowany mechanizm regulacji transkrypcji jest gwarancją prawidłowej ekspresji genów w poszczególnych stadiach różnicowania komórek gametogenicznych. Istnieją dane, iż czynniki transkrypcyjne ulegają odmiennej regulacji w komórkach gametogenicznych, np. *TATA-binding protein* wykazuje znacznie silniejszą ekspresję w tkance jądra niż w komórkach somatycznych [15]. Spośród licznych czynników transkrypcyjnych białko CREM (*cAMP response element modulator*), czynnik transkrypcyjny zależny od cAMP, wydaje się być kluczowy dla prawidłowego różnicowania nabłonka plemnikotwórczego.

Wewnątrzkomórkowy poziom cAMP jest regulowany przede wszystkim przez cyklazę adenylanową. Aktywność tego enzymu jest z kolei modulowana przez liczne zewnątrzkomórkowe czynniki, za pośrednictwem receptorów błonowych związanych z białkami G. Zwiększony poziom cAMP w komórce bezpośrednio aktywuje kinazę białkową A, której podjednostka katalityczna powoduje fosforylację białek. Stopień ufosforylowania czynników transkrypcyjnych w jądrze komórkowym wydaje się bezpośrednio modulować ich funkcję, a co za tym idzie ekspresję cAMP-zależnych genów. Zatem, wiązanie specyficznego liganda z receptorem powoduje aktywację lub zahamowanie cAMP-zależnej drogi przekazywania sygnału, a w konsekwencji regulację transkrypcji licznych genów mających w sekwencji promotora tzw. cAMP responsive element (CRE), czyli odcinek wiążący czynniki transkrypcyjne zależne od cAMP (rys. 1).

Wzór ekspresji białka CREM w tkance jądra sugeruje jego istotną rolę w przebiegu procesu spermatogenezy. W jądrze przedpokwitaniowym ekspresji ulega forma represorowa tego białka, natomiast w tkance dojrzałego jądra wykryto aktywującą jego izoformę – CREM τ [4]. Transkrypt CREM τ pojawia się w stadium pachytenowych spermatocytów, natomiast produkt białkowy tego genu wykrywa się w późniejszych stadiach różnicowania komórek postmejotycznych. Jest ono szczególnie specyficzne dla okrągłych spermatyd głównie w stadium VII i VIII różnicowania nabłonka plemnikotwórczego, a jego transkrypcja zanika w stadium IX [3]. Analizowano geny, które ulegają transkrypcji równolegle z pojawieniem się białka CREM w komórkach i mają w sekwencji swego promotora element CRE. Udowodniono, że co najmniej cztery z nich: RT-7 [3], *transition protein-1* [8], konwertaza angiotensyny [19] i kalspermina [16], podlegają regulacji poprzez białko CREM. W celu analizy funkcji białka CREM, u myszy wprowadzono mutację tego genu w domenie odpowiedzialnej za wiązanie z DNA. Mutacja ta powodowała inaktywację wszystkich izoform białka CREM. Myszy wykazywały prawidłową budowę i ciężar ciała. Heterozygoty cechowała obniżona płodność. Obserwowano u nich 46% redukcję liczby plemników w ejakulacie, a także obniżenie ich ruchliwości i zwiększony odsetek plemników morfologicznie nieprawidłowych. U homozygot obserwowano redukcję ciężaru jąder i brak plemników w ejakulacie, co w efekcie dawało całkowitą sterylność samców. Samice natomiast były płodne i miały prawidłową budowę



RYSUNEK 1. Schemat szlaku przekazywania sygnału zależnego od cAMP: R – receptor; G – białka G; AC – cyklaza adenylanowa; PKA – kinaza białkowa A; R – podjednostka regulatorowa kinazy białkowej A; C – podjednostka katalityczna kinazy białkowej A; CRE – sekwencja regulatorowa w promotorze zależna od cAMP

jajników [13]. Analiza anatomiczna nabłonka plemnikotwórczego wykazała redukcję średnicy kanalika nasiennego o 20–30% i brak prawidłowej fali spermatogenetycznej. Wykazano zatrzymanie spermatogenezy na etapie wczesnych spermatyd, natomiast komórki Sertoliego były prawidłowe [13]. Interesujące jest, że u pacjentów cierpiących na zaburzenia spermatogenezy (areszt spermatogenezy na etapie spermatocytów lub zespół samych komórek Sertoliego) wykazano również brak ekspresji czynnika CREM [10]. Analiza mikroskopowa kanalików nasiennych wykazała dziesięciokrotnie większą liczbę gametogenicznych komórek apoptotycznych u myszy ze zmutowanym genem CREM, natomiast nie stwierdzono nasilonej apoptozy w innych liniach komórkowych u tych myszy.

Pozwala to na stwierdzenie, że brak białka CREM powoduje nie tylko zaburzenie dojrzewania komórek gamatogenicznych, ale także skierowanie ich na drogę apoptozy. Funkcja białka CREM związana ze śmiercią komórek ograniczona jest tylko do komórek postmeiotycznych. Ekspresja czynnika CREM jest regulowana przez

hormony przysadki mózgowej. Chirurgiczne usunięcie przysadki u dorosłych szczurów prowadziło do utraty ekspresji CREM τ w jądrach tych zwierząt, u osobników przedpokwitaniowych natomiast, po usunięciu przysadki nie następowało zapoczątkowanie transkrypcji tego genu w przebiegu rozwoju osobniczego [4]. Gonadotropiny przysadkowe zatem, mają wpływ zarówno na uruchomienie transkrypcji genu CREM τ w pachytenowych spermatocytach, jak i na utrzymanie odpowiedniego poziomu ekspresji tego genu u dorosłych osobników.

5. UWAGI KOŃCOWE

Jednym z najbardziej fascynujących zjawisk, nie do końca poznanych, jest niejednakowa u różnych osobników męskich utrata funkcji rozrodczych, które niekiedy mogą być zachowane do końca życia. U niektórych osobników obserwuje się obniżenie liczby plemników, u innych zaś całkowite zahamowanie procesu spermatogenezy, na różnych jego etapach, tj. na poziomie spermatyd, spermatocytów, bądź spermatogonii. Nadzwyczaj skomplikowane procesy kontrolujące spermatogenezę i wielość wpływających na nią czynników wykluczają jednolity charakter zablokowania spermatogenezy w podeszłym wieku. Może to być cecha konstytucyjna (dziedziczna), wynikająca z mutacji (np. w obrębie genu kodującego CREM) lub licznych czynników środowiskowych.

W przedstawionym referacie podjęliśmy próbę charakterystyki podstawowych czynników molekularnych wpływających na spermatogenezę, tj. apoptozy i regulacji transkrypcji oraz zarys skomplikowanej gry hormonalnej. Należy sądzić, że stoimy dopiero u progu rozpoznawania czynników molekularnych, których charakterystyka pozwoli dopiero na leczenie przyczynowe niepłodności u osobników męskich.

LITERATURA

- [1] BAARENDS WM, GROOTGOED JA. Molecular biology of male gametogenesis. (W:) Fauser BCJM (ed.) *Molecular biology in reproductive medicine*. New York, The Parthenon Publishing Group 1999: 271–295.
- [2] CHEN H, LUO L, ZIRKIN BR. Leydig cell structure and function during aging. Johns Hopkins University, Baltimore USA 1996.
- [3] DELMAS V, VAN DER HOORN F, MELLSTRÖM B, JÉGOU B, SASSONE-CORSI P. Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1502–1514.
- [4] FOULKES NS, MELLSTRÖM B, BENUSIGLIO E, SASSONE-CORSI P. Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to transcriptional activator. *Nature* 1992; 355: 80–84.
- [5] FOULKES NS, SCHLOTTER F, PÉVET P, SASSONE-CORSI P. Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature* 1993; 362:264–267.

- [6] IRVINE DS. Changes in male reproductive health? (W:) Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB. (eds.) *Fertility and reproductive Medicine*. Amsterdam, Elsevier 1998: 141–155.
- [7] KIESS W, GALLAHER B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Europ J Endocrinol* 1998; **138**: 482–491.
- [8] KISTLER M, SASSONE-CORSI P, KISTLER SW. Identification of a functional cAMP response element in the 5'-flanking region of the gene for transition protein 1 (TP1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids. *Biol Reprod* 1994; **51**:1322–1329.
- [9] LAMBERTS SWJ, BELD AW, LELY A-J. The endocrinology of aging. *Science* 1997; **278**: 419–423.
- [10] LIN WW, LAMB DJ, LIPSHULTZ LI, KIM ED. Absence of cyclic adenosine 3':5' monophosphate responsive element modulator expression at the spermatocyte arrest stage. *Fert Ster* 1998; **69**:533–538.
- [11] MATSUI Y. Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *APMIS* 1998; **106**: 142–148.
- [12] MENDIS-HANDAGAMA SMLC, GELBER SJ. Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue Cell* 1995; **27**: 689–699
- [13] NANTEL F, MONACO L, FOULKES NS, MASQUILIER D, LeMEUR M, HENRIKSEN K, DIERICH A, PRVINEN M, SASSONE-CORSI P. Spermiogenesis deficiency and germ cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 1996; **380**:159–162.
- [14] OTTINGER MA. Male reproduction: testosterone, gonadotropins, and aging. (W:) Mobbs CV, Hof PR. (eds.) *Functional endocrinology of aging*. Basel, Karger 1998: 105–126.
- [15] SASSONE-CORSI P. Transcriptional checkpoints determining the fate of male germ cells. *Cell* 1997; **88**: 163–166.
- [16] SUN Z, SASSONE-CORSI P, MEANS A. Calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the calmodulin kinase IV gene. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 561–571.
- [17] TAYLOR MF, WOOLVERIDGE I, METCALFE AD, STREULI CH, HICKMAN JA, MORRIS ID. Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members. *J Endocrinol* 1998; **157**: 317–326.
- [18] TILLY JL, ROBLES R. Apoptosis and its impact in clinical reproductive medicine. (W:) Fauser BCJM (ed.) *Molecular biology in reproductive medicine*. New York, The Parthenon Publishing Group 1999: 79–101.
- [19] ZHOU Y, SUN Z, MEANS AR, SASSONE-CORSI P, BERNSTEIN KE. cAMP-response element modulator is a positive regulator of testis angiotensin converting enzyme transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**:12262–12266

Adres autora:

Zakład Genetyki PAN,

60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 32

ZWIĄZANE ZE STARZENIEM MODYFIKACJE W DZIAŁANIU HORMONÓW UWARUNKOWANE ZMIANAMI NA POZIOMIE RECEPTOROWYM I EFEKTOROWYM

CHANGES IN HORMONE RECEPTORS AND SIGNAL TRANSDUCTION DURING AGING

Zbigniew KMIĘĆ

Katedra Histologii i Immunologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Streszczenie: Starzeniu się ludzi i zwierząt towarzyszą zmiany w działaniu wielu hormonów na komórki docelowe. Związane ze starzeniem modyfikacje w funkcjach białek G przyczyniają się do obniżenia odpowiedzi wielu narządów na stymulację alfa-, a szczególnie beta-adrenergiczną. Natomiast w wątrobie ssaków wraz z wiekiem rośnie aktywność cykazy adenylnowej w wyniku wzrostu ilości receptorów β -adrenergicznych. Wraz z wiekiem ulega obniżeniu aktywność fosfolipazy C, co prowadzi do zmniejszonego uwalniania trójfosforanu inozytolu i jonów wapnia. Podczas starzenia się szczura ilość receptorów insuliny w komórkach nie zmienia się, natomiast zaburzenia zachodzące w mechanizmach autofosforylacji cząsteczek receptora mogą być częściowo odpowiedzialne za towarzyszące starzeniu zjawisko oporności tkanek i narządów na działanie insuliny. U ludzi po 60 roku życia obniża się ilość receptorów hormonu wzrostu w podwzgórze i hipokampie oraz w tkankach obwodowych, zaś u starych myszy wykazano zaburzenia w wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; *Supl.* 13:57–68)

Słowa kluczowe: starzenie się; receptory hormonów; układy transdukcji.

Summary: Aging process is associated with disturbances in hormone action. Age-related modifications of G-proteins result in diminished alpha- and beta-adrenergic responsiveness in many tissues and organs. However, in liver the number of β -adrenergic receptors and the activity of adenylyl cyclase increases in the course of aging. Phospholipase C activity decreases with age. There is no change in the number of insulin receptors as rat age, however, autophosphorylation of receptor is disturbed. The number of growth hormone receptors in hypothalamus, hippocampus and in peripheral tissues decreases during human aging, and deterioration of GH signal transduction was found in aged mice. Studies aimed at the elucidation of age-related alterations in hormonal signal transduction may be important for rational therapy of the elderly.

(*Advances in Cell Biology* 1999; *Supl.* 13: 57–68)

Key words: aging; hormone receptors; signal transduction.

WSTĘP

Cechą procesów starzenia się jest postępujące obniżenie zdolności adaptacyjnych do zmieniających się warunków środowiska zewnętrznego i wewnętrznego. Modyfikacje zachodzące w trakcie starzenia się w strukturze i funkcji organizmów nie powstają jedynie wskutek prostego sumowania się zmian na poziomie komórek i narządów, lecz są także skutkiem zaburzeń w systemach integrujących czynności organizmu: w układzie nerwowym oraz w układzie gruczołów wydzielania wewnętrznego. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat uzyskano szereg informacji, często sprzecznych lub niejednoznacznych, wskazujących na towarzyszące starzeniu zaburzenia w układach regulacji hormonalnej oraz zmiany w działaniu hormonów na starzejące się organizmy [21]. W trakcie ostatnich 15 lat, wraz z poznawaniem struktury receptorów hormonalnych oraz wewnątrzkomórkowych układów przekazywania sygnału, pojawiły się możliwości wyjaśnienia komórkowych i molekularnych mechanizmów odmiennego działania hormonów na komórki i narządy osobników w podeszłym wieku. Spośród kilkunastu znanych układów transdukcji sygnału hormonalnego tylko kilka stało się przedmiotem badań gerontologicznych. Do najintensywniej zbadanych należą mechanizmy związane z przekazaniem stymulacji adrenergicznej oparte o syntezę wtórnych przekaźników: cyklicznego 3',5'-adenozynomonofosforanu (cAMP) oraz trójfosforanu inozytoli (IP₃).

1. AKTYWACJA CYKLAZY ADENYLANOWEJ PRZEZ ZWIĄZKI ADRENERGICZNE

Najlepiej scharakteryzowano towarzyszące starzeniu modyfikacje w jednym z najważniejszych układów transdukcji sygnału, jaki stanowi receptor beta-adrenergiczny, sprzężone z nim białka G, cyklaza adenylnowa oraz kinazy aktywowane przez cykliczny AMP.

W wielu modelach doświadczalnych (tab. 1) wykazano zmniejszoną wrażliwość komórek różnych tkanek i narządów starych zwierząt w stosunku do agonistów beta-adrenergicznych, przy czym ilość (gęstość) receptorów w błonie większości narządów i tkanek zasadniczo nie ulegała zmianie [4,8,35,37]. Wyniki wielu prac wskazują na to, że zjawisko to spowodowane jest zmianami o charakterze post-receptorowym, które dotyczą białek G sprzęgających białka receptorowe z cyklazą adenylnową i innymi układami efektorowymi. Białka G mają strukturę hetero-

TABELA 1. Wpływ starzenia na systemy transdukcji aktywowane przez związki beta-adrenergiczne w komórkach i narządach szczura

Narząd	Receptor/ efektor	Wpływ starzenia
Serce (lewa komora)	receptor β cAMP białka G	Wiek: 7, 15 i 25 m-cy. Podobna ilość (gęstość receptorów; podstawowa i stymulowana produkcja cAMP u starych zwierząt obniżona o 30–43%; ilość podjednostek G_s mniejsza, a G_i – większa u starych zwierząt ^{37,42}
Izolowane kardiomiocyty	receptory β_1 i β_2 CA^A białko G_i^B	Wiek: 2, 8 i 24 m-ce. Zależne od wieku: spadek kurczliwości miocytów po selektywnej stymulacji β_1 i β_2 , spadek ilości receptorów β_1 , spadek podstawowej i stymulowanej aktywności CA; brak wpływu wieku na aktywność kinazy receptora oraz ilości białka G_i ⁵²
Tętnice krezkowe	receptory β cAMP	Wiek: 3, 10 i 24 m-ce. Mniejsza synteza cAMP pod wpływem izoproterenolu u starych zwierząt; podobna gęstość receptorów β ⁴
Komórki tłuszczowe	receptory β lipoliza białko $G_s\alpha$	Wiek: 6 i 24 m-ce. Słabsza stymulacja lipolizy w adipocytach starych szczurów wskutek obniżonej aktywacji CA wywołanej zmniejszoną ekspresją receptorów β_1 i β_3 -adrenergicznych; podobny poziom $G_s\alpha$ ¹³
Tkanka tłuszczowa żółta	izoformy białek G	Wiek: 3 i 24 m-ce. U starych zwierząt kilkakrotnie większa zawartość podjednostek $G\beta$ oraz $G_{i\alpha 1}$ i $G_{i\alpha 2}$, taka sama ilość izoform $G_{i\alpha 3}$ oraz podobna ilość $G_s\alpha$ ¹⁶
Brunatna tkanka tłuszczowa	receptory β_1 i β_3 cAMP	Wiek: 4 i 24 m-ce. Spadek z wiekiem o 50% ilości mRNA receptorów β_1 i β_3 oraz aktywności CA uwarunkowany prawdopodobnie spadek ilości podjednostek katalitycznych CA ⁴¹
Ślinianki	receptor β	Wiek: 4, 12 i 24 m-ce. Podobna ilość receptorów β , z wiekiem spadek sekrecji białka w śliniance przyusznej, ale nie podżuchwowej ³³
Mózgowie	aktywność CA	Wiek: 2 i 19 m-cy. W korze mózgowej i prążkowie starych zwierząt obniżona podstawowa i stymulowana dopaminą aktywność CA ⁵
Mózdzek	aktywność CA	Wiek: 3 i 20 m-cy. Obniżona ilość receptorów β -adrenergicznych i podstawowa (niestymulowana) aktywność CA u starych zwierząt, stymulowana aktywność CA podobna w obydwu grupach ⁴³
Wątroba	receptor β aktywność CA	Wiek: 6, 12, 24, 30 m-cy. Wzrost o 200–300% podstawowej i stymulowanej katecholaminami aktywności CA między 6 a 24 m-cem; wzrost ilości receptorów β w błonach komórkowych ¹⁷
Wątroba	podjednostki białek G	Wiek: 6, 12, 8 i 24 m-ce. Brak zmian w ilości podjednostek α i β białek G_s i G_i ; stymulowana toksyną cholery ADP-rybozylacja G_s (ale nie G_i) niższa u starych zwierząt ⁸

^ACA, cykloaza adenylanowa; ^B G_i , G_s , $G\beta$, podjednostki białka G

trimerów zbudowanych z podjednostek α , β i γ , przy czym białko G_s – stymulujące oraz białko G_i – hamujące aktywność cyklazy adenylanowej, w zasadzie różnią się tylko strukturą podjednostki α , która z tego względu oznaczana jest jako $G_s\alpha$ oraz $G_i\alpha$. W różnych układach doświadczalnych zaobserwowano (tab. 1), że starzeniu towarzyszy albo brak zmian w składzie białek G, albo spadek zawartości w błonach komórkowych podjednostek G_s [37] lub wzrost zawartości podjednostek hamujących G_i [16]. Różnorodność uzyskanych wyników związana jest też z tym, że znanych jest kilkanaście typów podjednostek α różniących się masą cząsteczkową, właściwościami immunologicznymi i funkcjonalnymi. Nie wyjaśniono jeszcze, czy zaobserwowane zmiany ilościowe spowodowane są modyfikacjami zachodzącymi w trakcie starzenia się w procesach transkrypcji, translacji czy też na etapie obróbki potranslacyjnej. Aktywność kinazy receptora beta-adrenergicznego (β ARK), ważnego enzymu kontrolującego desensytyzację receptora, była niezmienną w kardiomiocytach starych szczurów [50]. Chociaż aktywność cyklazy adenylanowej, stymulowana przez niespecyficzne związki (takie jak forskolina) w większości badanych narządów nie ulega zmianie podczas starzenia się zwierząt [20], to w niektórych tkankach ilość podjednostek katalitycznych enzymu ulega zmniejszeniu [41,44].

W przeciwieństwie do większości narządów, w których zaobserwowano zmniejszoną w starzeniu wrażliwość wobec katecholamin, w izolowanych komórkach starych szczurów zaobserwowaliśmy zwiększone uwalnianie glukozy pod wpływem adrenaliny w porównaniu do młodych zwierząt [22]. Efekt ten wynikał prawdopodobnie ze swoistego dla wątroby zwiększenia w trakcie starzenia się o ok. 50% ilości receptorów beta-adrenergicznych [17,42]. Zjawisku temu towarzyszył istotny wzrost aktywności cyklazy adenylanowej pod wpływem adrenaliny [17] lub izoproterenolu [17,42], który był spowodowany zależnymi od wieku funkcjonalnymi, ale nie strukturalnymi, zmianami białka G_s [8]. Tak więc u szczura znamienne cechę starzenia się wątroby stanowi podwyższenie aktywności cyklazy adenylanowej pod wpływem katecholamin. Innym narządem, w którym zaobserwowano związany ze starzeniem się wzrost aktywności cyklazy adenylanowej (stymulowanej przez forskolinę), jest rdzeń nadnerczy szczura [46].

Badania dotyczące wrażliwości komórek i narządów starzejących się ludzi na stymulację beta-adrenergiczną są niejednoznaczne. Dobrze udokumentowane jest obniżenie wrażliwości układu sercowo-naczyniowego wobec agonistów beta-adrenergicznych u ludzi w podeszłym wieku [25]. Zaobserwowano, że wraz z rosnącym wiekiem ludzi w limfocytach dochodzi do zmniejszenia syntezy cAMP pod wpływem izoproterenolu z powodu zmienionego oddziaływania między agonistą a receptorami o wysokim powinowactwie [11]. Białka G izolowane z błon komórkowych granulocytów lub limfocytów ludzi w podeszłym wieku cechowały inne właściwości strukturalne i czynnościowe w porównaniu do białek G uzyskanych z komórek krwi młodych ludzi [9]. Natomiast inni autorzy, badając jednojądrzaste komórki

krwi wykazali, że w trakcie starzenia się nie zmienia się ani ilość obecnych w błonie komórkowej stymulujących lub inhibujących podjednostek białka G, ani też ich aktywność w odpowiedzi na działanie specyficznych agonistów [1]. Również odpowiedź lipolityczna (mierzona przyrostem stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu w surowicy krwi) wywołana dożylną infuzją izoproterenolu była podobna u ludzi młodych i w podeszłym wieku [19].

2. AKTYWACJA FOSFOLIPAZY C PRZEZ ZWIĄZKI ALFA-ADRENERGICZNE

Drugim, obok cykazy adenylnowej, ważnym enzymem błony komórkowej uczestniczącym w przekazywaniu pobudzenia komórki przez szereg hormonów jest fosfolipaza C, która katalizuje rozkład dwufosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2), do wtórnych przekźników sygnalu: trójfosforanu inozytolu (IP_3) oraz dwuacyloglicerolu (DAG). W trakcie starzenia się szczura w śliniance przyusznej dochodzi pod wpływem stymulacji alfa-adrenergicznej do zmniejszenia syntezy IP_3 [29] oraz mniejszego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia [33]. Efekt ten nie był jednak spowodowany spadkiem aktywności fosfolipazy C lub ilości sprzęgającego białka $G\alpha_q$, ale zmienionym oddziaływaniem między receptorem alfa-adrenergicznym a białkiem $G\alpha_q$ [40]. Zachodzący pod wpływem pochodnej witaminy D_3 , $[OH]_2D_3$, w homogenatach dwunastnicy starych szczurów wzrost poziomu IP_3 oraz DAG był wyraźnie mniejszy w porównaniu do młodych zwierząt, jednak mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze wyjaśniony [7].

Wydaje się, że u ludzi w zaawansowanym wieku w krwinkach białych dochodzi do słabszej aktywacji fosfolipazy C. Wykazano m.in., że granulocyty obojętnochłonne starych ludzi uwalniały pod wpływem peptydu FMLP znacznie mniej IP_3 niż granulocyty młodych osób, przy czym ilość błonowych receptorów tego związku była jednakowa w obydwu grupach wiekowych [12].

3. RECEPTORY WYKAZUJĄCE AKTYWNOŚĆ KINAZY TYROZYNOWEJ

Szereg polipeptydowych czynników wzrostu działa na komórki za pośrednictwem receptorów błonowych, które po związaniu liganda wykazują aktywność kinazy zarówno w stosunku do miejsc tyrozynowych cytoplazmatycznej podjednostki receptora, jak i do białkowych substratów cytoplazmatycznych. Wpływ starzenia na ten typ transdukcji sygnalu został dotychczas opisany dla insuliny i hormonu wzrostu.

3.1. Wpływ starzenia na reaktywność tkanek wobec insuliny

Starzeniu się ludzi i zwierząt towarzyszy zjawisko zmniejszonej wrażliwości tkanek wobec insuliny charakteryzujące się podwyższeniem stężenia insuliny we krwi przy normalnym poziomie glikemii [6,30]. Wykazano przy tym ostatnio, że pewne narządy starych szczurów nie tracą wrażliwości na insulinę (np. mięsień czterogłowy uda), podczas gdy takie narządy lub tkanki, jak przepona lub tkanka tłuszczowa, wykazują oporność na działanie insuliny [10]. Jednym z możliwych mechanizmów prowadzących do związanej ze starzeniem oporności na insulinę mogą być zmiany w ilości receptorów insuliny, ich strukturze lub procesie transmisji sygnału. Dane przedstawione w tabeli 2 wskazują na to, że ilość cząsteczek receptora insuliny nie ulega wraz z wiekiem zmianie, natomiast zmniejszenie aktywności kinazy receptora insuliny obniża poziom aktywacji cząsteczki receptora.

TABELA 2. Wpływ starzenia na receptor insuliny i transdukcję sygnału w tkankach szczura

Badany układ	Charakterystyka wyników
Komórki tłuszczowe	Wiek: 3 i 24 m-ce. Ilość receptorów i ich powinowactwo nie zmienione, szybkość autofosforylacji cząsteczek receptora starych zwierząt niższa o 40% z powodu defektu w strukturze cząsteczki receptora ³⁸
Wątroba aktywność KRI ^A	Wiek: 3 i 24 m-ce. Niestymulowana aktywność KRI podobna, maksymalna aktywność KRI niższa o połowę w wątrobie starych zwierząt, co prowadzi do zmniejszonej fosforylacji tyrozyny w podjednostce β receptora ³¹
Wątroba aktywność KRI ^A	Wiek: 3 i 26 m-cy. W błonach komórkowych starych szczurów insulina o 50% słabiej aktywuje KRI, natomiast aktywność cytoplazmatycznej białkowej fosfatazy tyrozynowej defosforylującej podjednostkę β receptora wyższa o 30% ³²
Wątroba i mięsień PI-3K ^B	Wiek: 2, 5, 12, 20 m-cy. Brak związanych z wiekiem zmian w ilości cząsteczek receptora u starych zwierząt zmniejszona o 25% autofosforylacja receptora oraz o 70% aktywność PI-3K, przy niezmienionej liczbie cząsteczek tej kinazy ²
Różne narządy	Wiek: 7 i 22 m-ce. Zawartość mRNA receptora insuliny [egzon 11+] znamiennie niższa w wątrobie, mięśniu i sercu starych zwierząt ⁴⁸

^AKRI, kinaza receptora insuliny, ^BPI-3K, 3 kinaza fosfatydyloinozytolu.

3.2. Zmiany transdukcji sygnału

występujące w osi somatoliberyna-hormon wzrostu-somatomedyny

Złożoność związanych ze starzeniem zmian w układzie hormonalnym dobrze ilustrują modyfikacje osi somatoliberyna (GHRH) – hormon wzrostu (GH)-somatomedyny. W wielu pracach wykazano, że starzeniu towarzyszy postępujący spadek wydzielania hormonu wzrostu u ludzi i zwierząt [28] oraz spadek syntezy po-

wstającego pod wpływem GH insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1), dawniej zwanego somatomedyną C [14]. Uważa się, że zmiany w funkcjonowaniu osi GH-IGF przyczyniają się do wystąpienia charakterystycznych dla starzenia zmian składu ciała, takich jak: zmniejszenie masy mięśniowej i siły mięśni, utrata masy kostnej i wzrost zawartości tkanki tłuszczowej. Obniżenie sekrecji hormonu wzrostu u osób w podeszłym wieku spowodowane jest wieloma czynnikami. W badaniach autopsyjnych wykazano, że wraz z rosnącym wiekiem ludzi w wielu rejonach mózgu (np. w podwzgórzu, hipokampie, przysadce mózgowej, splocie naczyniówkowym, skorupie) wyraźnie maleje ilość miejsc wiążących znakowany hormon wzrostu [24], co prawdopodobnie prowadzi do nieadekwatnej odpowiedzi neuronów wydzielających somatoliberynę wobec zmian w stężeniu GH w surowicy krwi. W trakcie starzenia się ludzi dochodzi też do zmniejszenia wrażliwości komórek somatotropowych przysadki mózgowej w stosunku do somatoliberyny oraz wielu innych czynników stymulujących [14,15].

Innym czynnikiem istotnym dla zmniejszenia aktywności GH w trakcie starzenia się mogą być zmiany w poziomie białek surowicy krwi przenoszących ten hormon do tkanek oraz modyfikacje komórkowych receptorów GH. Stwierdzono, że u ludzi poziom białka surowicy wiążącego hormon wzrostu (GHBP) jest stabilny między 20 a 60 r. ż., a następnie maleje progresywnie o około 50% między 60 a 98 rokiem życia [27]. Ponieważ GHBP stanowi w istocie zewnątrzkomórkowy fragment (ektodomę) receptora GH, która ulega dysocjacji pod wpływem enzymów proteolitycznych, stężenie tego białka odzwierciedla ilość cząsteczek receptora hormonu wzrostu w błonach komórkowych. Przedstawione dane sugerują więc, że towarzyszący zaawansowanej fazie starzenia spadek ilości cząsteczek receptorów GH w błonach komórkowych, mógłby być, obok zmniejszonego wydzielania hormonu, dodatkowym czynnikiem powodującym zmniejszenie w starzeniu anabolicznego działania hormonu wzrostu.

Obwodowe efekty działania hormonu wzrostu wywołane są przez insulinopodobne czynniki wzrostu (głównie przez powstający w wątrobie IGF-1), których stężenia w surowicy krwi odzwierciedlają zmiany w stężeniu GH. W trakcie starzenia zaobserwowano zmniejszenie poziomu IGF-1 w surowicy [14], wywołane prawdopodobnie obniżoną syntezą tego polipeptydu. Ekspresja genu IGF-1 stymulowana *in vitro* w skrawkach wątroby przez hormon wzrostu była wyraźnie obniżona u starych myszy w porównaniu do dojrzałych zwierząt [53,54]. Efektowi temu towarzyszyło zarówno obniżenie fosforylacji receptorów GH, jak również zmniejszenie aktywności kinazy JAK2 oraz kinazy MAP – ważnych składników wewnątrzkomórkowego układu transdukcji sygnału [53,54]. W trakcie starzenia mogą także ulegać zmianie procesy zależne od działania somatomedyn. Wykazano, że w przeciwieństwie do komórek mięśniowych młodych i dojrzałych szczurów, IGF-1 w ogóle nie fosforylował białka kanału wapniowego typu L we włóknach mięśnia szkieletowego starych zwierząt z powodu zmian sygnałowania na szlaku kinaza tyrozyny – kinaza

białkowa C [36]. W warunkach *in vitro* IGF-1 nie stymulował syntezy białka w mięśniach szkieletowych dojrzałych i starych myszy (inaczej niż w komórkach młodych zwierząt), a ilość cząsteczek receptora IGF-1 w błonach komórek mięśniowych była u tych zwierząt obniżona [50]. U starych myszy intensywny wysiłek fizyczny prowadził w mięśniach szkieletowych do wzrostu zawartości białka i mRNA receptora IGF-1, zwiększał IGF do jego receptora, a także obniżał zawartość receptora insuliny i zwiększał zawartość transportera glukozy GLUT-4 [51]. Te ostatnie obserwacje wskazują na to, że organizmy starych zwierząt zachowują zdolność adaptacji do zwiększonego obciążenia, co może mieć cenne konsekwencje także dla starzenia się ludzi.

4. UKŁADY TRANSDUKCJI AKTYWOWANE PRZEZ RECEPTORY CYTOPLAZMATYCZNE I JĄDROWE

Hormony swobodnie dyfundujące przez błony komórkowe wiążą się z receptorami wewnątrzkomórkowymi (głównie jądrowymi), zaś powstały kompleks hormon-receptor wiąże się ostatecznie ze specyficznymi sekwencjami DNA w regionie regulatorowym genu, co prowadzi zwykle do stymulacji (a rzadziej hamowania) transkrypcji tego genu. Do tej grupy hormonów należą hormony sterydowe, pochodne aminokwasu tyroniny (trójiodotyronina, T_3), witaminy D_3 oraz witaminy A_1 (kwas retinowy).

W wątrobie starych szczurów zaobserwowano obniżone wiązanie trójiodotyroniny (T_3) i kwasu retinowego przez receptory jądrowe, co znalazło odzwierciedlenie w obniżonej aktywności kontrolowanych przez te hormony enzymów wątroby: enzymu jabłczanowego i tkankowej transglutaminazy [34]. Wykazano, że obserwowane zjawisko było przynajmniej częściowo spowodowane zmniejszoną transkrypcją genów receptorów T_3 i kwasu retinowego [34]. Obniżenie zawartości mRNA receptorów jądrowych T_3 i kwasu retinowego oraz aktywności tkankowej transglutaminazy wykazano też w mózgu starych szczurów [9]. Także w mięśniach sercowych starych szczurów zaobserwowano obniżony poziom mRNA formy β receptora T_3 , formy γ receptora kwasu retinowego oraz zmniejszenie zawartości białka tych receptorów [26]. Przytoczone obserwacje wskazują na to, że modulujący wpływ hormonów tarczycy i kwasu retinowego na poziom kontrolowanych przez nie enzymów lub innych białek ma miejsce nie tylko we wczesnej fazie ontogenezy, ale również w późniejszym okresie życia osobniczego. Gdyby zmniejszenie ilości receptorów hormonów tarczycy występowało także podczas starzenia się ludzi, zjawisko to mogłoby częściowo wyjaśnić częstsze występowanie objawów niewydolności tarczycy u osób w podeszłym wieku [23].

W wielu pracach wykazano, że podstawowe stężenie kortyzolu, głównego hormonu kory nadnerczy, nie zmienia się w trakcie starzenia się ludzi [44] lub nawet wzrasta wieczorem i w ciągu nocy [18,47]. U osób między 60 a 70 rokiem życia sprzężenie zwrotne w obrębie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza wydaje się dobrze funkcjonować, natomiast po 70 r.ż. częściej występuje oporność na test hamowania deksametazonem [39] lub kortyzolem [49]. Obserwowana u starszych zdrowych ludzi stosunkowo niewielka supresja sekrecji ACTH po podaniu kortyzolu [49] mogłaby wynikać ze spadku ilości receptorów glukokortykoidów w podwzgórze i hipokampie u osób po 65 r.ż. (materiał autopsyjny) [45]; u starych szczurów zaobserwowano spadek ilości receptorów kortykoliberyny (CRH) w przednim płacie przysadki mózgowej i wzrost ilości tych receptorów w pośrednim płacie przysadki [3]. W dostępnym piśmiennictwie brak jest prac charakteryzujących wpływ starzenia na receptory glukokortykoidów, zaobserwowano jedynie, że podawanie deksametazonu młodym i starym szczurom w podobny sposób wpływało na aktywność cykazy adenylanowej w różnych narządach [42].

PODSUMOWANIE

Wydaje się, że w warunkach podstawowych funkcje gruczołów dokrewnych są zachowane w starzejącym się organizmie w wystarczającym stopniu, a ich zaburzenia przejawiają się w stanach zmienionej, z powodów fizjologicznych lub patologicznych, homeostazy wewnątrzustrojowej. W trakcie starzenia się dochodzi do zmian w mechanizmach transdukcji wielu sygnałów hormonalnych, z których najlepiej poznano modyfikacje funkcji białek sprzęgających G obecnych w błonach komórkowych. Poznanie zróżnicowanej odpowiedzi układu hormonalnego oraz systemów receptorowych i efektorowych w organizmach osób w podeszłym wieku wobec zmieniającego się środowiska zewnętrznego i wewnętrznego może być pomocne w ustaleniu podstaw racjonalnej interwencji profilaktycznej lub terapeutycznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARKI-HARRINGTON L, NECHAMKIN Y, SCHREIBER G, AVISSAR S. Functional and quantitative measures of receptor-coupled G proteins in human mononuclear leukocytes: no change with age. *Exp Gerontol* 1996; **31**: 351.
- [2] CARVALHO CR, BRENELLI SL, SILVA AC, NUNES AL, VELLOSO LA, SAAD MJ. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidyl-inositol 3-kinase in liver and muscle of rats. *Endocrinology* 1996; **137**: 151–159.

- [3] CECCATELLI-S; CALZA-L; GIARDINO-L Age-related changes in the expression of corticotropin releasing hormone receptor mRNA in the rat pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **37**: 175–180.
- [4] CHIN JH, HIREMATH AN, HOFFMAN BB. cAMP signaling mechanisms with aging in rats. *Mech Ageing Dev* 1996; **86**: 11–26.
- [5] CINTRA-A; BHATNAGAR-M; CHADI-G; TINNER-B; LINDBERG-J; GUSTAFSSON-JA; AGNATI-LF; FUXE-K. Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **746**: 42–61.
- [6] DARDEVET D, SORNET C, ATTAIX D, BARACOS VE, GRIZARD J. Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. *Endocrinology* 1994; **134**: 1475–1484.
- [7] de BOLAND AR, FACCHINETTI MM, BALOGH G, MASSHEIMER V, BOLAND RL. Age-associated decrease in inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol generation by 1,25[OH]₂-vitamin D₃ in rat intestine. *Cell Signal* 1996; **8**: 153–157.
- [8] EAKES AT, HYMER TK, ROSENTHAL MJ, MOSS J, KATZ MS. Alterations of adenyl cyclase-linked G proteins in rat liver during aging. *Am J Physiol* 1996; **270**: E126–E132.
- [9] ENDERLIN V, ALFOS S, PALLET V, GARCIN H, AZAIS-BRAESCO V, JAFFARD R, HIGUERET P. Aging decreases the abundance of retinoic acid [RAR] and triiodothyronine [TR] nuclear receptor mRNA in rat brain: effect of the administration of retinoids. *FEBS Lett* 1997; **412**: 629–632.
- [10] ESCRIVA F, AGOTE M, RUBIO E, MOLERO JC, PASCUAL-LEONE AM, ANDRES A; SATRUSTEGUI J; CARRASCOSA JM. *In vivo* insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats. *Endocrinology* 1997; **138**: 49–54.
- [11] FELDMAN RD, LIMBIRD LE, NADEAU J, ROBERTSON D, WOOD AJ. Alterations in leukocyte beta-receptor affinity with aging. A potential explanation for altered beta-adrenergic sensitivity in the elderly. *N Engl J Med* 1984; **310**: 815–819.
- [12] FULOP T JR. Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing. *Immunol Lett* 1994; **40**: 259–268.
- [13] GETTYS TW, ROHLFS EM, PRPIC-V, DANIEL KW, TAYLOR IL, COLLINS S. Age-dependent changes in -adrenergic receptor subtypes and adenyl cyclase activation in adipocytes from Fischer 344 rats. *Endocrinology* 1995; **136**: 2022–2032.
- [14] GHIGO E, ARVAT E, GIANOTTI L, RAMUNNI J, DIVITO L, MACCAGNO B, GROTTOLI S, CAMANNI F. Human aging and the GH-IGF-I axis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; **Suppl 3**: 271–278.
- [15] GIRARD N, FERLAND G, BOULANGER L, GAUDREAU P. Long-term calorie restriction protects rat pituitary growth hormone-releasing hormone binding sites from age-related alterations. *Neuroendocrinology* 1998; **68**: 21–29.
- [16] GREEN A, GASIC S, MILLIGAN G, DOBIAS SB. Increased concentrations of proteins Gi1 and Gi2 in adipocytes from aged rats alter the sensitivity of adenyl cyclase to inhibitory and stimulatory agonists. *Metabolism* 1995; **44**: 239–244.
- [17] KATZ MS. Food restriction modulates beta-adrenergic-sensitive adenylate cyclase in rat liver during aging. *Am J Physiol* 1988; **254**: E54–E62.
- [18] KERN W, DODT C, BORN J, FEHM HL. Changes in cortisol and growth hormone secretion during nocturnal sleep in the course of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996; **51**: M3–9.
- [19] KLEIN CE, NIES A, GERBER J. The effect of age on the beta-adrenergic lipolytic response in healthy humans. *Clin Pharmacol Ther* 1994; **56**: 210–216.
- [20] KLINGLER C, PREISSER L, BARRAULT MB, LLUEL P, HORGEN L, TEILLET L, ANCELLIN N, CORMAN B. Vasopressin V2 receptor mRNA expression and cAMP accumulation in aging rat kidney. *Am J Physiol* 1997; **272**: R1775–R1782.
- [21] KMIEĆ Z. Wpływ starzenia na układ endokryny. *Pol Tyg Lek* 1993; **48**: 634–637.

- [22] KMIĘĆ Z, MYŚLIWSKI A, SUPPAN K, ANDRZEJEWSKA A. The effect of age on hormonally-stimulated glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Arch Gerontol Geriatr* 1990; **10**: 9–17.
- [23] KMIĘĆ Z, SWORCZAK K, FOERSTER A. Wpływ starzenia się ludzi na czynność tarczycy w stanach jej fizjologii i patologii. *Post Nauk Med* 1993; **6**: 122–125.
- [24] LAI Z, ROOS P, ZHAI O, OLSSON Y, FHOLENHAG K, LARSSON C, NYBERG F. Age-related reduction of human growth hormone-binding sites in the human brain. *Brain Res* 1993; **621**: 260–266.
- [25] LAKATTA EG. Deficient neuroendocrine regulation of the cardiovascular system with advancing age in healthy humans. *Circulation* 1993; **87**: 631–636.
- [26] LONG X, BOLUYT MO, O'NEILL L, ZHENG JS, WU G, NITTA YK, CROW MT, LAKATTA EG. Myocardial retinoid X receptor, thyroid hormone receptor, and myosin heavy chain gene expression in the rat during adult aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; **54**: B23–27.
- [27] MAHESHWARI H, SHARMA L, BAUMANN G. Decline of plasma growth hormone binding protein in old age. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 995–997.
- [28] MARTIN FC, YEO AL, SONKSEN PH. Growth hormone secretion in the elderly: ageing and the somatopause. *Baillier Clin Endocrinol Metab* 1997; **11**: 223–250.
- [29] MIYAMOTO A, VILLALOBOS-MOLINAR, KOVATCH MA, ROTH GS. Altered coupling of alpha 1-adrenergic receptor-G protein in rat parotid during aging. *Am J Physiol* 1992; **262**: C1181–1188.
- [30] MULLER DC, ELAHID, TOBIN JD, ANDRES R. The effect of age on insulin resistance and secretion: a review. *Semin Nephrol* 1996; **16**: 289–298.
- [31] NADIV O, COHEN O, ZICK Y. Defects of insulin's signal transduction in old rat livers. *Endocrinology* 1992; **130**: 1515–1524.
- [32] NADIV O, SHINITZKY M, MANU H, HECHT D, ROBERTS CT JR, LEROITH D, ZICK Y. Elevated protein tyrosine phosphatase activity and increased membrane viscosity are associated with impaired activation of the insulin receptor kinase in old rats. *Biochem J* 1994; **298**: 443–450.
- [33] OLSEN JG, SALIH MA, HARRISON JL, HERRERA I, LUTHER MF, KALU DN, LISCHITZ MD, KATZ MS, YEH CK. Modulation by food restriction of intracellular calcium signaling in parotid acinar cells of aging Fischer 344 rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1997; **52**: B152–158.
- [34] PALLET V, AZAIS-BRAESCO V, ENDERLIN V, GROLIER P, NOEL-SUBERVILLE C, GARCIN H, HIGUERET P. Aging decreases retinoic acid and triiodothyronine nuclear expression in rat liver: exogenous retinol and retinoic acid differentially modulate this decreased expression. *Mech Age Dev* 1997; **99**: 123–136.
- [35] RAJAKUMAR G, KOLLER MM, SCARPACE PJ. Beta-adrenergic receptors and salivary gland secretion during aging. *Growth Dev Aging* 1992; **56**: 215–223.
- [36] RENGANATHAN M, SONNTAG WE, DELBONO O. L-type Ca²⁺ channel-insulin-like growth factor-1 receptor signaling impairment in aging rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **235**: 784–789.
- [37] ROTH DA, WHITE CD, PODOLIN D, MASZZEO RS. Alternations in myocardial signal transduction due to aging and chronic dynamic exercise. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 177–182.
- [38] RUIZ P, PULIDO JA, MARTINEZ C, CARRASCOSA JM, SATRUSTEGUI J, ANDRES A. Effect of aging on the kinetic characteristics of the insulin receptor autophosphorylation in rat adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 1992; **296**: 231–238.
- [39] SAPOLSKY RM. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Ann NY Acad Sci* 1994; **746**: 294–304.

- [40] SAWAKI K, BAUM BJ, ROTH GS, AMBUDKAR IS. Decreased m3-muscarinic and alpha 1-adrenergic creceptor stimulation of PIP2 hydrolysis in parotid gland membranes from aged rats: defect in activation of G alpha q/11. *Arch Biochem Biophys* 1995; **322**: 319–326.
- [41] SCARPACE PJ, DOVE J, MATHENY M. Effects of age on beta adrenergic subtype activation of adenylyl cyclase in brown adipose tissue. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; **213**: 262–267.
- [42] SLOTKIN TA, THAI L, McCOOK EC, SALEH JL, ZHANG J, SEDLER FJ. Aging and glucocorticoids: effects on cell signalling through aadenylyl cyclase. *J Pharmacol Exp Therapeut* 1996; **279**: 478–491.
- [43] SLOTKIN TA, ZHANG J, McCOOK EC, SEDLER FJ. Glucocorticoid-targeting of the adenylyl cyclase signalling pathway in the cerebellum of young vs. aged rats. *Brain Res* 1998; **800**: 236–244.
- [44] SVEC F. Ageing and adrenal cortical function. *Baillier Clin Endocrinol Metab* 1997; **11**: 271–287.
- [45] TOHGI H, UTSUGISAWA K, YAMAGATA M, YOSHIMURA M. Effects of age on messenger RNA expression of glucocorticoid, thyroid hormone, androgen, and estrogen receptors in postmortem human hippocampus. *Brain Res* 1995; **700** 245–253.
- [46] TUMER N, SEGO RL, SCARPACE PJ. Atypical pattern of adenylyl cyclase activity in the adrenal nedulla with age. *Exp Gerontol* 1996; **31**: 571–576.
- [47] Van CAUTER E, LEPROULT R, KUPFER DJ. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 2468–2473.
- [48] VIDAL H, AUBOEUF D, BEYLOT M, RIOU JP. Regulation of insulin receptor mRNA splicing in rat tissues. Effect of fasting, aging, and diabetes. *Diabetes* 1995; **44**: 1196–1201.
- [49] WILKINSON CW, PESKIND ER, RASKIND MA. Decreased hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensivity to cortisol feedback inhibition in human aging. *Neuroendocrinology* 1997; **65**: 79–90.
- [50] WILLIS PE, CHADAN S, BARACOS V, PARKHOUSE WS. Acute exercise attenuates age-associated resistance to insulin-like growth factor I. *Am J Physiol* 1997; **272**: E397–404.
- [51] WILLIS PE, CHADAN S, BARACOS V, PARKHOUSE WS. Restoration of insulin-like growth factor I action in skeletal muscle of old mice. *Am J Physiol* 1998; **275**: E525–530.
- [52] XIAO RP, TOMHAVE ED, WANG DJ, JI X, BOLUYT MO, CHENG H, LAKATTA EG, KOCH WJ. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1273–1282.
- [53] XU X, BENNETT SA, INGRAM RL, SONNTAG WE. Decreases in growth hormone receptor signal transduction contribute to the decline in insulin-like growth fater I gene expression with age. *Endocrinology* 1995; **136** 4551–4557.
- [54] XU X, SONNTAG WE. Moderate caloric restriction prevents the age-related decline in growth hormone receptor signal transduction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1996; **51**: B167–174.

Adres autora:

*Katedra Histologii i Immunologii AM w Gdańsku,
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1, e-mail: zkmiec@amg.gda.pl*

**MECHANIZMY RÓŻNICOWANIA I WZROSTU
KOMÓREK U ROŚLIN**

**PLANT CELLS DIFFERENTIATION
AND GROWTH MECHANISMS**

Redaktor *prof. dr hab. Maria J. Olszewska*

WPROWADZENIE

INTRODUCTION

Niniejszy suplement do Postępów Biologii Komórki zawiera teksty większości wykładów wygłoszonych podczas konferencji **Mechanizmy różnicowania i wzrostu komórek**, poświęconej 70-leciu prof. dr hab. Zygmunta Hejnowicza, zorganizowanej w dniu 17 czerwca 1999 r. na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego. Prof. Zygmunt Hejnowicz, kierownik Katedry Biofizyki i Biologii Komórki w tym Uniwersytecie, wykształcił grono uczniów w Uniwersytetach Wrocławskim i Śląskim, z których niektórzy są autorami zamieszczonych artykułów. Prof. Hejnowicz, poza publikacjami wybitnych własnych osiągnięć naukowych, jest autorem fundamentalnych podręczników o charakterze monografii: *Anatomia rozwojowa drzew*, 1973, PWN, Warszawa, *Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych*, 1980, PWN oraz J. A. Romberger, Z. Hejnowicz, J. F. Hill *Plant structure: function and development*, 1992, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Maria J. Olszewska

ANIZOTROPIA NAPRĘŻEŃ W ŚCIANACH KOMÓRKOWYCH A WPŁYW AUKSYNY NA SZYBKOŚĆ WZROSTU PĘDU I KORZENIA

MECHANICAL STRESS ANISOTROPY IN CELL WALLS AND THE EFFECT OF AUXIN ON THE ELONGATION RATE IN SHOOTS AND ROOTS

Zygmunt HEJNOWICZ

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: *Podstawy zagadnienia:* nieuwzględnianie naprężeń tkankowych (TS, od *tissue stresses*) w organach typu pędowego i w korzeniu uniemożliwiało zrozumienie różnic w reakcji wzrostowej tych organów na auksynę. *Naprężenie jako tensor, kierunki główne:* Główne kierunki naprężeń są rozpoznawane przez komórki; wyznaczają orientację podziałów komórkowych. Stwierdzenie to ma poparcie w porównaniu głównych kierunków wzrostu z kierunkami podziałów w merystemach roślin, bowiem oba typy głównych kierunków pokrywają się, a również w fackie, że zawieszina dzielących się komórek roślinnych w agarozie, reaguje ukierunkowaniem podziałów na przyłożoną do płytki agarozowej siłę ściskającą. *Naprężenia tkankowe:* TS stanowią rodzaj naprężeń wstępnych w turgorowo naprężonym organie, wywołanych pośrednio ciśnieniem turgorowym, a uwarunkowane zróżnicowaniem strukturalnym w organie. Rozciągające TS mogą osiągać dużą wartość w porównaniu z ciśnieniem turgorowym. *Anizotropia naprężeń w ścianach komórkowych.* Charakteryzujemy ją podając stosunki naprężeń w kierunkach głównych. W przypadku izolowanych komórek, anizotropia zależy tylko od kształtu komórki; w komórkach cylindrycznych naprężenie poprzeczne jest dwa razy większe niż podłużne. W komórkach organu, którego stabilność mechaniczna uwarunkowana jest turgorem, anizotropia naprężeń zależy również od TS w organie. W organach typu pędowego (łodyga, hypokotyl, koleoptyl), w których peryferyczna tkanka znajduje się pod silnym podłużnym, rozciągającym TS, w podłużnych ścianach tej tkanki istnieje znaczna przewaga naprężenia podłużnego, nawet w komórkach cylindrycznych. W korzeniu, peryferyczna tkanka jest w stanie ściskającego TS, w związku z czym w ścianach komórek tej tkanki przeważa naprężenie poprzeczne. *Wpływ auksyny na wzrost organów:* Wysunięto hipotezę, że auksyna stymuluje wydłużanie w tym kierunku, w którym naprężenie ścian, w tkance najbardziej wrażliwej na auksynę, jest największe. W pędzie jest to kierunek podłużny, w korzeniu jest to kierunek poprzeczny do osi organu; auksyna podana na pęd stymuluje wydłużanie, zaś podana na korzeń stymuluje grubienie. *Wniosek:* uwzględnienie tensorowych właściwości naprężeń, oraz strukturalnie uwarunkowa-

nych TS, dotąd całkowicie zaniechanych, ma istotne znaczenie dla interpretacji wyników doświadczeń.

(*Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 71–82*)

Słowa kluczowe: anizotropia naprężeń, auksyna, główne kierunki naprężeń, naprężenie, ściana komórkowa, wzrost

Summary: Neglecting of tissue stresses (TS) in the shoot-type organs and roots affected the understanding of differences in growth reaction of these organs to auxin. *Mechanical stress as a tensor quantity, principal directions.* Principal directions of the stress are recognized by cells; cell divisions in plant meristems occur in the planes of principal direction of growth which coincide with the principal directions of stress, and the application of a load to agarose blocks containing protoplasts orients the division plane of embedded cells in the principal directions. *Tissue stresses.* TS represent a sort of pre-stresses in a turgid, structurally heterogeneous plant organs. Tensile TS may attain a high value in comparison to the turgor pressure. *Stress anisotropy in cell walls.* It is characterized by the ratio of stress values in the principal directions. The anisotropy depends on cell shape; e.g. in cylindrical cells, the ratio of longitudinal stress to transverse stress is close to 1:2 in longitudinal walls. In a turgid organ, the anisotropy is affected by the TS. In shoot-type organs (stem, hypocotyl, coleoptile), the outer tissue, composed of the epidermis and/or collenchyma, is under a high tensile TS in the longitudinal direction, and the longitudinal stress strongly prevails in longitudinal walls in spite of cylindrical shape of cells. In a root, the outer tissue is under a compressive longitudinal TS, and therefore the transverse stress prevails. *The effect of auxin on plant organ growth.* A hypothesis is put forward, that auxin stimulates growth in the direction in which the tensile stress in cell walls is the highest; it is longitudinal or transverse direction, in shoots and roots, respectively. Auxin applied to a shoot organ stimulates its elongation, while applied to a root stimulates its thickening. *Conclusion.* A regard to tensorial attributes of the mechanical stress, and to the TS is important for a proper interpretation of experimental data.

(*Advances in Cell Biology 1999; Supl. 13: 71–82*)

Key words: auxin, cell walls, growth, mechanical stress, principal directions of stress, stress anisotropy

NAPRĘŻENIE JAKO WIELKOŚĆ TENSOROWA, KIERUNKI GŁÓWNE

Naprężenie mechaniczne jest czynnikiem niesłusznie zaniechany w biologii komórki, ale sytuacja zaczyna się zmieniać, zwłaszcza po odkryciu, że naprężenie rozciągające w kinetochorach jest bardzo ważnym czynnikiem automatyzmu w segregacji chromosomów, oraz że zmienia chemizm kinetorów (przeгляд [13]).

Naprężenie (σ) jest to stosunek siły (F) do powierzchni (A), na którą działa; $\sigma = F/A$. Ponieważ zarówno siła, jak i powierzchnia są ukierunkowane, naprężenie jest wielkością bardziej skomplikowaną niż siła (wielkość wektorowa); jest to wielkość tensorowa, ma wartość określoną dla każdego kierunku w danym punkcie ciała. Przedstawiamy ją w postaci indykatrixy – zamkniętej powierzchni, której odległość od początku układu współrzędnych, pokrywaną się z danym punktem ciała w danym kierunku, jest proporcjonalna do wartości tensora w tym kierunku.

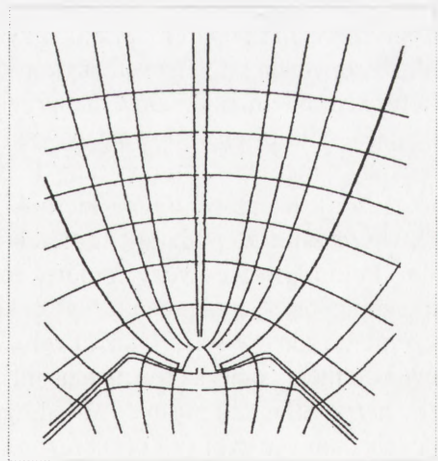
Wielkość tensorowa w trójwymiarowej przestrzeni ma przynajmniej trzy ortogonalne kierunki, w których osiąga wartości ekstremalne, zwane kierunkami głównymi. W szczególności jednak, indykatorysa może być kulą; we wszystkich kierunkach wartość jest taka sama.

Wielkość tensorowa w różnych punktach przestrzeni może być różna, mamy wtedy do czynienia z niejednorodnym polem tensorowym. Główne kierunki zmieniają się zwykle od punktu do punktu tworząc trajektorie (linie) głównych kierunków. W każdym punkcie przecinają się trzy główne trajektorie pod kątem prostym.

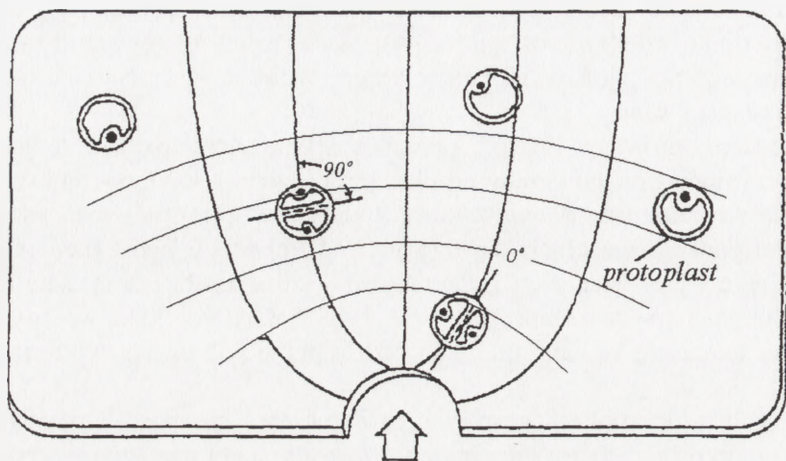
Naprężenie wynikające z tej składowej siły, która działa prostopadłe do danej powierzchni to naprężenie normalne, zaś wynikające ze składowej stycznej to naprężenie ścinające. W dalszym ciągu będzie brane pod uwagę tylko naprężenie normalne.

Naprężenia w kierunkach głównych to naprężenia główne. W niezbyt grubej ścianie komórkowej, jeden z kierunków głównych stanu naprężeń pokrywa się z grubością ściany, a charakterystykę naprężeń podaje dwuwymiarowa (płaska) indykatorysa w płaszczyźnie ściany. Stosunek naprężeń głównych w tej płaszczyźnie jest anizotropią naprężeń w ścianie, w danym punkcie. W szczególnym przypadku, gdy dwuwymiarowa indykatorysa jest kołem, mamy do czynienia z izotropią naprężeń.

Okazuje się, że komórki rozpoznają główne kierunki naprężeń w ścianach komórkowych tkanki. Mianowicie, główne kierunki wyznaczają orientację podziału komórkowego; powierzchnia podziału znajduje się w powierzchni wyznaczonej przez dwa główne kierunki naprężeń. Stwierdzenie to wynika to z naszej hipotezy, że podziały komórkowe wyznaczone są przez główne kierunku wzrostu [4,6]. Mianowicie, szybkość wzrostu jest również wielkością tensorową [5], a główne kierunki wzrostu (rys. 1), pokrywają się z głównymi kierunkami naprężeń, choć nie koniecznie tak, że kierunek maksymalnej szybkości wzrostu pokrywa się z kierunkiem maksymalnego naprężenia. Może być tak, że maksymalny wzrost zachodzi w kierunku minimalnego naprężenia. Sama hipoteza wynika z po-



RYSUNEK 1. Przykład głównych kierunków wzrostu w merystemie wierzchołkowym korzenia, na przekroju osiowym. Trzeci rodzaj głównych kierunków to okręgi wokół osi, a więc w płaszczyznach prostopadłych do rysunku. Należy zwrócić uwagę, że układ głównych kierunków odpowiada układowi peryklin i antyklin, które są równoległe bądź prostopadłe do ścian podziałowych [6]



RYSUNEK 2. Orientacja podziałów komórkowych w protoplastach znajdujących się w płytce agarowej, naciskanej w miejscu wskazanym strzałką tak, że główne kierunki naprężeń w agarozie przebiegały według wskazanych linii, wyznaczonych metodą elasto-optyczną [17]

równania głównych kierunków wzrostu i kierunków podziałów komórkowych w merystemach wierzchołkowych. (Nakielski, w tym samym zeszycie). Istnieje obecnie eksperymentalne poparcie tej hipotezy. Mianowicie, Lynch i Lintilhac [17] stwierdzili, że zawieszona dzielących się komórek roślinnych w płytce agarozowej reaguje ukierunkowaniem podziałów na przyłożoną do płytki siłę naciskającą albo rozciągającą. Siła ta powodowała pewien rozkład słabych naprężeń w agarozie rozpoznawany metodą elasto-optyczną. Podziały komórek zachodziły w powierzchniach wyznaczonych przez główne kierunki naprężeń w agarozie (rys. 2).

Stwierdzenie, że podziały komórek występują w głównych kierunkach naprężeń ściany komórkowej dotyczy komórek roślinnych. W tym przypadku mamy turgorowo naprężoną ścianę i naprężony cytoszkielet zakotwiczony w ścianie. Zarówno naprężenie turgorowe ściany, jak i naprężenie w cytoszkielecie to naprężenie wstępne; pewne elementy ciała są rozciągane inne zaś ściskane, niezależnie od sił działających z zewnątrz. Stan taki zwany jest tensegralnością [14]. W przypadku komórek zwierzęcych mamy raczej tylko naprężone cytoszkielety. Naprężenie wstępne w cytoszkielecie wynika głównie z sił przesuwających filamenty względem siebie, a generowanych z nakładem energii za pośrednictwem białek motorycznych. Główne kierunki w naprężonym cytoszkielecie wyznaczone są przez wypadkowe kierunki ułożenia elementów cytoszkieletu. W czasie podziału jeden z głównych kierunków jest wyznaczony przez oś wrzeciona podziałowego. Twierdzenie, że kierunek podziału komórki jest wyznaczony przez główne kierunki stanu naprężeń, względnie stanu wzrostu (odkształceń) rosnącego ciała organizmu, ma więc ogólne znaczenie.

Można zarazem wykazać, że w naprężonym ciele, również w przypadku tensegralności w ciele rośliny czy zwierzęcia, istnieje ciągłość głównych kierunków. Pojęcie głównych kierunków jest więc bardzo ważne w biologii, a wynika ono z pojęcia tensora. Niestety, niezrozumienie wielkości tensorowych powoduje, że w języku przeciętnego biologa brak pojęcia głównych kierunków. Twierdzenie, że naprężenie i wzrost to wielkości tensorowe, nie jest więc werbalizmem.

Przechodząc do głównego tematu należy wprowadzić zjawisko naprężeń tkankowych (TS od *tissue stresses*) w organach roślin.

NAPRĘŻENIA TKANKOWE

Istnienie TS oznacza istnienie stanu ściśnięcia lub rozciągnięcia różnych tkanek wewnątrz organu, którego sztywność uwarunkowana jest turgorem [8,9]. Gdybyśmy rozcięli odcinek organu na tkanki, to pewne tkanki po rozcięciu będą krótsze niż odcinek, bo *in situ* były naciągnięte, inne zaś dłuższe, bo były ściśnięte. TS są też przyczyną wyginania się sektorów po rozcięciu organu na sektory. TS (w danej warstwie) zanika przy izolowaniu warstwy z organu, ale w izolowanej warstwie pozostaje naprężenie turgorowe komórek.

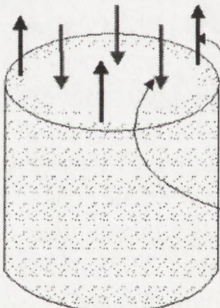
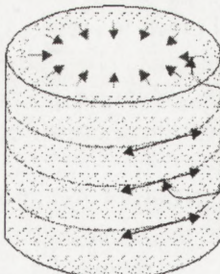
Według rozpowszechnionego poglądu, TS powstają wskutek zróżnicowanego wzrostu tkanek, co miało by wynikać z różnic we wrażliwości tkanek na auksynę lub z różnic w koncentracji auksyny [15,18]. Nasze badania [10] wykazały jednak, że TS są nieodzowną fizyczną konsekwencją różnic między warstwami (pasmami) pod względem tkankowych modułów elastyczności (odpowiedniki modułów Younga w różnych kierunkach anizotropowego ciała), spowodowanych różną grubością ścian komórkowych, różnymi kształtami i rozmiarami komórek, etc. Ta warstwa, która charakteryzuje się najwyższym (w organie) modułem jest w stanie maksymalnego rozciągającego TS, zaś ta, która charakteryzuje się najniższym modułem (cienkie ściany, duża średnica komórek), jest w stanie maksymalnego TS ściskającego. TS stanowią rodzaj naprężeń wstępnych w turgorowo naprężonym organie, wywołanych pośrednio ciśnieniem turgorowym, a uwarunkowane zróżnicowaniem strukturalnym w organie. Przewidywanie naszego modelu fizycznego dla tych naprężeń zgadzają się z pomiarami na konkretnych organach (hypokotyl słonecznika [10], łodyga *Reynoutria* [11]). Nie potrzeba zróżnicowanego wzrostu, aby objaśnić pochodzenie TS, co oczywiście nie wyklucza możliwości modyfikacji strukturalnych TS przez zróżnicowany wzrost.

Dzięki strukturalnie uwarunkowanym TS w łodygach lub innych cylindrycznych organach, charakteryzujących się turgorową stabilnością mechaniczną, podłużne naprężenia w ścianach o różnej grubości są takie same niezależnie od ciśnienia turgorowego komórek [12]. Osiągane jest to w ten sposób, że słabsze turgorowe naprężenie rozciągające (podłużne) w grubszych ścianach, jak np. w kolenchymie, jest wzmacniane przez silniejsze, podłużne, rozciągające TS w tej tkance, zaś silne

turgorowe, podłużne naprężenie w cieńszych ścianach komórek mięksiszowych jest nieco zmniejszane przez ściskające, podłużne TS w mięksiszu.

Równowaga statyczna nakłada pewne warunki na siły powodujące TS. Mianowicie, suma rzutów wszystkich sił na każdą płaszczyznę musi być równa zero. W przypadku cylindrycznego organu i sił podłużnych, suma sił podłużnych ściskających musi być równa sumie sił rozciągających: $F(\text{ścisk}) = F(\text{rozciąg})$. Same naprężenia (ściskające i rozciągające) są jednak na ogół nierówne, bowiem powierzchnie przekrojów, na które działają te równe siły przeciwnego znaku, są zwykle różne.

W hypokotylu, podłużne siły rozciągające koncentrują się w epidermie, co powoduje, że podłużne rozciągające TS w tej tkance jest bardzo duże w porównaniu z podłużnym naprężeniem ściskającym w tkankach wewnętrznych. Bezpośrednie pomiary sił zaangażowanych w TS w hypokotylu słonecznika [9] wykazały, że podłużne rozciągające TS w epidermie jest ponad 3 razy większe niż ciśnienie turgorowe, zaś podłużne ściskające TS w wewnętrznej tkance jest mniejsze niż ciśnienie turgorowe (rys. 3). Stosunkowo małe są poprzeczne TS.

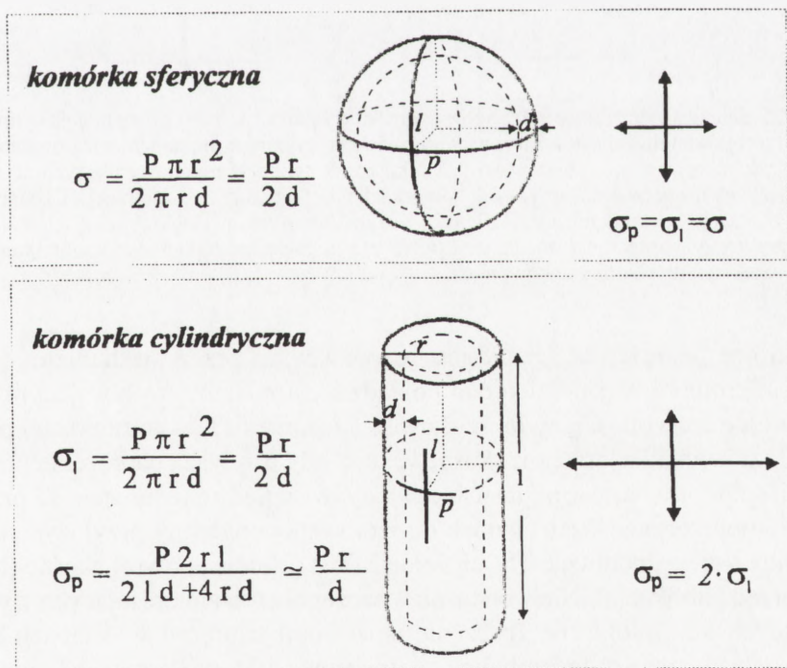
	<i>naprężenie tkankowe</i>	<i>siła F [N]</i>	<i>naprężenie F / S [MN m⁻²]</i>
	<i>podłużne</i>		
	w skórce	+0.35	2.50 rozciągające
	w mięksiszu podstawowym	-0.35	0.15 ściskające
	<i>poprzeczne</i>		
	radialne w mięksiszu		0.43 ściskające
	obwodowe w skórce		0.06 rozciągające

RYSUNEK 3. Naprężenia tkankowe i odpowiadające siły działające w różnych głównych kierunkach hypokotylu słonecznika, którego sok komórkowy miał średnie ciśnienie osmotyczne 0.55 MPa, co formalnie odpowiada 0.55 MN m^{-2} [12]

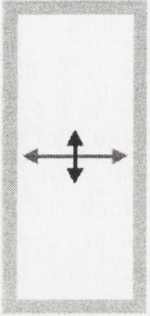
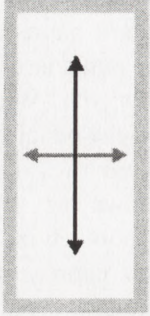
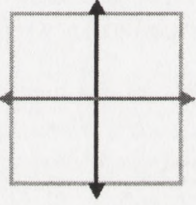
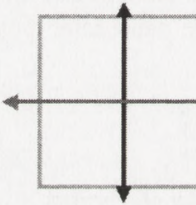
ANIZOTROPIA NAPRĘŻEŃ W ŚCIANACH KOMÓRKOWYCH

Pojęcie anizotropii naprężeń oznacza zróżnicowanie naprężeń w różnych kierunkach w danym punkcie ciała. Charakteryzujemy ją podając stosunki naprężeń w kierunkach głównych. Wiadomo, że anizotropia naprężeń w ścianie komórki w stanie turgoru zależy od jej kształtu; w komórce kulistej naprężenia we wszystkich kierunkach są jednakowe, ale w komórce cylindrycznej, naprężenie w kierunku obwodowym jest dwa razy większe niż w kierunku podłużnym (rys. 4). Tak jest jednak tylko w komórkach izolowanych. W przypadku komórek *in situ* trzeba wziąć pod uwagę również naprężenia tkankowe, które bardzo silnie zależą od kierunku.

Jak już wspomniano, w przypadku epidermy hypokotyla *in situ* mamy podłużne TS trzy razy większe niż turgor i poprzeczne TS, stanowiące ułamek turgoru. Stosunek naprężeń w ścianie komórek epidermy *in situ* ulega więc daleko idącej zmianie w porównaniu ze stanem bez uwzględnienia TS. W izolowanej epidermie mamy dwa razy większe naprężenie poprzeczne niż podłużne, w epidermie *in situ* – odwrotnie (rys. 5).



RYSUNEK 4. Schematy objaśniające zależność stosunku naprężeń głównych (σ_l i σ_p) w ścianie komórkowej od kształtu komórki znajdującej się w stanie ciśnienia turgorowego (P). W przypadku komórki sferycznej wszystkie kierunki są główne

	<i>komórka izolowana</i>	<i>in situ</i>
<i>tkanka peryferyczna</i>	 $1 : 2$	 $> (1 : 1)$
<i>tkanka wewnętrzna</i>	 $1 : 1$	 $< (1 : 1)$

RYSUNEK 5. Schematy ilustrujące anizotropię naprężeń w ścianach komórek dwu tkanek cylindrycznego organu, którego stabilność mechaniczna uwarunkowana jest turgorem, po izolacji z organu i *in situ*. Jedną z tkanek (peryferyczna) zbudowaną jest z komórek cylindrycznych o grubszych ścianach i o mniejszej średnicy niż w izodiametrycznych komórkach drugiej tkanki (wewnętrznej). Ciśnienie turgorowe jest takie samo w obu tkankach, w związku z czym naprężenie w cienkich ścianach izolowanych komórek tkanki wewnętrznej jest stosunkowo duże. *In situ*, naprężenie podłużne w obu tkankach jest takie samo dzięki naprężeniom tkankowym

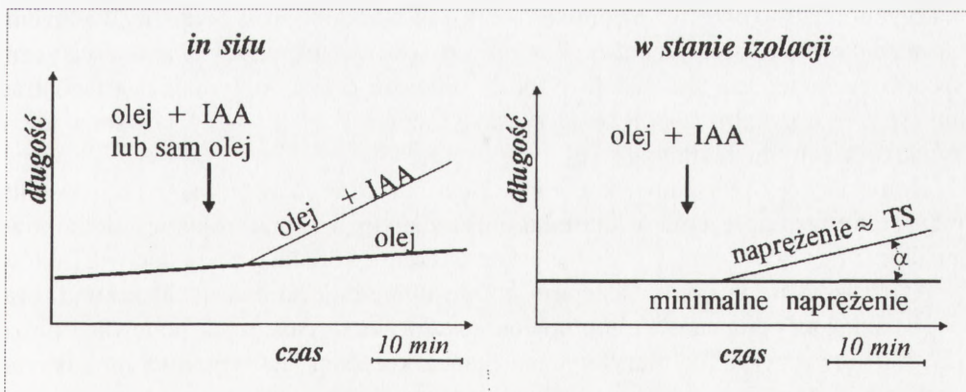
Anizotropia naprężeń w ścianie jest rozpoznawana przez mechanizm sterujący układem mikrotubul w przyściennym pokładzie cytoplazmy, wpływającym z kolei na dalszy bieg rozwoju ściany komórkowej. Ułożenie MT w komórkach epidermy hipokotylu słonecznika jest silnie skośne *in situ*, gdy przeważa naprężenie podłużne, po izolacji epidermy staje się poprzeczne; wtedy ze względu na usunięcie TS przeważa naprężenie poprzeczne. Jeżeli jednak do izolowanej epidermy przyłożyć siłę podłużną kompensującą podłużne TS, ułożenie MT staje się na powrót skośne (badania własne, przed publikacją). Nie wchodząc w szczegóły tych interesujących wyników, wskazujących na biologiczne znaczenie anizotropii naprężeń w ścianach komórkowych, należy przejść do problemu wpływu auksyny na łodygę i korzeń.

WPŁYW AUKSYNY NA WZROST ORGANÓW

Gdy na hypokotyl podziałać auksyną, np. rozpuszczoną w oleju słonecznikowym aby umożliwić jej przenikanie przez kutykulę bez abrazyj (badania własne, niepublikowane), to szybkość wydłużania znacznie wzrasta, kilka minut po podaniu IAA. Jeżeli jednak izolować epidermę, to mimo że pozostaje żywa, a zanurzona w wodzie lub pożywce ma pełen turgor, nie ulega wydłużaniu [7] nawet po podaniu IAA (nieopublikowane). Wiemy, że izolowanie epidermy znosi naprężenia tkankowe. Jeżeli naprężyć izolowaną epidermę tak, aby zastąpić brakujące TS przyłożonym naprężeniem i podać IAA w oleju od strony kutykularnej, to epiderma długostrwale się wydłuża (dane nie publikowane, rys. 6). A więc, auksyna działając na tkankę, która jest na nią wrażliwa, czyli ma receptory dla IAA, a której ściany są pod dostatecznie silnym naprężeniem rozciągającym, powoduje wydłużanie tkanki.

W organach pędowych, takich jak: łodygi, hypokotyle i koleoptyla, tkanka wrażliwa na auksynę jest pod silnym rozciągającym TS, a więc w ścianach jej cylindrycznych komórek dominuje naprężenie podłużne nad poprzecznym.

Można postawić hipotezę, że *podanie auksyny stymuluje szybkość wzrostu w kierunku maksymalnego naprężenia w ścianie tkanki, pod warunkiem, że tkanka ta jest na auksynę wrażliwa*. W pędzie, gdzie wrażliwą jest tkanka peryferyczna z silnym podłużnym, rozciągającym TS, auksyna, podana na powierzchnię organu, stymuluje jego wydłużanie.



RYSUNEK 6. Schematy ilustrujące wyniki badań nad wzrostem (zmianą długości) tkanki peryferycznej hypokotyli słonecznika posmarowanej olejem słonecznikowym zawierającym auksynę (IAA) lub bez niej. Moment posmarowania jest zaznaczony strzałką. Izolowana, żywa tkanka peryferyczna (epiderma +2–3 warstwy miękiszu), znajdowała się na powierzchni 0,5% agaru z pożywką Gamborg V (dwukrotnie rozcieńczoną), kutykulą na zewnątrz, w stanie rozciągania minimalną siłą, ale wystarczającą do zastosowania izotonicznego pomiaru zmiany długości przy pomocy tensometru, względnie siłą dającą naprężenie zbliżone do naprężenia tkankowego (TS) zniesionego przez izolację. Kąt α zależał od wielkości siły (niepublikowane).

Wewnętrzna tkanka tych organów, znacznie słabiej wrażliwa na auksynę (badania własne, niepublikowane) znajduje się w stanie ściskającego TS, a rezultacie, w ścianach komórkowych dominuje naprężenie w kierunku poprzecznym. Ta tkanka po zdjęciu warstwy tkanki peryferycznej, czyli po usunięciu ściskającego TS, rozpręża się stosunkowo szybko podłużnie, pobierając wodę [9,10]. To rozprężanie się można zahamować przez przyłożenie naprężenia ściskającego, równego naprężeniu tkanekowemu [9,10]. Rozprężanie się obranego z warstwy peryferycznej hypokotyla nie zależy od auksyny podanej w roztworze, w którym jest on zanurzony (niepublikowane), prawdopodobnie dlatego, że przebiega zbyt szybko w stosunku do słabej wrażliwości tkanki wewnętrznej na auksynę. Z tych danych można wywnioskować, że *in situ*, po podaniu auksyny, gdy epiderma wydłuża się, wewnętrzna tkanka rozpręża się, czerpiąc wodę za pośrednictwem ksylemu, a hypokotyl wydłuża się jako całość.

A jak jest w korzeniu? W korzeniu rozkład TS jest odwrotny w porównaniu z łodygą: wewnętrzna część jest rozciągana, zaś zewnętrzna jest ściskana. Jest to spowodowane tym, że odmiennie od łodygi, peryferyczna część kory pierwotnej jest zbudowana z większych komórek o cieńszych ścianach niż w tkankach wewnętrznych. Odmiennie niż w łodydze rozmieszczenie TS w korzeniu znane było już w końcu ubiegłego wieku [19], ale uległo zapomnieniu.

Wiadomo, że auksyna hamuje wydłużanie korzenia (przegląd [16]). Panuje podreżnikowy pogląd, że: auksyna występuje w koncentracji suboptymalnej w pędzie, a w koncentracji supraoptymalnej w korzeniu, w związku z czym dodanie auksyny z zewnątrz ma powodować stymulację wzrostu w pędzie ale hamowanie wzrostu w korzeniu. Ale to przecież nieprawda – auksyna hamuje wzrost podłużny w korzeniu ale stymuluje wzrost poprzeczny; korzeń w roztworze auksyny w charakterystyczny sposób grubieje. Już ten fakt falsyfikuje hipotezę o supraoptymalnej koncentracji auksyny w korzeniu, wątpliwości co do słuszności tej hipotezy powstają też w związku z innymi faktami [1,16].

Komórki kory pierwotnej korzenia są cylindryczne, a więc już z racji kształtu mają silniejsze naprężenie w kierunku poprzecznym. Ta anizotropia jest dodatkowo nasiloną przez ściskające TS w peryferycznej tkance korzenia. Na podstawie faktów:

- (i) reakcja na auksynę następuje już po upływie kilkudziesięciu sekund, oraz
- (ii) auksyna podawana krótko powoduje taką samą reakcję jak podawana dłużej [2], możemy przyjąć, że peryferyczna tkanka korzenia jest wrażliwa na auksynę.

Zgodnie z naszą hipotezą, auksyna podana z zewnątrz powinna stymulować wzrost peryferycznej tkanki w kierunku poprzecznym. Tak rzeczywiście jest: zewnętrzna część kory pierwotnej korzenia po podaniu auksyny rośnie w kierunku poprzecznym. Prawdopodobnie, ten wzrost powoduje relaksację ściskającego, podłużnego TS w peryferycznej tkance, co w konsekwencji powoduje spadek rozciągającego, podłużnego TS w wewnętrznej części korzenia, tak że rozciągające

naprężenie ścian w tej części spada poniżej wartości progowej niezbędnej dla wydłużania, i w konsekwencji, wydłużanie korzenia całkowicie ustaje.

Żaden ze znanych faktów dotyczących korzeni nie falsyfikuje hipotezy, że podanie auksyny stymuluje szybkość wzrostu w kierunku maksymalnego naprężenia w ścianie tkanki. W szczególności, maksymalne naprężenie w peryferycznej, wrażliwej na auksynę tkance, działa w kierunku podłużnym w przypadku organów pędowych (łodyga, hypokotyl, koleoptyl), zaś w korzeniu działa w kierunku poprzecznym. Nic więc dziwnego że auksyna stymuluje wydłużanie organów pędowych, a grubienie korzeni. Wiele faktów daje się zrozumieć dopiero na podstawie tej hipotezy; auksyna podana do wnętrza strefy wydłużania korzenia nie wywiera hamującego wpływu [3], usunięcie auksyny z pożywki przywraca szybsze wydłużanie ze zwłoką, która jest dłuższa przy krótszym czasie działania auksyną [2].

Hipoteza, że podanie auksyny stymuluje szybkość wzrostu w kierunku maksymalnego naprężenia w ścianach komórek tkanki wrażliwej na auksynę, jest przedstawiona w niniejszym artykule po raz pierwszy. Trzeba przeprowadzić szereg eksperymentów, aby sprawdzić przewidywania zrobione na jej podstawie.

LITERATURA

- [1] BURSTÖR M HG. Influence of the tonic effect of gravireaction and auxin on cell elongation and polarity in roots. *Amer J Bot* 1969; **56**: 679–684.
- [2] HEJNOWICZ Z, ERICKSON RO. Growth inhibition and recovery in roots following temporary treatment with auxin. *Physiol Plant* 1968; **21**: 302–313.
- [3] HEJNOWICZ Z. Studies on the inhibitory action of auxin on root growth. *Acta Soc Bot Pol* 1968; **37**: 451–460.
- [4] HEJNOWICZ Z. Trajectories of principal directions of growth, natural coordinate system in growing plant organ. *Acta Soc Bot Pol* 1984; **53**: 29–42.
- [5] HEJNOWICZ Z, ROMBERGER JA. Growth tensor of plant organs. *J Theor Biol* 1986; **121**: 59–71.
- [6] HEJNOWICZ Z. Differential growth resulting in the specification of different types of cellular architecture in root meristems. *Environ Exp Bot* 1989; **29**: 85–93.
- [7] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue tension – a factor in the regulation of cell wall growth. [w] Masuda Y [red.] *Plant Cell Walls as Biopolymers with Physiological Functions* Osaka. Yamada Science Foundation 1992: 67–72.
- [8] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue stresses in organs of herbaceous plants I. Poisson ratios of tissues and their role in determination of the stresses. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1035–1043
- [9] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue stresses in organs of herbaceous plants II. Determination in three dimensions in the hypocotyl of sunflower. *J Exp Bot* 1995; **46**: 1045–1053.
- [10] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue stresses in organs of herbaceous plants III. Elastic properties of the tissues of sunflower hypocotyl and origin of tissue stresses. *J Exp Bot* 1996; **47**: 519–528.
- [11] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Tissue stresses and their graviresponsive changes in stems of *Reynoutria japonica* Houtt. *J Plant Physiol* 1996; **149**: 91–101.

- [12] HEJNOWICZ Z. Graviresponses in herbs and trees: a major role for the redistribution of tissue and growth stresses. *Planta* 1997; **203**: S136–146.
- [13] HEJNOWICZ Z. Siły i naprężenia mechaniczne we wrzecionie mitotycznym; ich rolę w rozdzielaniu chromosomów. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 404–428.
- [14] INGBER DE, DIKE L, HANSEN L, KARP S, LILEY H, MANIOTIS A, McNAMEE H, MOONEY D, PLOPPER G, SIMS J, WANG N. Cellular tensegrity: Exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int Rev Cytol* 1994; **150**: 173–224.
- [15] KUTSCHERA U. Tissue stresses in growing plant organs. *Physiol Plant* 1989; **77**: 157–163.
- [16] LÜTHEN H, CLAUSSEN M, BÖTTGER M. Growth: progress in auxin research. *Progress in Bot* 1999; **60**: 315–340.
- [17] LYNCH TM, LINTILHAC PM. Mechanical signals in plant development: a new method for single cell studies. *Developmental Biol* 1997; **181**: 246–256.
- [18] PETERS WS, TOMOS AD The history of tissue tension. *Ann Bot* 1996; **77**: 657–665.
- [19] POLLOCK JB. The mechanism of root curvature. *Bot Gaz* 1900; **29**:1–63.

Adres autora:

ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

ZMIANY METYLACJI CYTOZYNY PODCZAS RÓŻNICOWANIA KOMÓREK U ROŚLIN

CHANGES IN CYTOSINE METHYLATION DURING PLANT CELL DIFFERENTIATION

Maria J. OLSZEWSKA

Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

Streszczenie: Znaczna część genomu jądrowego roślin składa się z niekodujących, rozproszonych sekwencji powtarzalnych, zawierających pasożytnicze elementy ruchome, głównie retranspozony, których metylacja zapobiega transkrypcji zawartych w nich genów, obcych dla rośliny. U roślin poziom metylacji cytozyny jest charakterystyczny dla poszczególnych tkanek i organów. Najniższy poziom metylacji występuje w merystemie korzeniowym, we wczesnych stadiach rozwoju bielma i w młodych liściach siewek; najwyższy – w starzejących się liściach. Tkankowo-specyficzna ekspresja genów, kodujących białka zapasowe w bielmie i liścieniach rozwijających się nasion poprzedzona jest demetylacją. Również ekspresja rDNA jest regulowana przez demetylację/metylację cytozyny i jej nasilenie jest charakterystyczne dla poszczególnych tkanek. Indukowana demetylacja i mutacje w obrębie genów związanych z metylacją cytozyny powodują zakłócenia morfogenezy.

(Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 83–93)

Słowa kluczowe: metylacja cytozyny, różnicowanie komórek, rośliny

Summary: The main part of a plant genome is composed of non-coding repetitive dispersed sequences which contain retrotransposons. DNA methylation is considered to operate as genome defense system against these parasitic mobile elements. In plants the level of cytosine methylation is tissue- and organ specific. The lowest methylation levels are found in root meristem, in endosperm at early stages of development and in young leaves of seedlings, while the highest – in aging leaves. Tissue-specific expression of genes coding for storage protein is preceded by cytosine demethylation. Transcription of rDNA is also regulated by cytosine demethylation/methylation and its intensity is tissue-specific. Induced demethylation and mutation of genes involved in cytosine methylation result in a variety of developmental abnormalities.

(Advances in Cell Biology 1999; Supl. 13: 83–93)

Key words: cytosine methylation, cell differentiation, plants

WSTĘP

W DNA jądrowym powszechnie zachodzi metylacja cytozyny w pozycji 5.; tak zmodyfikowana zasada nazywana jest 5-metylocytozyną – m^5C . Istnieje wiele danych wskazujących, że metylacja cytozyny w obszarze promotora i/lub sekwencji kodującej jest procesem odwracalnym (por. niżej), wobec czego można oczekiwać, że zawartość m^5C jest różna w różnych komórkach i tkankach.

W DNA jądrowym u roślin metylacja cytozyny zachodzi bądź w układach dinukleotydu CpG, bądź (w przeciwieństwie do zwierząt) – w trinukleotydu CpXpG, gdzie X jest dowolną zasadą. Ostatnio wykazano, że metylacja cytozyny u roślin może zachodzić w innych niż CpXpG trinukleotydu, przy czym metylacji ulega tylko cytozyna w pozycji 5' [12, 26]. Sekwencje CpG i CpXpG mogą być zebrane w grupy w odcinkach DNA o długości około 1000 pz, tworząc tzw. wyspy, oddzielone odcinkami o długości ok. 100 tys. pz (ref. [11, 30, 44]).

W jądrach merystemów korzeniowych zawartość m^5C zwiększa się proporcjonalnie do rozmiarów genomu, tj. ilości 2C DNA (ref. [29]) oraz do zawartości GC u danego gatunku [22, 24], przy czym procent niezmetylowanej cytozyny pozostaje na zbliżonym poziomie. Metylacja cytozyny w trinukleotydu CpXpG jest wysoka u gatunków bogatych w AT; większe nasilenie metylacji ma miejsce w CAG niż w CCG [18].

W zwiększeniu rozmiarów genomów (2C DNA w pg lub Mpz) u roślin decydujący udział ma ich wzbogacenie w rozproszone sekwencje powtarzalne. Ich część stanowią retrotranspozony, które uległy integracji z roślinnym DNA (ref. [29]). Metylacja cytozyny w tych ruchomych pasożytniczych elementach sprawia, że są one nieaktywne transkrypcyjnie [2]. U *Brassica napus* retrotranspozony wchodzące w skład krótkich rozproszonych sekwencji powtarzalnych (SINEs) zawierają m^5C nie tylko w obszarach aktywnych transkrypcyjnie, a poziom metylacji tych sekwencji dwukrotnie przekracza poziom metylacji całkowitego DNA [12]. Metylacja zachodzi głównie w CpG (87%), także w CpXpG; w nieznacznym stopniu (5,3%) w nowo rozpoznanym miejscu, jakim są trinukleotydy Cp(A/T)pA, w którym cytozyna ulega metylacji również poza retrotranspozonomi [12].

Metylacja cytozyny jest wynikiem postreplikacyjnej modyfikacji DNA i zachodzi z udziałem metylotransferaz DNA, a dawcą grup metylowych jest S-adenozylometionina (SAM, ref. [11, 30, 44]). Niezmetylowany DNA może ulegać metylacji *de novo*; po następnym cyklu replikacyjnym, przy braku metylacji nici potomnej, powstaje tzw. hemimetylowany DNA; jest to demetylacja zachowawcza (pasywna). Istnieje również aktywny proces demetylacji, prawdopodobnie oparty na mechanizmie naprawy DNA [35]. W wyniku nierównowagi między metylacją a demetylacją następuje zmiana zawartości m^5C , w rezultacie czego powstaje wzór metylacji charakterystyczny dla poszczególnych komórek i tkanek. Indukowaną

demetylację przeprowadza się działając 5-azacytydyną (5-azaC); ten analog cytydyny jest niekompetencyjnym inhibitorem metylaz DNA (ref. [11, 30, 44]).

Wysoki poziom metylacji sprawia, że chromatyna ulega znacznej kondensacji (ref. [11]); jest to spowodowane przez wzmożone wiązanie histonu H1 [1], co z kolei hamuje transkrypcję ([15], ref. [11]) i związane jest z obniżeniem wrażliwości DNA na DNazę I (ref. [17]).

Najczęściej stosowane metody biochemiczne badania poziomu metylacji cytozyny – HPLC i analiza restrykcyjna DNA z zastosowaniem enzymów wrażliwych na metylację cytozyny i hybrydyzacji typu Southern zostały omówione wcześniej [30]. Nick-translacja *in situ* z użyciem tego rodzaju enzymów restrykcyjnych i znakowania ^3H TTP jest techniką cytochemiczną umożliwiającą uzyskiwanie porównawczych wyników ilościowych, przy czym im wyższa jest liczba ziaren srebra w autoradiogramach, tym niższy jest poziom metylacji [28]. Również częściowo ilościowe dane *in situ* uzyskuje się z badań immunocytochemicznych z użyciem przeciwciała przeciwko $^{\text{m}5}\text{C}$ [27].

POZIOM METYLACJI CYTOZYN W RÓŻNYCH ORGANACH I TKANKACH ROŚLIN

Wyniki dotyczące poziomu metylacji DNA, uzyskane metodą HPLC, obliczone wg wzoru

$$\frac{\text{m}^5\text{dC}}{\text{DC} + \text{m}^5\text{dC}} \times 100$$

przedstawione są w tabeli 1. Z danych tych wynika, że młode siewki, merystemy korzeniowe, młode liście siewek oraz rozwijające się bielmo wykazują najniższy poziom metylacji, natomiast w liściach w miarę starzenia ilość $^{\text{m}5}\text{C}$ zwiększa się, osiągając najwyższą zawartość zmetylowanej cytozyny w końcowej fazie. Różnice we wzorze restrykcyjnym DNA trawionego enzymami wrażliwymi na metylację cytozyny wskazują, że u *Corylus avellana* (leszczyna) poziom metylacji jest niższy w liściach młodych niż w zaawansowanych w rozwoju [8]. Jest prawdopodobne, że wzmożona metylacja cytozyny towarzyszy starzeniu się organów roślinnych [7], a także bielma [6]. Dodatkowym dowodem świadczącym o niskim poziomie metylacji komórek merystematycznych są wyniki uzyskane z kultur zawieszinowych marchwi: w komórkach merystematycznych, niezakuolizowanych, wynosi on 22,1%, zaś w komórkach zróżnicowanych, silnie zakuolizowanych – 25,4% [33].

TABELA 1. Poziom metylacji DNA [%] w różnych organach roślin

Organ	Gatunek			
	<i>Solanum lycopersicum</i> (pomidor)	<i>Daucus carota</i> (marchew)	<i>Haemanthus katharinae</i> (krasnokwiat)	<i>Vicia faba</i> ssp. <i>minor</i> (bobik)
Nasiona	27,4			
Młode siewki	20–21			
Merystem			39,6	25,9
korzeniowy				
Korzeń		23,1		26,6
Korzeń zapasowy		17,8		
Pąk szczytowy				26,5
Pierwsze liście				22,9
Młode liście		18,5		28,8
Stare liście	25,0	24,0	44,3	30,7
Liścienie		17,0		31,0
Hypokotyl		21,5		
Bielmo w młodych nasionach			37,0	
Ziarna pyłku		23,0		
Autorzy	[23]	[33]	[39]	[17]

Radioaktywna nick-translacja *in situ* z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego HhaI (GCG/C, nie rozcina on tej sekwencji, jeśli zmetylowana jest pierwsza cytozyna) wykazała najniższy poziom metylacji DNA w jądrach bielma z rozwijających się nasion *Haemanthus katharinae* (liczba ziaren/100 μm^2 powierzchni jąder – $40,6 \pm 1,5$), pośredni – w merystemie korzeniowym ($23,3 \pm 0,8$) i najwyższy w dojrzałych liściach ($9,8 \pm 0,5$). Rezultaty te są zgodne zarówno z wynikiem trawienia izolowanego DNA enzymem HhaI, jak i z danymi z HPLC (por. tab. 1 [39]). Analogicznie, wrażliwość DNA na trawienie DNazą I, odwrotnie proporcjonalna do zawartości $^{\text{m}}\text{C}$, została wykazana zarówno cytofotometrycznie poprzez pomiar ubytku DNA, jak i metodą nick-translacji *in situ* z zastosowaniem DNazy I w różnych organach i tkankach *Vicia faba* [17].

METYLACJA CYTOZYNY I EKSPRESJA GENÓW

Liczne badania przeprowadzone u *Pro-* i *Eukaryota* dowiodły, że ekspresja większości genów uwarunkowana jest demetylacją cytozyny zarówno w obszarze promotorów, jak i sekwencji kodujących (ref. [30, 44]). Posługując się białkiem MeCP1,

wiążącym się z m^5C (którego wiązanie uznano za analogiczne do wiązania czynników transkrypcyjnych), zaproponowano [4], że regulacja transkrypcji przez metylację zależy od bliskiego położenia m^5C przy promotorze, gęstości rozmieszczenia m^5C (tj. skupienia w wyspy lub rozproszonej ich lokalizacji) i mocy promotora. Przy braku metylacji, transkrypcja zachodzi zarówno przy słabym, jak i silnym promotorze, niezależnie od zagęszczenia CpG. Przy słabym promotorze i metylacji cytozyny transkrypcja nie następuje, również niezależnie od gęstości rozmieszczenia m^5CpG . Przy silnym promotorze i metylacji cytozyny transkrypcja ma miejsce tylko, jeżeli m^5C są rozproszone; przy dużym zagęszczeniu, tj. skupieniu m^5C w wyspy, transkrypcja nie zachodzi [4]. Z danych tych wynika, że zależność demetylacja cytozyny ekspresja genu odnosi się tylko do określonej budowy molekularnej promotora i części kodującej. Ponadto koncepcja ta wydaje się wyjaśniać sytuację, w której transkrypcja jest realizowana mimo obecności w genach m^5C .

Ekspresja genów tkankowo-specyficznych

Zależność demetylacja ekspresja genów u roślin była badana w tych tkankach, w których należało oczekiwać syntezy tkankowo-specyficznych białek. Taka sytuacja ma miejsce w bielmie i liścieniach dojrzewających nasion, w których są syntetyzowane białka zapasowe, a także w owocach, których dojrzewaniu towarzyszy spontaniczna maceracja tkanki miękkiszowej. U wszystkich zbadanych dotąd gatunków w odniesieniu do wybranych białek zapasowych stwierdzono demetylację kodujących je genów w bielmie lub w liścieniach, podczas gdy w innych częściach roślin (najczęściej liście) te sekwencje DNA zawierały cytozynę zmetylowaną (tab. 2). Demetylacja takich genów następowała zanim jeszcze był wykrywalny produkt transkrypcji [3]. Należy przypomnieć, że bielmo w rozwijających się nasionach jest tkanką o najniższym poziomie metylacji (por. tab. 1). W owocach pomidora, mimo że metodą HPLC nie wykazano różnic w poziomie metylacji między stadium zielonym i dojrzałym, czerwonym [13], w okresie dojrzewania następuje demetylacja sekwencji DNA zawierających geny kodujące celulazę i poligalakturonidazę, tj. enzymy degradujące ścianę komórkową i blaszkę środkową (tab. 2). Również w dojrzewających owocach pomidora, podczas przekształcania chloroplastów w chromoplasty, następuje demetylacja tych genów znajdujących się w plastydach, które ulegają ekspresji w chromoplastach (tab. 2).

rDNA

Geny kodujące rRNA są genami metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*). Ich ekspresja jest różnaita i zależy od rodzaju tkanki. Od dawna wiadomo, że w tkankach realizujących cykl komórkowy, intensywnie syntetyzujących białka (np. merystemy, wczesne stadia rozwoju zarodka, bielma i liścieni w rozwijających

TABELA 2. Przykłady specyficznej demetylacji genów podczas ich tkankowo-specyficznej ekspresji

Gatunek	Tkanka/Organ specyficzne dla ekspresji	Białko	Metylacja tych samych sekwencji w innych organach/tkankach	Autorzy
<i>Zea mays</i> (kukurydza)	bielmo w rozwijających się nasionach	zeiny i gluteliny	zmetylowane	[3,21]
<i>Phaseolus vulgaris</i> (fasola)	liścienie w rozwijających się nasionach	fitohemaglutyniny	zmetylowane	[36]
<i>Hordeum vulgare</i> (jęczmień)	bielmo w rozwijających się nasionach	B-hordeina	zmetyl. u mutantu lys3a (nie synt. B-hordeiny) w liściach formy	ref. [41]
<i>Glycine max</i> (soja)	liścienie w rozwijających się nasionach	glicynina, lektyna		[9]
<i>Solanum lycopersicum</i> (pomidor)	dojrzewające owoce	celulaza, poligalakturonidaza		[13]
		geny ulegające ekspresji w chromoplastach	zmetylowane w liściach	[25]

się nasionach) jąderka są znacznych rozmiarów, kilkakrotnie większe niż w tkankach stałych, charakteryzujących się niskim poziomem translacji. Następnie wykazano, że rozmiary jąderek zależą od aktywności transkrypcyjnej rDNA, która z kolei jest skorelowana z metylacją w obszarze sekwencji kodujących, a przede wszystkim – w obszarze promotora (ref. [31, 38]) i nietranskrybowanych sekwencji międzygenowych (NTS – *Non-Transcribed Intergenic Spacers* [10, 40]).

Obniżona ekspresja rDNA w ponadmerystematycznych strefach korzenia wyraża się, w porównaniu ze strefą merystematyczną, zmniejszonymi rozmiarami jąderek, redukcją włączania ^3H urydyny oraz słabym zabarwieniem po wysrebrzeniu metodą AgNOR (miernik ekspresji rDNA). Po demetylacji indukowanej 5-azaC następuje obniżenie poziomu metylacji całkowitego DNA z 26,9% do 23,2%, demetylacja w części kodującej rDNA i przywrócenie jego ekspresji (mierzonej włączaniem ^3H urydyny i wysrebrzaniu metodą AgNOR) nawet powyżej poziomu stwierdzonego w strefie merystematycznej [31].

W wyniku zwielokrotnienia zawartości DNA jądrowego drogą endoreplikacji, mimo proporcjonalnego zwiększenia liczby sekwencji rDNA, jego ekspresja po-

zostaje na bardzo niskim poziomie w liściach, liścieniach i hipokotylu siedmiodniowych siewek łubinu żółtego w porównaniu z merystemem korzeniowym. Wprawdzie metylacja cytozyny części kodującej rDNA nie jest wyższa niż w strefie merystematycznej, ale znaczna część nieaktywnego rDNA ulega wmontowaniu do heterochromatyny przyjąderkowej [38], co jest znanym mechanizmem redukującym aktywność transkrypcyjną tych genów [9, 14].

METYLACJA CYTOZYNY PODCZAS ROZWOJU MĘSKIEJ LINII GENERATYWNEJ

Różnicowanie plemników u glonu *Chara vulgaris*

Dogodnym obiektem do zbadania zależności między spermatogenezą a metylacją cytozyny są nici spermatogeniczne ramienicy *Chara vulgaris*. Rozwijają się one z komórki macierzystej w wyniku synchronicznie przebiegających podziałów mitotycznych, przy czym po każdym podziale następuje ograniczenie wzrostu komórek potomnych, postępująca kondensacja chromatyny oraz stopniowa redukcja aktywności transkrypcyjnej i translacyjnej. Z komórek nici 64-komórkowej różnicują się spermatozoidy, które na etapie dojrzałości zawierają jądra o chromatynie całkowicie skondensowanej. Wyniki nick-translacji *in situ* z zastosowaniem ^3H TTP i trzech enzymów restrykcyjnych wrażliwych na metylację cytozyny wykazały, że w okresie podziałów komórkowych zachodzi stopniowe zwiększenie metylacji cytozyny, osiągające poziom dwukrotnie większy w niciach 32-komórkowych niż w niciach 4-komórkowych, tj. po 3 podziałach mitotycznych [32]. We wczesnych stadiach różnicowania plemników, kiedy następują kluczowe przemiany związane z przekształcaniem spermatyd w spermatozoidy [19], następuje krótkotrwałe obniżenie metylacji cytozyny, po czym znów zwiększenie, w wyniku którego pod koniec procesu spermatogenezy metylacja osiąga maksymalny poziom [32] w całym cyklu rozwojowym nici spermatogenicznych. Przytoczony przykład jest kolejnym dowodem wskazującym na współzależność kondensacji chromatyny, jej aktywności transkrypcyjnej i poziomu metylacji cytozyny.

Różnicowanie jądra wegetatywnego i generatywnego u roślin okrytozalążkowych

Rozwój gametofitu męskiego u roślin okrytozalążkowych rozpoczyna się od podziału haploidalnego jądra mikrospory. Powstają dwie komórki znacznie różniące się rozmiarami: większa wegetatywna i mniejsza generatywna, z której po następnym podziale powstaną dwie komórki plemnikowe. Początkowo, wkrótce po pierwszym podziale, jądra komórki wegetatywnej i generatywnej nie różnią się od siebie pod

względem poziomu metylacji cytozyny, ocenianej nasileniem fluorescencji po inkubacji z przeciwciałem przeciwko m^5C [27]. Wkrótce jednak intensywność sygnału fluorescencyjnego w jądrze generatywnym ulega redukcji, natomiast w jądrze wegetatywnym – zwiększa się; tuż przed kiełkowaniem ziarna pyłku poziom metylacji jądra wegetatywnego jest pięciokrotnie większy niż w jądrze generatywnym. W badanym obiekcie, tj. u tytoniu, wkrótce po pojawieniu się łagiewki pyłkowej, silnie skondensowane jądro wegetatywne ulega fragmentacji [27]. Jest to przykład hypermetylacji poprzedzającej starzenie się i śmierć jądra w związku z jego bezużytecznością biologiczną.

MORFOGENEZA I METYLACJA CYTOZYN

O kluczowej roli odpowiedniego zasobu m^5C w genomie dla prawidłowego przebiegu morfogenezy świadczą wyniki eksperymentów z demetylacją indukowaną przez 5-azaC oraz przez antysensowy mRNA wobec mRNA kodującego metylotransferazy DNA, a także przebieg morfogenezy u mutantów z uszkodzonym genem kodującym ten enzym.

U *Arabidopsis thaliana* i *Thlaspi arvense*, poddanych działaniu 5-azaC, następuje znaczna redukcja zawartości m^5C (stwierdzona metodą HPLC). Rośliny z obniżonym poziomem metylacji, podobnie jak osobniki chłodzone (jarowizowane) zakwitwały wcześniej niż rośliny kontrolne. Wydaje się zatem, że demetylacja umożliwia transkrypcję genów kluczowych dla kontroli kwitnienia [5].

Podanie antysensowego mRNA wobec mRNA kodującego metylotransferazę DNA blokuje translację, w wyniku czego u *Arabidopsis thaliana* następuje spadek zawartości m^5C z 6,4% u roślin kontrolnych do 1,8% u roślin poddanych działaniu antysensowego mRNA (pomiar metodą HPLC). U roślin z obniżoną zawartością m^5C występowały zakłócenia w morfogenezie: powstawało znacznie więcej liści zarówno w stadium rozety, jak i na łodygach oraz pojawiały się zaburzenia w morfologii kwiatów – zamiast płatków korony powstawały liczne pręciki lub odwrotnie – kwiaty zawierały tylko znaczną liczbę (zamiast 4) płatków korony [34, 37].

U *Arabidopsis thaliana* zakłócenia morfogenezy następowały również u osobników, w których mutacja dotyczyła prawdopodobnie genu kodującego czynnik pośrednio uczestniczący w procesie metylacji, w wyniku czego nastąpiło obniżenie metylacji cytozyny o około 70% w porównaniu z formą dziką. Mutacja ta wywołała niewielkie zmiany kształtu liści i opóźnienie kwitnienia oraz zwiększenie liczby liści na pędzie kwiatostanowym [16, 42].

Warto przypomnieć, że mutacja genu metylotransferazy DNA (obniżenie metylacji cytozyny o około 70%) jest u myszy letalna *in vivo* – zwierzęta giną we

wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, natomiast mutacja ta nie wpływa na żywotność i proliferację linii zarodkowej *in vitro* [20].

PODSUMOWANIE

W genomie roślin przeważająca ilość m^5C wydaje się występować w niekodujących, rozproszonych sekwencjach powtarzalnych, stanowiących główny składnik genomowego DNA – do 99%. Sekwencje te powstają m.in. w wyniku integracji retrotranspozonów z genomem roślinnym; metylacja takich sekwencji zapobiega ekspresji genów znajdujących się w retrotranspozonach. Frakcja DNA zawierająca roślinną informację genetyczną stanowi niewielką część genomu. Niezależnie od rozmiarów genomu liczba sekwencji kodujących białka u roślin okrytozalążkowych jest oceniana na około 30 tysięcy, a liczba powtarzalnych sekwencji kodujących RNA nie ulegających translacji (rDNA, 5SrDNA i tDNA) jest rzędu kilkunastu tysięcy. Wynika stąd, że pula sekwencji kodujących, których ekspresja może być regulowana przez demetylację/metylację cytozyny, jest u roślin niewielka w porównaniu z całkowitą zawartością DNA, tj. rozmiarami genomu.

Charakterystyczny dla poszczególnych tkanek i organów poziom metylacji cytozyny oraz dramatyczne skutki indukowanej demetylacji, obejmującej również niekodujące sekwencje powtarzalne [31, 43], jak również mutacje powodujących uszkodzenie metylacji cytozyny, polegające na zakłóceniach morfogenezy wskazują, że dla prawidłowego wzrostu i różnicowania komórek niezbędne jest utrzymanie określonej zawartości cytozyny w stanie zmetylowanym. Ponadto metylacja cytozyny w DNA roślin wydaje się być procesem związanym ze starzeniem i rozpadem jąder komórkowych.

LITERATURA

- [1] ADAMS RLP. Eucaryotic DNA methyltransferases: structure and function. *BioEssays* 1995; **17**: 139–145.
- [2] BESTOR TH, TYCKO B. Creation of genomic methylation patterns. *Nature Genetics* 1996; **12**: 363–367.
- [3] BIANCHI MW, VIOTTI A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes in maize. *Plant Mol Biol* 1988; **11**: 203–214.
- [4] BIRHD A. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992; **70**: 5–8.
- [5] BURN JE, BAGNALL DJ, METZGER JD, DENNIS ES, PEACOCK WJ. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci* 1993; **90**: 287–291.
- [6] BUŽEK J, EBERT I, RUFFINI-CASTIGLIONE M, ŠIROKY J, VYSKOT B, GREIHUBER J. Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei in *Gagea lutea* (Liliaceae). *Planta* 1998; **204**: 506–514.

- [7] DEMEULEMEESTER MAC, VAN STALLEN N, DE PROFF MP. Degree of DNA methylation in chicory (*Cichorium intybus* L): influence of plant age and vernalization. *Plant Sci* 1999; **142**: 101–108.
- [8] DIAZ-SALA C, REY M, BORONAT A, BESFORD R, RODRIGUEZ R. Variations in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Coryllus avellana* L.) associated with sequential *in vitro* subcultures. *Plant Cell Rep* 1995; **15**: 218–221.
- [9] FINNEGAN EJ, BRETTEL R, DENNIS E. The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression [w] Jost JP, Saluz HR, [red.] DNA Methylation; Molecular and Biological Significance. Basel, Boston, Berlin, Birkhauser Verlag 1993: 219–261.
- [10] FLAVELL RB, ODELL M, SARDANAR, JACKSON S. Regulatory DNA of ribosomal genes and control of nucleolus organizer activity in wheat. *Crop Sci* 1993; **85**: 889–894.
- [11] FRONK J. Udział metylacji DNA w regulowaniu transkrypcji u eukariontów. *Post Biol Kom* 1996; **23**, supl. 7: 15–26.
- [12] GOUBELY C, ARNAUD P, TATOUT C, HARRISON G, HESLOP-HARRISON JS, DERAGON J-M. SI SINE retroelements are methylated of Symmetrical and non-symmetrical positions in *Brassica napus*: identification of a new methylation site in plants. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 243–255.
- [13] HADFIELD KA, DANDEKAR AM, ROMANI RJ. Demethylation of ripening specific genes in tomato fruit. *Plant Sci* 1993; **92**: 13–18.
- [14] HIGHETT MJ, RAWLINS DJ, SHAW PJ. Different patterns of rDNA distribution in *Pisum sativum* nucleoli correlate with different level of nucleolar activity. *J Cell Sci* 1993; **104**: 843–852.
- [15] HIGURASHI M, COLE RD. The combination of DNA methylation and H1 histone binding inhibits the action of restriction nuclease in plasmid DNA. *J Biol Chem* 1991; **266**: 8619–8625.
- [16] KAKUTANI T, JEDDELOH JA, RICHARDS EJ. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucl Acid Res* 1995; **23**: 130–137.
- [17] KAŻMIERCZAK J. Effect of DNA methylation on potential transcriptional activity in different tissues and organs of *Vicia faba* ssp. *minor*. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; **36**: 45–49.
- [18] KOVAŘIK A, MATYÁŠEK R, LEITCH A, GAZDOVÁ B, FULNEČEK J, BEZDŮK M. Variability in CpNpG methylation in higher plant genomes. *Gene* 1997; **204**: 25–33.
- [19] KWIATKOWSKA M. Changes in ultrastructure of cytoplasm and nucleus during spermiogenesis in *Chara vulgaris*. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**: 41–56.
- [20] LI E, BESTOR TH, JAEMISCH R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase results in embryogenic lethality. *Cell* 1992; **69**: 915–916.
- [21] LUND G, CICERI P, VIOTTI A. Maternal-specific demethylation and expression of specific alleles of zein genes in the endosperm of *Zea mays*. *Plant J* 1995; **8**: 571–581.
- [22] MATASSI G, MELIS R, KUO KC, MACAYA G, GEHRKE CW, BERNARDI G. Large-scale methylation patterns in the nuclear genomes of plants. *Gene* 1992; **122**: 239–245.
- [23] MESSENGUER R, MARTIN WG, STEFFENS JC, TANKSLEY SD. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 753–770.
- [24] MONTERO LM, FILIPSKI J, GIL P, CAPEL J, MARTINEZ-ZAPATER JM, SALINAS J. The distribution of 5-methyl-cytosine in the nuclear genome of plants. *Nucl Acid Res* 1992; **20**: 3207–3210.
- [25] NGERNPARASITIRTISIRI J, KOBAYASHI H, AKAZAWA T. DNA methylation occurred around lowly expressed genes of plastid DNA during tomato fruit development. *Plant Physiol* 1988; **88**: 16–20.
- [26] OAKLEY EJ, JOST JP. Non-symmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 927–930.
- [27] OAKLEY EJ, PODESTA A, JOST JP. Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc Natl Acad Sci* 1997; **94**: 11721–11725.

- [28] OLSZEWSKA MJ. *In situ* targeting by restriction: a critical evaluation [w] Małuszyńska J [red.] Plant Cyto genetics. Katowice: Prace Naukowe Univ. Śląskiego nr 1696, 1998: 31–38.
- [29] OLSZEWSKA MJ, MAŁUSZYŃSKA J. Budowa genomu jądrowego. [w] Olszewska MJ [red.] Podstawy cytogenetyki roślin. Warszawa: Wyd. Naukowe PWN 1999: 11–23.
- [30] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T. Metylacja DNA u roślin. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 253–262.
- [31] OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T, KAŻMIERCZAK J, ŁUCHNIAK P. Enhanced nucleolar parameters in *Vicia faba* L. induced by 5-azacytidine may be only partly attributed to DNA demethylation. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; **35**: 185–192.
- [32] OLSZEWSKA MJ, GERNAND D, GODLEWSKI M, KUNACHOWICZ DNA methylation during antheridial filaments development and spermiogenesis in *Chara vulgaris* (Charophyceae) analysed by *in situ* nick-translation driven by methylation-sensitive restriction enzymes. *Eur J Phycol* 1997; **32**: 287–291.
- [33] PALMGREN G, MATTSON O, OKKELS FT. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines and cell types of *Daucus carota*. *Plant Physiol* 1991; **95**: 174–178.
- [34] PENNISI E. Chemical shackles of genes? *Science* 1996; **273**: 574–575.
- [35] RAZIN A, KAFRI T. DNA methylation from embryo to adult. *Progr. Nucl Acid Res Mol Biol* 1994; **48**: 53–81.
- [36] RIGGS CD, CHRISPEELS MJ. The expression of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* is associated with organ-specific DNA methylation patterns. *Plant Mol Biol* 1990; **14**: 629–632.
- [37] RONEMUS MJ, GRALBIATI M, TICKNOR C, CHEN J, DELLAPORTA S. Demethylation induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science* 1996; **273**: 654–656.
- [38] SAKOWICZ T, OLSZEWSKA MJ. DNA content, interphase AgNOR-area, number of ³HrDNA hybridization signals and the methylation level in coding rDNA sequence in different organs of *Lupinus luteus* L. *Genetica* 1997; **99**: 67–72.
- [39] SAKOWICZ T, OLSZEWSKA MJ, ŁUCHNIAK P, KAŻMIERCZAK J. Tissue-specific DNA methylation in *Haemanthus katharinae* Bak. (Amaryllidaceae). *Acta Soc Bot Pol* 1998; **67**: 175–180.
- [40] SARDANA R, ODELL M, FLAVELL R. Correlation between the size of the intergenic regulatory region, the status of cytosine methylation of rRNA genes and nucleolar expression in wheat. *Mol Gen Genet* 1993; **236**: 155–162.
- [41] SØRENSEN MB. Methylation of B-hordein in barley endosperm is inversely correlated with gene activity and affected by the regulatory gene *Lys 3*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4119–4123.
- [42] VONGS A, KAKUTANI T, MARTIENSEN RA, RICHARDS EJ. *Arabidopsis thaliana* DNA methylation mutants. *Science* 1993; **260**: 1926–1928.
- [43] VYSKOT B, KOUKALOVÁ B, KOVAŘIK A, SACHAMBULA L, RAYNOLDS D, BEZDĚK M. Meiotic transmission of a hypomethylated repetitive DNA family in tobacco. *Theor Appl Genet* 1995; **91**: 659–664.
- [44] WÓJCIK C. Znaczenie metylacji DNA u eukariontów. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 3–23.

Adres autora:

Banacha 12/16, 90-237 Łódź

MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA SYGNAŁÓW W OBREMBIE KOMÓREK I CAŁYCH ROŚLIN*

MECHANISMS OF SIGNAL TRANSMISSION WITHIN CELLS AND WHOLE PLANTS

Kazimierz TRĘBACZ

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Streszczenie: Przedstawione zostały mechanizmy odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. Szczególną uwagę zwrócono na zjawiska elektryczne, takie jak potencjały czynnościowe i zmienne odgrywające istotną rolę w transmisji i transdukcji sygnałów. Omówiony został mechanizm jonowy potencjałów czynnościowych i zbliżony przebiegiem mechanizm zamykania aparatów szparkowych. Scharakteryzowane zostały typy kanałów jonowych biorących udział w transdukcji sygnałów. Zaprezentowano przegląd procesów fizjologicznych regulowanych z udziałem sygnałów elektrycznych. (*Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 95–108*)

Słowa kluczowe: kanały jonowe, komórki szparkowe, odpowiedź systemiczna, potencjał czynnościowy, potencjał zmienny, transdukcja sygnałów, transmisja sygnałów

Summary: Mechanisms of plant responses to stress factors are presented. Special attention was paid to electrical phenomena such as action and variation potentials playing a vital role in signal transmission and transduction. Ion mechanism of action potentials and related mechanism of stomata closure are described. Basic types of ion channels participating in signal transduction are characterised. A survey of physiological processes whose regulation engages electrical signals is presented. (*Advances in Cell Biology 1999; Suppl. 13: 95–108*)

Key words: ion channels, guard cells, systemic response, action potential, variation potential, signal transduction, signal transmission

Z pozoru bierne rośliny wykształciły cały szereg systemów reagowania na zmiany zachodzące w ich środowisku. Reakcje te mogą mieć charakter lokalny, obejmować tylko część rośliny poddaną bezpośredniemu działaniu danego czynnika lub charakter

*Praca została wykonana w ramach dofinansowania przez Komitet Badań Naukowych

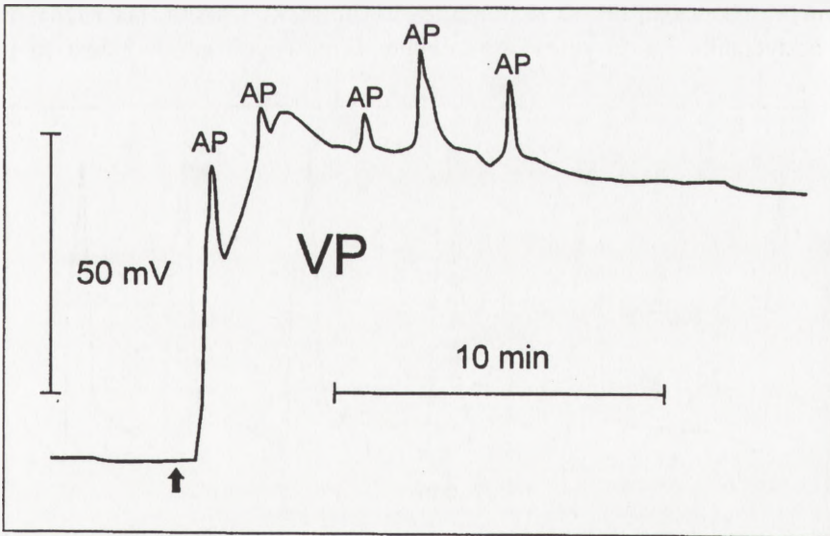
globalny, systemiczny. W przypadku reakcji systemicznej bodźce, nawet lokalne, wywołują odpowiedzi całej rośliny lub znacznej jej części, a w dodatku roślina może na pewien czas wytworzyć odporność na działanie danego bodźca (ang. *systemic acquired resistance*). Czynniki, które uczestniczą w transdukcji, czyli zamianie energii danego bodźca na odpowiedź fizjologiczną komórek i transmisji, czyli rozprzestrzenianiu się informacji o zaistniałym bodźcu, mają naturę chemiczną lub elektryczno-hydrodynamiczną.

Czynniki chemiczne syntetyzowane w odpowiedzi na bodźce można podzielić na: oligosacharydy, kwasy organiczne i ich pochodne oraz glikopeptydy i białka. Oligosacharydy należą do najwcześniej zidentyfikowanych związków uczestniczących w reakcjach obronnych roślin. Są wśród nich oligogalakturnony – produkty rozkładu ściany komórkowej zaatakowanej rośliny oraz oligoglukany, oligochityny i oligochitosany, związki pochodzenia grzybowego [9, 24]. Do kwasów organicznych pełniących rolę w reakcjach obronnych roślin zalicza się m.in. kwas jasmonowy, kwas salicylowy, kwas abscysynowy [19, 23, 25, 49, 57]. Wśród czynników natury białkowej wymienia się systeminę, elicytyny, harpiny [19]. Na ogół związki te są stosunkowo słabo mobilne, z wyjątkiem kwasu salicylowego i systeminy, w związku z tym odgrywają rolę głównie w lokalnych odpowiedziach roślin objawiających się zamieraniem komórek wokół miejsca zranienia, czyli tzw. reakcją nadwrażliwości (ang. *hypersensitive reaction*) lub pojawianiem się aktywnych form tlenu (ang. *oxidative burst*), które niszczą komórki patogenów [19, 25]. Odpowiedzi systemiczne wymagają czynników zdolnych do szybkiego rozprzestrzeniania się. Role tę spełniać mogą m.in. lotne związki, takie jak: estry metylowe kwasu salicylowego i kwasu jasmonowego oraz etylen [19, 21, 23, 50, 59]. Po wydzieleniu przez roślinę związki te mogą dość szybko przenosić sygnał o pojawieniu się danego typu bodźca, a nawet mogą w niektórych przypadkach wywoływać reakcje obronne u roślin sąsiednich nie poddanych działaniu czynnika stresowego [21, 50]. Z drugiej strony, skuteczność ich działania zależy od siły i kierunku wiatru, co czyni ten rodzaj transmisji informacji o zagrożeniu mało pewnym i skutecznym. Ostatnio coraz większą uwagę zaczęto zwracać na czynniki natury fizycznej, mianowicie na przepływy jonów prowadzące do wytworzenia różnic potencjałów elektrycznych na błonach plazmatycznych komórek roślinnych [12, 41, 83, 94].

Wśród odpowiedzi elektrycznych komórek roślinnych wymienić można odpowiedzi lokalne (ang. *local responses*), występujące w najbliższym otoczeniu miejsca stymulacji i rozprzestrzeniające się reakcje bioelektryczne, do których należą potencjały czynnościowe (ang. *action potentials*) i potencjały zmienne lub stopniowane (ang. *variation potentials*) [12, 84, 88]. Potencjały czynnościowe mają charakter „wszystko-albo-nic”. Po przekroczeniu przez bodziec wartości progowej następuje wygenerowanie potencjału czynnościowego o stałej amplitudzie, niezależnej od siły bodźca [16, 64]. Drugim ważnym kryterium przynależności do potencjałów czynnościowych jest zdolność do rozprzestrzeniania się ze względnie stałą szybkością

i bez dekrementu. Ponadto pobudliwość roślin, podobnie jak zwierząt, cechuje refrakcja, czyli czasowa niezdolność do wygenerowania następnego potencjału czynnościowego. W pobudliwych komórkach roślin, podobnie jak w neuronach, daje się wydzielić okresy refrakcji bezwzględnej, podczas których komórki stają się całkowicie niepobudliwe i względnej, kiedy długość okresu niepobudliwości zależy od siły bodźca [16, 65]. Potencjały czynnościowe charakteryzują się ponadto dość regularnym przebiegiem. Po szybkiej fazie depolaryzacji następuje wolniejsza faza repolaryzacji, po której często zachodzi hiperpolaryzacja następcza. Potencjały czynnościowe można wywołać nawet słabymi nieuszkodzającymi bodźcami, takimi jak: dotknięcie, słaby prąd elektryczny czy oświetlenie [35, 85, 86, 90].

Potencjały zmienne pojawiają się w następstwie bodźców uszkodzających: po zranieniu, sparzeniu lub zniszczeniu komórek przez czynnik chemiczny. Rozprzestrzeniają się z dekrementem i stopniowo zmniejszającą się prędkością. Na ogół trwają znacznie dłużej niż potencjały czynnościowe, a nawet dłużej niż okresy refrakcji, stąd też często potencjały czynnościowe występują na tle potencjałów zmiennych pełniących w tym przypadku rolę długotrwałego bodźca depolaryzującego (rys. 1). Potencjały zmienne nie spełniają prawa „wszystko-albo-nic”, ich amplituda, a także zasięg zależą od siły bodźca [84, 88]. Różne są także drogi rozprzestrzeniania się i natura potencjałów czynnościowych i zmiennych. Potencjały czynnościowe rozprzestrzeniają się na zasadzie obwodów lokalnych. Prąd wpływający do komórki w fazie depolaryzacji wypływa przez obszary przyległe stanowiąc bodziec depo-

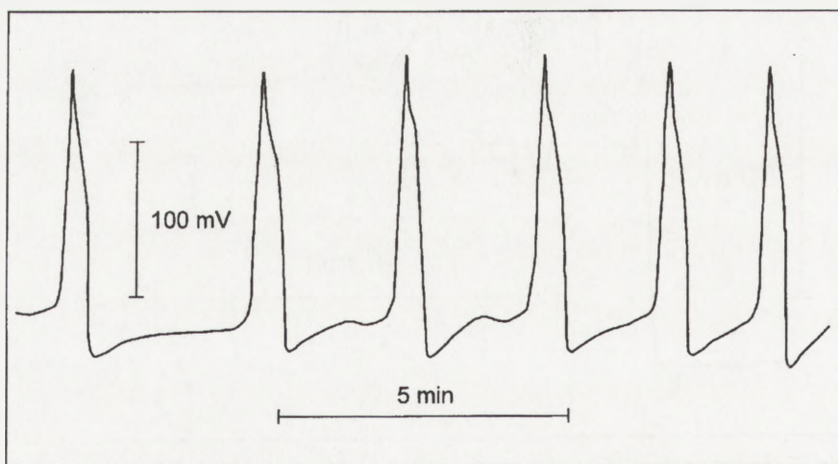


RYSUNEK 1. Zmiany potencjału elektrycznego łodygi słonecznika wywołane stymulacją termiczną brzegu liścia. Na tle długotrwałego potencjału zmiennego (VP) pojawiły się potencjały czynnościowe (AP). Strzałka oznacza moment stymulacji. Rejestracja zewnątrzkomórkowa (na podstawie [84], zmodyfikowany)

laryzujący te obszary, te z kolei po pobudzeniu stają się źródłem pobudzenia dla następnych segmentów tkanki. Potencjał czynnościowy wędruje z komórki do komórki dzięki plazmodesmom łączącym komórki w symplastyczną całość. Obowiązująca obecnie hipoteza dotycząca rozprzestrzeniania się potencjałów zmiennych zakłada, że w wyniku uszkodzenia następuje relaksacja podciśnienia panującego w ksylemie transpirujących roślin. Naruszona zostaje w ten sposób równowaga jonowa w komórkach przyległych do elementów ksylemu, co powoduje ich długotrwałą depolaryzację [53, 84].

Cechą dobrego nośnika informacji o zmieniającym się otoczeniu powinna być zdolność do odzwierciedlania siły, zakresu i rodzaju działających bodźców. Czy odpowiedzi elektryczne roślin mają takie cechy? Bodźce słabe, podprogowe wywołują na ogół odpowiedzi lokalne. Silniejsze, ale nieuszkodzające bodźce wywołują potencjały czynnościowe. Mogą to być pojedyncze pobudzenia lub całe serie jeśli bodziec trwa dłużej niż okres refrakcji (rys. 2). Siła bodźca znajduje wówczas odbicie w częstotliwości serii zgodnie z zasadą, że im silniejszy bodziec tym krótszy okres refrakcji względnej. Bardzo często ta sama roślina reaguje serią potencjałów czynnościowych na jeden typ bodźca, np. zranienie (a raczej jego skutki), a pojedynczym pobudzeniem na inny typ, np. światło [63, 85]. Potencjały czynnościowe mogą też pojawiać się spontanicznie, a ich częstotliwość zmienia się w rytmie okołodobowym [34, 96]. Po silnych bodźcach uszkodzających generowane są potencjały zmienne, których amplituda i zasięg zależą od siły działającego bodźca.

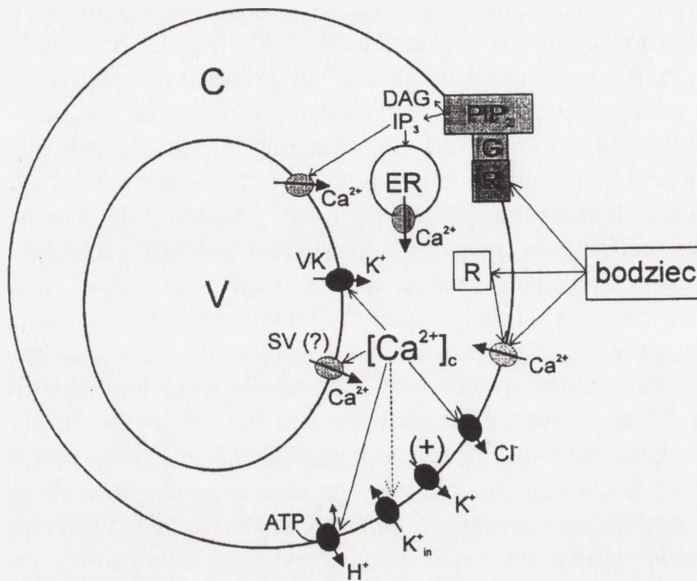
W jaki sposób przepływy jonowe leżące u podstaw potencjałów czynnościowych i zmiennych prowadzą do tak skomplikowanych reakcji roślin, jak ruchy, zmiany tempa oddychania i fotosyntezy czy ekspresja pewnych genów? Jest to pytanie



RYСУNEK 2. Seria potencjałów czynnościowych zarejestrowana wewnątrzkomórkowo w plesze wątrobowca *Conocephalum conicum*. Bodźcem było zwiększenie stężenia jonów K^+ w medium z 1 do 10 mM

o mechanizm jonowy tych zjawisk. Mechanizm jonowy potencjałów czynnościowych jest stosunkowo dobrze poznany. Niemal we wszystkich badanych dotąd przypadkach stwierdzono przejściowy napływ jonów Ca^{2+} do komórki [32, 67, 87, 95]. Uważany jest on za pierwszy etap potencjału czynnościowego. Wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu powoduje aktywację zależnych od Ca^{2+} kanałów chlorowych w plazmalemmie, po otwarciu których następuje wypływ jonów Cl^- z komórki zgodnie z gradientem potencjału elektrochemicznego [48, 51, 60, 61, 87]. Depolaryzacja wywołana otwarciem kolejno kanałów wapniowych i chlorowych powoduje z kolei otwieranie sterowanych napięciem kanałów potasowych i wypływ jonów K^+ z komórki, co doprowadza do częściowej repolaryzacji. Całkowity powrót do potencjału spoczynkowego następuje w wyniku działania elektrogenicznej pompy protonowej, H^+ AT-Pazy [62, 87, 89]. Pompa protonowa i sprzężone z nią mechanizmy transportu uważana jest też za czynnik odpowiedzialny za powrót jonów do pierwotnej homeostazy. Mechanizm jonowy potencjałów zmiennych znany jest tylko w zarysach. Wiadomo, że w ich trakcie, podobnie, jak w przypadku potencjałów czynnościowych, dochodzi do przejściowego wzrostu stężenia jonów wapnia w cytozolu.

Znaczne podobieństwa do mechanizmu jonowego potencjałów czynnościowych wykazuje mechanizm zamykania aparatów szparkowych [3, 5, 33, 39, 52, 56, 73]. Ze względu na znaczenie fizjologiczne szparek liczne zespoły badawcze dysponujące najnowocześniejszą aparaturą badają mechanizm ich funkcjonowania. Schemat, który powstał na podstawie tych badań, przedstawiony został na rysunku 3. Zgodnie z nim bodziec, którym może być kwas abscysynowy (syntetyzowany w stresie suszy), światło lub zmiany zawartości CO_2 w atmosferze działa na receptory błonowe lub cytoplazmatyczne. Receptory błonowe za pośrednictwem białek G prowadzą do rozkładu 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2) do diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trifosforanu inozytolu (IP_3). IP_3 powoduje uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej (ER) lub z wakuoli [1]. W wyniku tego następuje wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie [9, 33, 36, 55]. Wzrost poziomu wapnia następuje też poprzez kanały wapniowe zlokalizowane w plazmalemmie dzięki istnieniu bardzo dużego gradientu potencjału elektrochemicznego dla tych jonów. Uważa się, że liczba jonów Ca^{2+} wchodząca z apoplastu do komórki jest zbyt mała aby wywołać reakcję fizjologiczną i że musi dojść do wzmocnienia sygnału wapniowego. Zjawisko to nosi nazwę indukowanego wapniem wydzielania wapnia, CICR (ang. *calcium induced calcium release*) [3, 56]. W komórkach roślinnych kluczową rolę w tym procesie przypisuje się wakuoli i zlokalizowanym w tonoplaście kanałom jonowym [3]. Wnętrze wakuoli jest na ogół elektrododatnie w stosunku do cytoplazmy. Niewielka, początkowa zmiana stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie powoduje aktywację kanałów potasowych w tonoplaście zależnych od Ca^{2+} , zwanych VK [3, 52]. Otwarcie tych kanałów prowadzi do zmniejszenia różnicy potencjałów w poprzek tonoplastu. Zdaniem wielu autorów powoduje to usunięcie bariery potencjału dla tzw. wolnych kanałów wakuolarnych (SV) i wypływ znacznej ilości



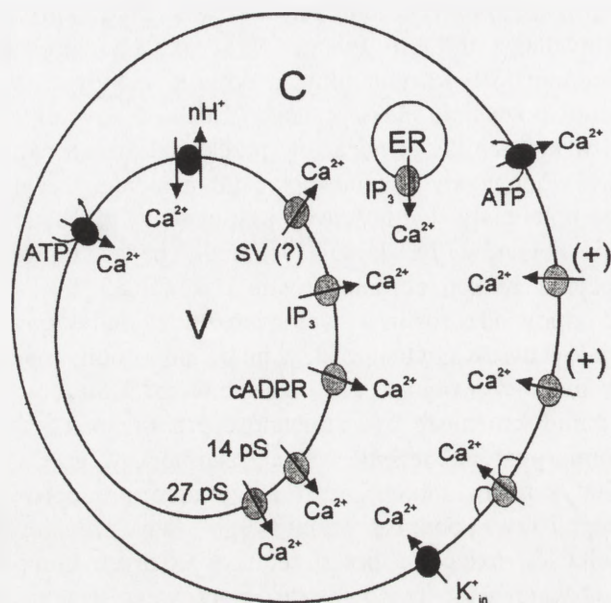
RYSUNEK 3. Schemat ilustrujący przemiany jonowe zachodzące w komórce po zadziałaniu bodźca. C, V i ER oznaczają odpowiednio: cytozol, wakuole i siateczkę śródplazmatyczną. R oznacza receptor, G – białko G. Elipsy ze strzałkami oznaczają kanały jonowe. Podobny symbol ze strzałką wskazującą rozkład ATP oznacza pompę jonową. PIP₂, IP₃, DAG oznaczają 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu, 1,4,5-trifosforan inozytolu i diacyloglicerol. [Ca²⁺]_c oznacza wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytozolu. Liniami ciągłymi ze strzałkami zaznaczono kierunki oddziaływania stymulującego. Linia przerywana ze strzałką wskazuje kierunek oddziaływania hamującego. (+) oznacza aktywację kanału poprzez depolaryzację. Znak „?” przy symbolu kanału typu SV oznacza kwestionowaną rolę tych kanałów we wzmożeniu sygnału wapniowego (CICR), na podstawie [56], zmodyfikowany

jonów wapnia z wakuoli do cytoplazmy (CICR) [3, 52, 56]. Ostatnio pogląd ten poddany został krytyce na gruncie ilościowym [68] i wydaje się, że należy poszukać innych niż SV kanałów, którymi wapń mógłby przepływać przez tonoplast. Faktem jest, że sygnał wapniowy zostaje wzmożony. Uruchamia to wiele procesów w komórce, takich jak aktywacja zależnych od wapnia kinaz i fosfataz, a zmiany ufosforylowania białek enzymatycznych wywołują głębokie przemiany w funkcjonowaniu komórek. Zmiany poziomu cytoplazmatycznego Ca²⁺ oddziałują również na kanały i pompy jonowe [7, 76]. W szczególności zamknięte zostają kanały potasowe (K_{in}), za pomocą których jony K⁺ są pobierane przez komórkę. Powoduje to depolaryzację komórki. Dalszą depolaryzację wywołuje aktywacja zależnych od wapnia kanałów anionowych, a w ślad za tym otwieranie sterowanych depolaryzacją kanałów potasowych. Skierowane na zewnątrz komórki strumienie jonów K⁺ i Cl⁻ wraz z otoczkami hydratacyjnymi są przyczyną zmiany turgoru i w efekcie zamykania komórek szparkowych [39, 73, 74]. Niemal identyczny mechanizm funkcjonuje w przypadku ruchów turgorowych, takich jak zamykanie liści pułapek

Dionaea [42] i *Aldrovanda* [44], opadania liści *Mimosa* po dotknięciu [71], wzrostu intensywności oddychania u *Conocephalum* [18], gutacji gametofitów mchów i paproci po oświetleniu [79] i wielu innych zjawisk, o których wiadomo, że są sterowane zmianami potencjału elektrycznego. Tabela 1 zawiera zestawienie wybranych zjawisk, w których decydującą rolę przekaźników sygnału o wystąpieniu bodźców odgrywają potencjały czynnościowe lub zmienne. Na uwagę zasługuje zwłaszcza fakt, że potencjały czynnościowe i zmienne są niezbędnym czynnikiem systemicznej ekspresji genów *Pin2* kodujących białko będące inhibitorem proteinaz – istotną substancję w reakcji obronnej roślin [13, 41, 83, 94].

Różnorodność odpowiedzi roślin wywołanych z udziałem rozprzestrzeniających się zmian potencjałów nasuwa pytanie: jak w miarę jednorodny mechanizm jonowy tych potencjałów może wywoływać tak różne reakcje? Kluczem do zrozumienia tego pozornego paradoksu może być zmienność przestrzenna i czasowa sygnału wapniowego. Pomiar zmian stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} z zastosowaniem barwnych indykatorów, takich jak: fura czy equorina doprowadziły do sformułowania koncepcji tzw. „podpisu wapniowego” (ang. *calcium signature*) [36, 55, 56, 69]. Wielkość, rozległość przestrzenna w różnych kompartmentach komórkowych i czas trwania wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów wapnia stanowi o specyficzności odpowiedzi na dany, bodziec. Istotną rolę w transdukcji sygnałów przypisuje się też oscylacjom poziomu wapnia, gdzie już nie amplituda, ale częstotliwość oscylacji jest elementem „podpisu wapniowego” [56]. Tylko na gruncie ilościowym można tłumaczyć pozorny paradoks, że sygnałem zarówno do zamknięcia jak i do otwarcia szparek jest przejściowy wzrost poziomu cytozolowego wapnia [52]. Różnorodność odpowiedzi fizjologicznych roślin wynika też z podatności komórek na zmiany poziomu Ca^{2+} w cytozolu lub na inny wtórny przekaźnik. Określa się to mianem genetycznego i fizjologicznego „adresu” (ang. *genetical and physiological address*) [56]. Komórki należące do różnych tkanek i różnych gatunków roślin różnią się od siebie stopniem wykształcenia poszczególnych elementów kaskady sygnałowej. Może to mieć podłoże zarówno czysto genetyczne jak i fizjologiczne. Wiadomo np., że podatność komórek szparkowych, m.in. u *Commelina* na kwas abscysynowy zależy od temperatury, w jakiej wyrastała roślina [2]. Pobudliwość roślin, czyli zdolność do generowania potencjałów czynnościowych jest również w pewnym zakresie zdeterminowane genetycznie, w pewnym zaś podlega metabolicznej kontroli. Występują na przykład wahania progno pobudzenia w rytmie okołodobowym [96].

Aby mogło dojść do zmian wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia, aktywacji muszą ulec kanały wapniowe będące adresatami pierwszych etapów transdukcji. Dzięki technice stabilizacji potencjału fragmentu błony (ang. *patch-clamp*) udało się poznać zasady funkcjonowania (ang. *gating*) wielu typów kanałów, które mogą brać udział w przekazywaniu sygnału wapniowego. Przedstawia je schematycznie rysunek 4. Podstawowe typy kanałów przepuszczalnych dla Ca^{2+} w plazmalemmie



RYSUNEK 4. Schemat przedstawiający struktury błonowe biorące udział w regulacji stężenia wolnych jonów wapnia w cytozolu komórek roślinnych. Oznaczenia jak na rys. 3. Ponadto symbol kanału z dwoma łukami po bokach oznacza kanał sterowany napięciem. Elipsa z dwiema strzałkami ustawionymi antyrównolegle oznacza kotransporter $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. cADPR oznacza kanał sterowany cykliczną ADP rybozą. 14 pS i 27 pS to oznaczenia przewodnictwa (w pikosimensach) dwóch typów kanałów wapniowych (na podstawie [56], zmodyfikowany)

to: kanały sterowane napięciem (otwierające się podczas depolaryzacji), kanały sterowane mechanicznym napięciem błony (ang. *stretch-activated channels*) [11], i wzmiankowane już kanały potasowe (K_{in}^+), które przewodzą jony K^+ do wnętrza komórki, ale równocześnie wykazują ograniczoną przepuszczalność dla jonów Ca^{2+} [56]. Oprócz kanałów za homeostazę wapniową w cytozolu odpowiada pompa wapniowa, Ca^{2+} ATPaza [15, 43]. W błonach wewnątrzkomórkowych struktur, a zwłaszcza w tonoplście znaleziono przynajmniej dwa typy kanałów przewodzących wapń różniące się przewodnictwem jednostkowym (14 pS i 27 pS) [56]. Ponadto znajdują się tam kanały sterowane ligandami: IP_3 [1] i cykliczną ADP rybozą (cADPR) [54]. Względnie stały, spoczynkowy poziom Ca^{2+} w cytozolu zapewniają Ca^{2+} ATPaza i przenośnik transportujący jony Ca^{2+} do wakuoli w kotransporcie z protonami [47, 66]. Obraz ten zmienia się z roku na rok w miarę udoskonalania technik badawczych i w miarę badania coraz to nowych obiektów.

Oprócz zmian poziomu jonów wapnia również zmiany pH cytoplazmy uważane są za potencjalny element transdukcji sygnałów w komórkach roślinnych [37]. pH cytozolu jest na ogół zbliżone do 7, podczas gdy pH soku wakuolarnego i płynu zewnątrzkomórkowego wynosi od 2 do 6 [37]. Istnieje wprawdzie, tak jak w przy-

TABELA 1. Wybrane procesy fizjologiczne regulowane z udziałem lokalnych odpowiedzi elektrycznych (LR), potencjałów czynnościowych (AP) i potencjałów zmiennych (VP)

Odpowiedź fizjologiczna rośliny	Typ reakcji elektrycznej	Gatunek rośliny	Literatura
Ekspresja genów <i>PIN2</i>	AP, VP	<i>Lycopersicon esculentum</i>	13,41,83,94
Ekspresja genów kalmoduliny	VP	<i>Bidens pilosa</i>	92
Zamykanie szparek	VT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Wzrost tempa oddychania	AP	<i>Conocephalum conicum</i>	18, 27
Zmiany tempa fotosyntezy	AP, VP	<i>Cucurbita pepo</i>	30, 38, 91
Zahamowanie pobierania wody	VP	<i>Helianthus annuus</i>	14
Zmiany tempa transpiracji	AP, VP	<i>Salix viminalis</i>	30, 91
Wpływ fotoasymilatów	AP, VP	<i>Mimosa pudica</i>	28, 29
Zapylenie i zapłodnienie	AP, VP	<i>Lilium martagon</i>	31, 80, 81
Gutacja	AP, LR	<i>Bryum pseudotriquetrum</i>	79
Zatrzymanie ruchu cytoplazmy	AP	<i>Nitella axilliformis</i>	49
Zmiany długości komórek	AP	<i>Chara corallina</i>	58
Zahamowanie wzrostu	AP, VP	<i>Luffa cylindrica</i>	14, 75, 82
Ruchy sejsmonastyczne	AP	<i>Mimosa pudica</i>	71, 77
Ruchy organów łownych	AP	<i>Dionaea muscipula</i>	42, 44
Ruchy autonomiczne	AP	<i>Desmodium motorium</i>	4
Ruchy elementów kwiatów	AP	<i>Incarvillea delavayi</i>	80
Morfogeneza	VP	<i>Bidens pilosa</i>	46
Adaptacja do niskiej temperatury	AP	<i>Cucurbita pepo</i>	70
Powstawanie zalążków gametoforów	AP	<i>Physcomitrella patens</i>	22
Transdukcja bodźca grawitacyjnego	LR	<i>Lepidium sativum</i>	78
Transdukcja bodźca termicznego	LR, AP	<i>Eranthis hyemalis</i>	40, 70
Transdukcja bodźca świetlnego	VT, AP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8, 10, 87
Zmiany aktywności peroksydaz	AP	<i>Conocephalum conicum</i>	17
Regulacja transportu jonów	LR	<i>Eremosphaera viridis</i>	72
Zmiany poziomu ATP w cytozolu	AP	<i>Dionaea muscipula</i>	45
Tworzenie brodawek korzeniowych	VP	<i>Medicago sativa</i>	20, 26

padku jonów wapnia, system buforowania i usuwania nadmiaru protonów z cytozolu, niemniej przejściowe zmiany pH mają miejsce. Znaczna część enzymów wykazuje dość wąską zależność od pH. Sprawia to, że przynajmniej w trakcie tych zmian pH cały szereg enzymów zmienia swą aktywność. Rozważa się też wzajemne powiązania między zmianami poziomu Ca^{2+} i H^+ , które w cytozolu wiązane są w dużej mierze przez te same substancje buforujące [72].

Ostatnio zaczęły pojawiać się doniesienia o szlakach transdukcji sygnałów niezwiązanych ze zmianami poziomu wapnia i protonów [6]. Jednak i w tych przypadkach rolę transmisyjną przypisuje się zmianom potencjału, a rolę pierwotnych adresatów bodźców kanałom anionowym. Zablockowanie kanałów anionowych przez

specyficzne inhibitory hamuje reakcję nadwrażliwości [93] i ekspresję genów [93] i indukowaną β -glukanem produkcję fitoaleksyn [93]. Kanały anionowe mogą pełnić swą rolę regulacyjną dzięki zmianom aktywności wywoływanych odwracalną fosforylacją/defosforylacją [52, 76]. Ostatnio pojawiły się też doniesienia o udziale cAMP w transdukcji sygnałów u roślin [6, 52].

Z przedstawionego przeglądu wynika jasno, że rośliny posiadają liczne mechanizmy zdolne do przeciwstawienia się negatywnym bodźcom, a szczególnie inwazjom patogenów i roślinożerców. Tak jak niemal wszędzie w przyrodzie obserwować tu możemy swoisty „wyścig zbrojeń” polegający na przewyżczeniu wzajemnych zabezpieczeń przez obiekty atakowane i atakujące. Ten wyścig zbrojeń trwa zapewne od milionów lat, a nasza wiedza na ten temat, bardzo wciąż fragmentaryczna, to zdobycz ostatnich kilku lat. Można mieć nadzieję, że lepsze poznanie mechanizmów obronnych stosowanych przez rośliny pozwoli wspomóc ich systemy obronne w sposób racjonalny.

LITERATURA

- [1] ALEXANDRE J, LASSALLES JP, KADO RT. Opening of Ca^{2+} channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1990; **343**: 567–570.
- [2] ALLAN AC, FRICKER MD, WARD JL, BEALE MH, TREWAVAS AJ. Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 1994; **6**: 685–694.
- [3] ALLEN GJ, SANDERS D. Control of ionic currents in guard cell vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J* 1996; **10**: 1055–1069.
- [4] ANTKOWIAK B, ENGELMANN W. Oscillations of apoplasmic K^+ and H^+ activities in *Desmodium motorium* (Houtt.) Merril. pulvini in relation to the membrane potential of motor cells and leaflet movements. *Planta* 1995; **196**: 350–356.
- [5] ASSMANN SM. Signal transduction in guard cells. *Annu Rev Cell Biol* 1993; **9**: 945–975
- [6] ASSMANN SM Cyclic-AMP as a second messenger in higher plants – status and future prospects. *Plant Physiol* 1995; **108**: 885–889.
- [7] BETHKE PC, JONES RL. Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar ion channel. *Plant J* 1997; **11**: 1227–1235.
- [8] BLOM-ZANDSTRA M, KOOT H, VAN HATTUM J, VOGELZANG SA. Transient light-induced changes in ion channel and proton pump activities in the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts. *J Exp Bot* 1997; **48**: 1623–1630.
- [9] BUSH DS. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol* 1993; **103**: 7–13.
- [10] CHO MH, SPALDING EP. An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8134–8138.
- [11] COSGROVE DJ, HEDRICH R. Stretch-activated chloride, potassium and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta* 1991; **186**: 143–153.
- [12] DAVIES E. Action potentials as multifunctional signals in plants: A unifying hypothesis to explain apparently disparate wound responses. *Plant Cell Environ* 1987; **10**: 623–631.
- [13] DAVIES E, VIAN A, VIAN C, STANKOVIĆ B. Rapid systemic up-regulation of genes after heat-wounding and electrical stimulation. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 571–576.

- [14] DAVIES E, ZAWADZKI T, WITTERS D. Electrical activity and signal transmission in plants: how do plants know? [w] Penel C, Greppin H, [red.] Plant Signalling, Plasma Membrane and Change of State. Geneva: Laboratory of Plant Physiology, University of Geneva. 1991: 119–137.
- [15] DEMICHELIS MI, CARNELLI A, RASI-CALDOGNO F. The Ca^{2+} pump of the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*: characteristics and sensitivity to fluorescein derivatives. *Bot Acta* 1993; **106**: 20–25.
- [16] DZIUBIŃSKA H, PASZEWSKI A, TRĘBACZ K, ZAWADZKI T. Electrical activity of the liverwort *Conocephalum conicum*: The all-or-nothing law, strength-duration relation, refractory periods and intracellular potentials. *Physiol Plant* 1983; **57**: 279–284.
- [17] DZIUBIŃSKA H, SZAREK I, TRĘBACZ K, ZAWADZKI T. Effects of local cutting on peroxidase activity in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Peroxidase Newsletter* 1999; **12**: 3–8.
- [18] DZIUBIŃSKA H, TRĘBACZ K, ZAWADZKI T. The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant* 1989; **75**: 417–423.
- [19] EBEL J, MITHÖFER A. Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 1998; **206**: 335–348.
- [20] EHRHARDT DW, WAIS R, LONG SR. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 1996; **85**: 673–681.
- [21] ENYEDI AJ, YALPANI N, SILVERMAN P, RASKIN I. Signal molecules in systemic plant resistance. *Cell* 1992; **70**: 879–886.
- [22] ERMOLAYEVA E, HOHMAYER H, JOHANNES E, SANDERS D. Calcium-dependent membrane depolarization activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* 1996; **199**: 352–358.
- [23] FARMER EE, JOHNSON RR, RYAN CA. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 1992; **98**: 995–1002.
- [24] FARMER EE, MOLOSHOK TD, SAXTON MJ, RYAN CA. Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J Biol Chem* 1991; **266**: 3140–3145.
- [25] FARMER EE, WEBER H, VOLLENWIEDER S. Fatty acid signalling in *Arabidopsis*. *Planta* 1998; **206**: 167–174.
- [26] FELLE HH, KONDOROSI E, KONDOROSI A, SCHULTZE M. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J* 1998; **13**: 455–463.
- [27] FILEK M, KOŚCIELNIAK J. The effect of wounding the roots by high temperature on the respiration rate of the shoot and propagation of electric signal in horse bean seedlings (*Vicia faba* L. *minor*). *Plant Sci* 1997; **123**: 39–46.
- [28] FROMM J. Control of phloem unloading by action potentials in *Mimosa*. *Plant Physiol* 1991; **83**: 529–533.
- [29] FROMM J, BAUER T. Action potentials in maize sieve tubes change phloem translocation. *J Exp Bot* 1994; **45**: 463–469.
- [30] FROMM J, ECHRICH W. Electric signals released from roots of willow (*Salix viminalis* L.) change transpiration and photosynthesis. *J Plant Physiol* 1993; **141**: 673–680.
- [31] FROMM J, HAJIREZAEI M, WILKE I. The biochemical response of electrical signalling in the reproductive system of *Hibiscus* plants. *Plant Physiol* 1995; **109**: 375–384.
- [32] GAFFEY CT, MULLINS LJ. Ion fluxes during the action potential in *Chara*. *J Physiol* 1958; **144**: 505–524.
- [33] GILROY S, FRICKER MD, READ ND, TREWAVAS AJ. Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 1991; **3**: 333–344.
- [34] GŁĘBICKI K, HEJNOWICZ Z, PIJANOWSKI A. Localised spontaneous fluctuations of electric potential in shoots of different plants. *Acta Soc Bot Pol* 1986; **55**: 67–76.

- [35] GŁĘBICKI K, HEJNOWICZ Z, PIJANOWSKI A. Induced fluctuations of electric potentials in the apoplast of leaves. *Planta* 1989; **180**: 1–4.
- [36] GRAZIANA A, BONO J-J, RANJEVA R. Measurement of cytoplasmic calcium by optical fluorescence in plant systems. *Plant Physiol Biochem* 1993; **31**: 277–281.
- [37] GUERN J, FELLE H, MATHIEU Y, KURKDJIAN A. Regulation of intracellular pH in plant cells. *Int Rev Cytol* 1991; **127**: 111–173.
- [38] GUNAR II, SINYUKHIN AM. Functional significance of action currents affecting the gas exchange of higher plants. *Fiziol Rast* 1963; **10**: 219–226.
- [39] HEDRICH R, BUSCH H, RASCHKE K. Ca^{2+} and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cell. *EMBO J* 1990; **9**: 3889–3892.
- [40] HEJNOWICZ Z, TRĘBACZ K, SIEVERS A. Temperature-dependent changes of electric potential differences on opposite sides of the tepals of *Eranthis* in relation to thermonastic responses. *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 471–474.
- [41] HERDE O, CORTES HP, WASTERNAK C, WILLMITZER L, FISAHN J. Electric signalling and Pin2 gene expression on different abiotic stimuli depend on a distinct threshold of endogenous abscisic acid in several abscisic acid-deficient tomato mutants. *Plant Physiol* 1999; **119**: 213–218.
- [42] HODICK D, SIEVERS A. The action potential of *Dionaea muscipula* Ellis. *Planta* 1988; **174**: 8–18.
- [43] HSIEH W-L, PIERCE W S, SZE H. Calcium-pumping ATPases in vesicles from carrot cells. *Plant Physiol* 1991; **97**: 1535–1544.
- [44] IJIMA T, SIBAOKA T. Membrane potentials in excitable cells of *Aldrovanda vesiculosa* trap-lobes. *Plant Cell Physiol* 1985; **26**: 1–13.
- [45] JAFFE MJ. The role of ATP in mechanically stimulated rapid closure of the Venus-fly trap. *Plant Physiol* 1973; **51**: 17–18.
- [46] JULIEN JL, DESBIEZ MO, DE JAEGHER G, FRACHISSE JM. Characteristics of the wave of depolarization induced by wounding in *Bidens pilosa* L. *J Exp Bot* 1991; **42**: 131–137.
- [47] KASAIM, MUTO S. Ca^{2+} pump and $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter in plasma membrane vesicles isolated by aqueous two phase partitioning from corn leaves. *J Membr Biol* 1990; **114**: 133–142.
- [48] KATSUHARA M, TAZAWA M. Calcium-regulated channels and their bearing on physiological activities in Characean cells. *Phil Trans R Soc London B* 1992; **338**: 19–29.
- [49] KIKUYAMA M, SHIMADA K, HIRAMOTO Y. Cessation of cytoplasmic streaming follows an increase of cytoplasmic Ca^{2+} during action potential in *Nitella*. *Protoplasma* 1993; **174**: 142–146.
- [50] KODA Y. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiol Plant* 1997; **100**: 639–646.
- [51] LUNEVSKY VZ, ZHERELOVA OM, VOSTRIKOV IY, BERESTOVSKY GN. Excitation of *Characeae* cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J Membr Biol* 1983; **72**: 43–58.
- [52] MACROBBIE EAC. Signalling in guard cells and regulation of ion channel activity. *J Exp Bot* 1997; **48**: 515–528.
- [53] MALONE M. Rapid, long-distance signal transmission in higher plants. *Advances Bot Res* 1996; **22**: 163–228.
- [54] MCAINSH MR, ALLEN G, HETHERINGTON AM, SANDERS D. The role of cyclic-ADP-ribose in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 1996; **111** (suppl.): 153.
- [55] MCAINSH MR, BROWNLEE C, HETHERINGTON AM. Visualizing changes in cytosolic-free Ca^{2+} during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* 1992; **4**: 1113–1122.
- [56] MCAINSH MR, BROWNLEE C, HETHERINGTON AM. Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol Plant* 1997; **100**: 16–29.

- [57] MEUWLY P, STICHER L, MOLDERS W, SUMMMERMATTER K, COQUOZ J-L, BUCHALA A, METRAUX J-P. Salicylic acid and systemic acquired resistance in cucumber and potato. [w] Schulz J, Raskin I [red.] *Plant Signals in Interaction with Other Organisms*. American Society of Plant Physiologists. 1993; 54–64.
- [58] ODA K, LINSTEAD PJ. Changes in cell length during action potentials in *Chara*. *J Exp Bot* 1975; **26**: 228–239.
- [59] O'DONNELL PJ, CALAVERT C, ATZORN R, WASTERNAK C, LEYSER HMO, BOWLES DJ. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 1996; **274**: 1914–1917.
- [60] OKIHARA K, OHKAWA T, KASAI M. Effects of calmodulin on Ca^{2+} -dependent Cl^- -sensitive anion channels in the *Chara* plasmalemma: a patch-clamp study. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 75–82.
- [61] OKIHARA K, OHKAWA T, TSUTSUI I, KASAI M. A Ca^{2+} - and voltage-dependent Cl^- -sensitive anion channel in the *Chara* plasmalemma: a patch-clamp study. *Plant Cell Physiol* 1991; **32**: 593–601.
- [62] OPRITOV VA, PYATYGIN SS Evidence for coupling of action potential generation with the electrogenic component of the resting potential in *Cucurbita pepo* L. stem excitable cells. *Biochem Physiol Pflanzen* 1989; **184**: 447–451.
- [63] PASZEWSKI A, DZIUBIŃSKA H, TRĘBACZ K, ZAWADZKI T. Electrical activity of the liverwort *Conocephalum conicum*: Method of investigation and general characteristics of excitation. *Physiol Plant* 1982; **54**: 83–87.
- [64] PASZEWSKI A, ZAWADZKI T. Action potentials in *Lupinus angustifolius* L. shoots. II. Determination of the strength-duration relation and the all-or-nothing law. *J Exp Bot* 1974; **25**: 1097–1103.
- [65] PASZEWSKI A, ZAWADZKI T. Action potentials in *Lupinus angustifolius* L. shoots. II. Determination of the refractory periods. *J Exp Bot* 1976; **27**: 369–374.
- [66] PFEIFFER W, HAGER A. A Ca^{2+} -ATPase and $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^+$ -antiporter are present on tonoplast membranes from roots of *Zea mays* L. *Planta* 1993; **191**: 377–385.
- [67] PLIETH C, SATTELMACHER B, HANSEN UP, THIEL G. The action potential in *Chara*: Ca^{2+} release from internal stores visualized by Mn^{2+} -induced quenching of fura-dextran. *Plant J* 1998; **13**: 167–175.
- [68] POTTOSIN II, TIKHONOVA LI, HEDRICH R, SCHÖNKNECHT G. Slowly activating vacuolar channels can not mediate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Plant J* 1997; **12**: 1387–1398.
- [69] READ ND, ALLAN WTG, KNIGHT H, MALHÓ R, RUSSELL A, SHACKLOCK PS, TREWAVAS AJ. Imaging and measurement of cytosolic free calcium in plant and fungal cells. *J Microscop* 1993; **166**: 57–86.
- [70] RETIVIN VG, OPRITOV VA, FEDULINA SB. Generation of action potential induces preadaptation of *Cucurbita pepo* L. stem tissues to freezing injury. *Russian J Plant Physiol* 1997; **44**: 432–442.
- [71] SAMEJIMA M, SIBAOKA T. Membrane potentials and resistance of excitable cells in the petiole and main pulvinus of *Mimosa pudica*. *Plant Cell Physiol* 1982; **23**: 459–465.
- [72] SCHÖNKNECHT G, BAUER CS, SIMONIS W. Light-dependent signal transduction and transient changes in cytosolic Ca^{2+} in unicellular green alga. *J Exp Bot* 1998; **49**: 1–11.
- [73] SCHROEDER JI. Ion channel regulation during stomatal movements. *Phil Trans Roy Soc London B* 1992; **338**: 83–89.
- [74] SCHROEDER JI, KELLER BU. Two types of anion currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 5025–5029.
- [75] SHIINA T, TAZAWA M. Action potentials in *Luffa cylindrica* and its effects on elongation growth. *Plant Cell Physiol* 1986; **27**: 1081–1089.
- [76] SHIINA T, TAZAWA M. Regulation of membrane excitation by protein phosphorylation in *Nitellopsis obtusa*. *Protoplasma* 1986; **136**: 60–61.

- [77] SIBAOKA T. Transmission of action potentials in *Biophytum*. *Bot Magazine* (Tokyo) 1973; **86**: 51–62.
- [78] SIEVERS A, SONDAG K, TRĘBACZ K, HEJNOWICZ Z. Gravity induced changes in intracellular potentials in statocytes of cress roots. *Planta* 1995; **197**: 392–398.
- [79] SINYUKHIN AM. Functional activity of the action potential of *Pteropsida* and *Musci*. *Biofizika* 1973; **18**: 477–483.
- [80] SINYUKHIN AM, BRITIKOV EA. Action potentials in the reproductive system of plants. *Nature* 1967; **215**: 1278–1280.
- [81] SPANJERS AW. Bioelectric potential changes in the style of *Lilium longiflorum* Thumb after self- and cross-pollination of the stigma. *Planta* 1981; **153**: 1–5.
- [82] STAHLBERG R, COSGROVE DJ. Rapid alternations in growth rate and electrical potentials upon stem excision in pea seedlings. *Planta* 1992; **187**: 523–531.
- [83] STANKOVIĆ B, DAVIES E. Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Lett* 1996; **390**: 275–279.
- [84] STANKOWIĆ B, WITTERS D, ZAWADZKI T, DAVIES E. Action potentials and variation potentials in sunflower: an analysis of their relationships and distinguishing characteristics. *Physiol Plant* 1998; **102**: 611–618.
- [85] TRĘBACZ K. Light-triggered action potentials in plants. *Acta Soc Bot Pol* 1989; **58**: 141–156.
- [86] TRĘBACZ K, SIEVERS A. Action potentials evoked by light in traps of *Dionaea muscipula* Ellis. *Plant and Cell Physiology* 1998; **39**: 369–372.
- [87] TRĘBACZ K, SIMONIS W, SCHÖNKNECHT G. Cytoplasmic Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , and NO_3^- activities in the liverwort *Conocephalum conicum* L. at rest and during action potentials. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1073–1084.
- [88] TRĘBACZ K, STOLARZ M, DZIUBIŃSKA H, ZAWADZKI T. Electrical control of plant development. [w] Greppin H, Pennel C, Simon P [red.] *Travelling Shot on Plant Development*. Geneva. University of Geneva. 1997; 163–179.
- [89] TRĘBACZ K, TARNECKI R, ZAWADZKI T. The effects of ionic channel inhibitors and factors modifying metabolism on the excitability of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant* 1989; **75**: 24–30.
- [90] TRĘBACZ K, ZAWADZKI T. Light-triggered action potentials in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant* 1985; **64**: 482–486.
- [91] VAN SAMBEEK JW, PICKARD BG. Mediation of rapid electrical, metabolic, transpirational, and photosynthetic changes by factors released from wound. III. Measurement of CO_2 and H_2O flux. *Can J Bot* 1976; **54**: 2662–2671.
- [92] VIAN A, HENRY-VIAN C, SHANNTZ R, LEDOIGT G, FRACHISSE JM, DESBIEZ MO, JULIEN JL. Is membrane potential involved in calmodulin gene expression after external stimulation in plants. *FEBS Lett* 1996; **380**: 93–96.
- [93] WARD JM., PEI Z-M, SCHROEDER JI. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* 1995; **7**: 833–844.
- [94] WILDON DC, THAIN JF, MINCHIN PEH, GUBB IR, REILLY AJ, SKIPPER YD, DOHERTY HM, O'DONNELL PJ, BOWLES DJ. Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* 1992; **360**: 62–65.
- [95] WILLIAMSON RE, ASHLEY CC. Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature* 1982; **296**: 647–651.
- [96] ZAWADZKI T, DZIUBIŃSKA H, DAVIES E. Characteristics of action potentials generated spontaneously in *Helianthus annuus*. *Physiol Plant* 1995; **93**: 291–297.

Adres autora

ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

e-mail: trebacz@biotop.umcs.lublin.pl

SYMULACJE WZROSTU I PODZIAŁÓW KOMÓREK W MERYSTEMIE. ZNACZENIE GŁÓWNYCH KIERUNKÓW WZROSTU

SIMULATIONS OF GROWTH AND CELL DIVISIONS IN THE MERISTEM. SIGNIFICANCE OF THE PRINCIPAL DIRECTIONS OF GROWTH

Jerzy NAKIELSKI

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Streszczenie: Podstawy zagadnienia: Organy roślinne rosną symplastycznie co oznacza, że istnieje w nich tensorowe pole szybkości wzrostu. *Główne kierunki wzrostu:* Pole to można generować matematycznie poprzez tensor wzrostu (TW). W każdym punkcie pola TW występują trzy wzajemnie ortogonalne główne kierunki wzrostu (kierunki G). Kierunki te układają się w linie, tworząc wzór trzech ortogonalnych trajektorii kierunków G. W merystemach apikalnych korzeni i pędu, gdzie kształt wierzchołka nie zmienia się w trakcie wzrostu, wzór trajektorii kierunków G jest stabilny. *Komórki dzielą się w płaszczyznach wyznaczonych przez główne kierunki wzrostu.* Układ komórek w przekroju osiowym wierzchołka korzenia i pędu opisać można dwoma rodzinami wzajemnie ortogonalnych linii znanych jako perykliny i antykliny. Linie te, uważane za gładkie pomimo nieregularności związanych z kształtem indywidualnych komórek, zachowują ortogonalność w trakcie wzrostu. Są przez to podobne do trajektorii kierunków G, stąd wysunięto hipotezę, że perykliny i antykliny reprezentują kierunki G w układzie komórek. Jeśli tak jest, podziały komórek w muszą odbywać się w płaszczyznach wyznaczonych przez kierunki G. *Model wzrostu i podziałów komórek:* Na podstawie TW i wspomnianej hipotezy zbudowano symulacyjny 2-wymiarowy model wzrostu i podziałów komórek. Opisano założenia i algorytm modelu. *Zastosowanie modelu do symulacji wzrostu merystemów wierzchołkowych pędu i korzenia:* Pokazano dwa przykłady zastosowania modelu, w jednym generowano wzrost wierzchołka pędu siewki świerka, w drugim generowano wzrost wierzchołka korzenia rzodkiewki. W obu, układy komórek na wejściu pochodziły z przekrojów anatomicznych. Wynikiem była komputerowa sekwencja wzrostu. Generowane układy komórek były realistyczne i stabilne. *Wnioski:* Można generować wzrost organu znając wzór głównych kierunków wzrostu dla tego organu. W opisanym modelu, realistyczne układy komórek otrzymano przez założenie, że komórki dzielą się w płaszczyznach wyznaczonych przez te kierunki. (*Postępy Biologii Komórki 1999; Supl. 13: 109–126*)

Słowa kluczowe: wzrost organu, symulacyjny model, algorytm podziałów komórek, tensor wzrostu, główne kierunki wzrostu

Summary: Background: Plant organs grow sympastically, i.e. there is a tensorial field of growth rates in such organs. *Principal directions of growth:* This field can be generated by the growth tensor (GT). In every point of the GT field are three mutually orthogonal principal directions of growth (PDG). These directions are arranged into lines giving the pattern of PDG trajectories. In shoot and root apical meristems that do not change their shape during growth, as it is usually, PDG pattern is steady. *Cell divides in the planes given by principal directions of growth:* In an axial section of shoot and root apices, cell pattern can be approximated by two types of mutually orthogonal lines known as periclinal and anticlinal. The lines, considered smooth regardless of the zig-zag resulting from the shape of individual cells, preserve orthogonality during growth. By this property they are similar to PDG trajectories. Thus, the hypothesis has been made: periclinal and anticlinal represent PDG trajectories in the cell wall network. From the point of view of cell production it means that, new cell walls which appear as the result of cell divisions, are formed in PDG planes. *Model for growth and cell division:* On the basis of the GT and this hypothesis, a simulation (2D) model for growth and cell division has been worked out. General assumptions and rules of the algorithm are presented. *Application of the model to the simulation of growth in shoot and root apices:* Two examples are considered, one of the shoot apex in spruce seedlings and the other, of the root meristem in radish. In both, cell patterns coming from anatomical sections were input data, whereas computer-made temporal sequences as the result were obtained. Simulations have shown quite realistic and self-perpetuating cell patterns. *Conclusions:* It is possible to simulate growth of the organ using as the basis the knowledge of the pattern of principal directions of growth for this organ. In the presented model, realistic cell patterns were achieved by the assumption that cells divide in planes determined by these directions.

(*Advances in Cell Biology 1999; Suppl. 13 109–126*)

Key words: organ growth, simulation model, algorithm for cell division, growth tensor, principal directions of growth

1. GŁÓWNE KIERUNKI WZROSTU

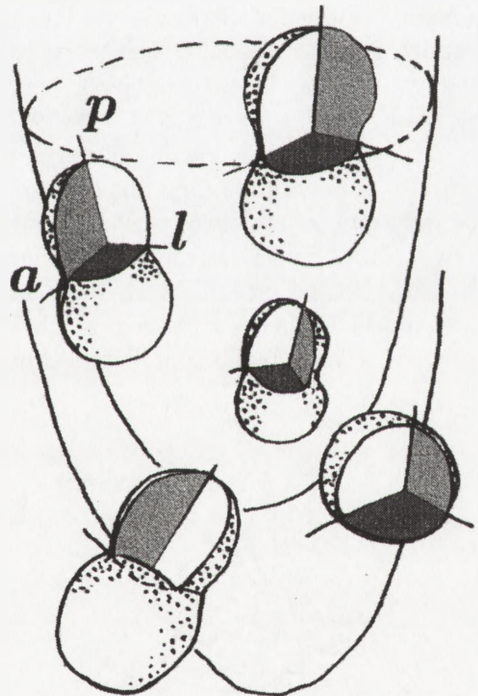
Organy roślinne rosną symplastycznie. Wzrost symplastyczny, to skoordynowany wzrost komórek organu [7, 14, 39]. Komórka roślinna ma ścianą komórkową, ściany komórek sąsiednich połączone są blaszkami środkowymi. Koordynacja polega na tym, że komórki sąsiednie nie ślizgają się po sobie i nie migrują, a organ jako całość rozrasta się w sposób zwarty i ciągły.

W merystemach, wzrost wiąże się z podziałami komórek. Częstotliwość podziałów komórek nie jest jednakowa, istnieją obszary, gdzie komórki dzielą się często i obszary, gdzie komórki dzielą się rzadko. Ponieważ rozmiary komórek są z grubsza jednakowe, tam gdzie częstotliwość podziałów komórek jest duża, także szybkość wzrostu musi być duża, bo inaczej komórki stawałyby się coraz to mniejsze. Podobnie w rejonach, gdzie komórki dzielą się rzadko, szybkość wzrostu musi być niska, bo inaczej komórki stawałyby się coraz to większe. Zatem, zróżnicowanie częstotliwości podziałów komórek świadczy o przestrzennym rozkładzie szybkości wzrostu. Matematycznie, współzależność pomiędzy szybkością wzrostu, częstot-

liwością podziałówkomórek i rozmiarami komórek opisali Green [13], Gandar [11], Silk [45], dla wzrostu jednowymiarowego, oraz Hejnowicz i Romberger [22], dla wzrostu w trzech wymiarach.

W trakcie wzrostu cząstki organu przesuwają się. W oparciu o przesunięcia cząstek określić można wektorowe pole prędkości przesunięć, V [12, 15, 46]. Szybkość wzrostu, a dokładniej, tzw. względna elementarna szybkość wzrostu liniowego, REG_l , to pochodna przestrzenna V [21, 41, 44]. W danym punkcie, daje się ją obliczyć w różnych kierunkach. Wtedy widać, że poza przypadkiem wzrostu izotropowego, wartości REG_l w różnych kierunkach są na ogół różne. Oznacza to, jak wykazali Hejnowicz i Romberger [21] bezpośrednio z definicji REG_l , że szybkość wzrostu jest wielkością typu tensorowego. W rosnącym organie istnieje zatem tensorowe pole szybkości wzrostu (Hejnowicz w tym samym zeszycie). Pole to można generować matematycznie przy użyciu operatora, który nazwano [21] tensorem wzrostu (TW).

Tensorowe pole szybkości wzrostu (pole TW) jest ciągłe, a wartości REG_l w różnych kierunkach, w różnych punktach pola, są „skoordynowane”. Odwołując się do wspomnianych rozważań Hejnowicza przypomnę, że w każdym punkcie rosnącego organu istnieją trzy wzajemnie ortogonalne, tzw. główne kierunki wzrostu [16, 21] (rys. 1). W kierunkach tych, nazwijmy je kierunkami G , REG_l przyjmuje wartości ekstremalne. W dwóch jest maksymalna i minimalna, w trzecim, do nich prostopadłym, przyjmuje wartość pośrednią, tzw. siodłową. W ciągłym polu TW, kierunki G układają się w linie, tworząc wzór trzech wzajemnie ortogonalnych trajektorii głównych kierunków wzrostu (trajektorii kierunków G). Gdy wzrost jest stacjonarny, tj. gdy rozmieszczenie szybkości wzrostu wewnątrz organu nie zmienia się, wzór trajektorii kierunków G jest stabilny. Tego typu stabilne wzory kierunków G występują w merystemach wierzchołkowych, w wierzchołku korzenia, w okresie wzrostu pierwotnego i wierzchołku pędu, w fazie wegetatyw-



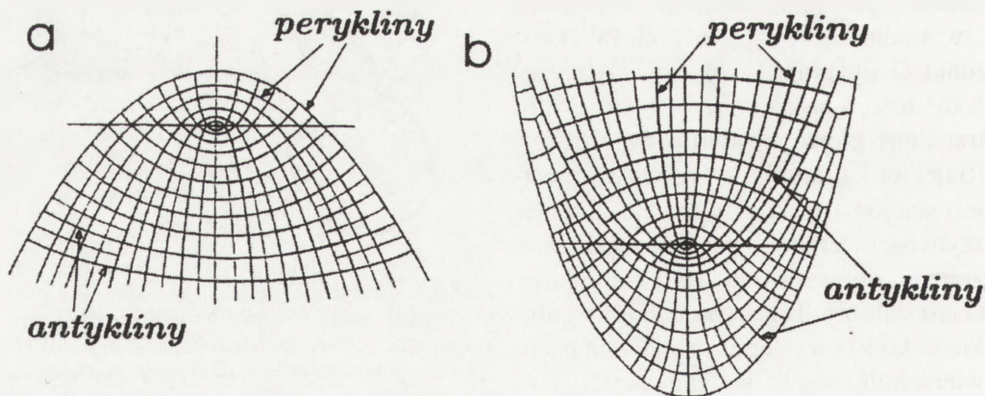
RYSUNEK 1. Indykatrysy ilustrujące zmienność REG_l w różnych kierunkach, w wybranych punktach wierzchołka korzenia. W jednym z punktów zaznaczono główne kierunki wzrostu: a , p , l . Pary tych kierunków tworzą płaszczyzny główne (dwa typy płaszczyzn zacieniowano). Górne odcinki indykatrys ograniczone płaszczyznami głównymi zostały wykrojone.

nej. Przekonamy się, że ma to znaczenie dla orientacji podziałów komórek w merystemie.

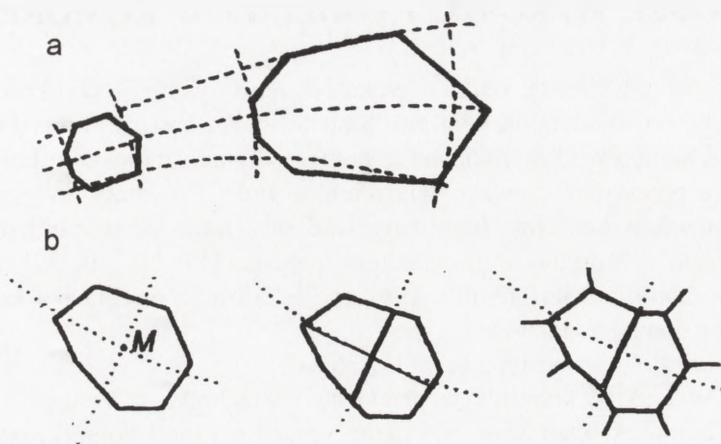
2. HIPOTEZA HEJNOWICZA: KOMÓRKI DZIELĄ SIĘ W PŁASZCZYZNACH WYZNACZONYCH PRZEZ GŁÓWNE KIERUNKI WZROSTU

Układy komórek w organach roślinnych cechuje wysoki stopień zorganizowania. U podstaw tego zorganizowania leżą wzrost symplastyczny i „przepisy”, według których komórki dzielą się w trakcie wzrostu. Już pod koniec ubiegłego stulecia Sachs zauważył [43], że siatkę ścian komórkowych w centralnym przekroju podłużnym przez wierzchołki korzenia i pędu daje się opisać dwoma rodzinami wzajemnie ortogonalnych linii (rys. 2), które nazywał peryklinami i antyklinami. Pomimo, że indywidualne komórki rosną i przesuwają się względem komórek inicjalnych w trakcie wzrostu, wzór peryklin i antyklin pozostaje stabilny. Jak to możliwe?

Odpowiedź dały badania oparte na tensorze wzrostu. Wynioskowano z nich [16, 17], że perykliny i antykliny reprezentują wzór trajektorii kierunków G . Okazało się przy tym, że aby wzór peryklin i antyklin był zachowywany w trakcie wzrostu, nowe ściany komórkowe muszą podtrzymywać dotychczasowe peryklinalne, względnie antyklinalne ułożenie tych linii. Stąd, Hejnowicz [16, 17] wysunął hipotezę, że komórki dzielą się w płaszczyznach wyznaczonych przez kierunki G . Z hipotezy tej wynika, że indywidualne komórki mają zdolność „wyczuwania” głównych kie-



RYSUNEK 2. Wzory peryklin i antyklin w merystemach wierzchołkowych: a – pędu, b – korzenia [43]



RYSUNEK 3. Wzrost komórki (a) i podział komórki (b). W trakcie wzrostu pole powierzchni wielokąta opisującego komórkę powiększa się. Z chwilą przekroczenia rozmiarów przyjętych za krytyczne, komórka ulega podziałowi. Podział odbywa się w głównym kierunku wzrostu (kierunku G). Ściana podziałowa przechodzi przez punkt *M* określony losowo w pobliżu środka komórki. Jest styczna do tego spośród dwóch kierunków G, w którym może być krótsza (odnośnie szczegółów procedury patrz tekst). Linie przerywane u góry i linie kropkowane na dole reprezentują trajektorie kierunków G

runków wzrostu, których wzór dotyczy organu. To może być kluczem do zrozumienia zasad tworzenia wzorów komórek w merystemie.

Istnieje kilka hipotez dotyczących podziałów komórek. Hofmeister postulował [23], że komórka dzieli się prostopadłe do kierunku największego wzrostu, co oznacza zwykle, że prostopadłe do swojej długiej osi. Według Sachsa [42], ściana podziałowa wstawiana jest pod kątem prostym do istniejących ścian. Errera [6], wysunął pogląd, że komórka dzieli się na pół tak, że pole powierzchni ściany podziałowej jest minimalne. Współcześnie, w oparciu o badania rozkładu naprężeń wewnątrz organu, Lintilhac [26, 27] wysunął hipotezę, że ściana podziałowa zlokalizowana jest w płaszczyźnie wolnej od naprężeń ścinających, co oznacza, że dąży do tego, aby siły styczne na nią działające były jak najmniejsze. Zatem i tutaj, podobnie jak u Hejnowicza, liczy się pewien ponadkomórkowy wzór. Zdolność wyczuwania takiego wzoru, jeśli chodzi o naprężenia, potwierdzono eksperymentalnie [28].

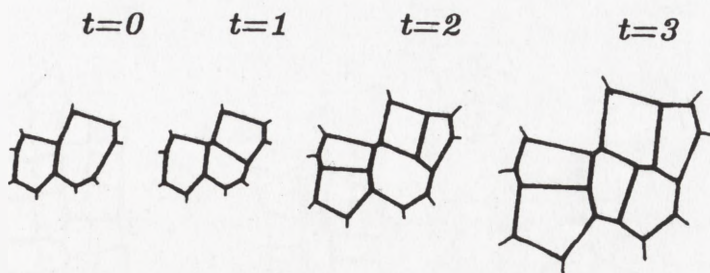
Wzrost i podziały komórek można generować przy użyciu komputera. W oparciu o tensor wzrostu i hipotezę Hejnowicza zbudowano symulacyjny, dwuwymiarowy model wzrostu, w którym komórki dzielą się w kierunkach G. Poniżej opisano podstawowe założenia modelu i wyniki symulacji wzrostu otrzymane dla dwóch konkretnych merystemów wierzchołkowych, a mianowicie, wierzchołka pędu siewki świerka i wierzchołka korzenia rzodkiewki.

3. MODEL WZROSTU I PODZIAŁÓW KOMÓREK

W skład modelu wchodzi: siatka wielokątów, tensorowe pole szybkości wzrostu (pole TW) i algorytm podziałów komórek. Siatka wielokątów (nazywana dalej siatką) opisuje układ komórek. Otrzymuje się ją poprzez digitalizację wzoru komórek pochodzącego z przekroju osiowego wierzchołka. Pole TW służy do generowania wzrostu i podziałów komórek. Matematycznie, otrzymuje się je z układu równań na V . Podejście to opisano w poprzednich pracach [17, 19, 20, 32]. Algorytm podziałów komórek zawiera reguły dotyczące lokalizacji, orientacji i szczegółów zamocowania ściany podziałowej.

Założenia modelu są następujące [35, 36]:

1. Pole TW i układ komórek w przekroju wierzchołka są znane.
2. Układ komórek opisywany jest przez siatkę, w której komórki widziane w przekroju reprezentowane są przez wielokąty (wypukłe, o dowolnym kształcie). W jednym węźle siatki zbiegają się boki trzech wielokątów.
3. Wzrost jest wynikiem działania pola TW na siatkę. Losy indywidualnych komórek zależą od lokalizacji tych komórek w polu TW.
4. W trakcie wzrostu komórka powiększa się. Nowe współrzędne wielokąta reprezentującego komórkę po czasie Δt otrzymuje się ze „starych” współrzędnych (rys. 3a) przez całkowanie równań na prędkość przesunięć V (dopowiadającą danemu polu TW).
5. Komórka dzieli się, gdy pole powierzchni wielokąta przekroczy wartość przyjętą za krytyczną. Wtedy wielokąt reprezentujący dzielącą się komórkę zastępowany jest przez dwa inne przyległe wielokąty, które od tej pory reprezentować będą komórki potomne (rys. 3b). Pole powierzchni staje się krytyczne, gdy przekroczy średnie pole powierzchni komórek o połowę.
6. Lokalizację ściany podziałowej determinuje punkt M określony losowo wewnątrz niewielkiego okręgu poprowadzonego z geometrycznego środka komórki (rys. 3b). Przyjęto, że promień okręgu równy jest odległości od środka komórki do najbliższego boku.
7. Orientacja nowotworzonej ściany podziałowej zależy od kierunków G w punkcie M . W płaszczyźnie wielokąta, przez punkt M przechodzą dwa kierunki G (trzeci jest do nich prostopadły). Komórka dzieli się w tym spośród obu kierunków, w którym ściana podziałowa może być krótsza (rys. 3b).
8. Nowa ściana tworzona jest tak aby, podobnie jak w punkcie 2, w jednym węźle spotykały się co najwyżej 3 komórki.
9. W chwili wstawienia ściany podziałowej modyfikowane są kąty, jakie ściana podziałowa tworzy ze ścianami komórki rodzicielskiej. Modyfikacja dokonywana jest przez skrócenie ściany podziałowej o określony procent jej pierwotnej długości. Przyjęto, że jest to 7% (dla wszystkich komórek w merystemie).

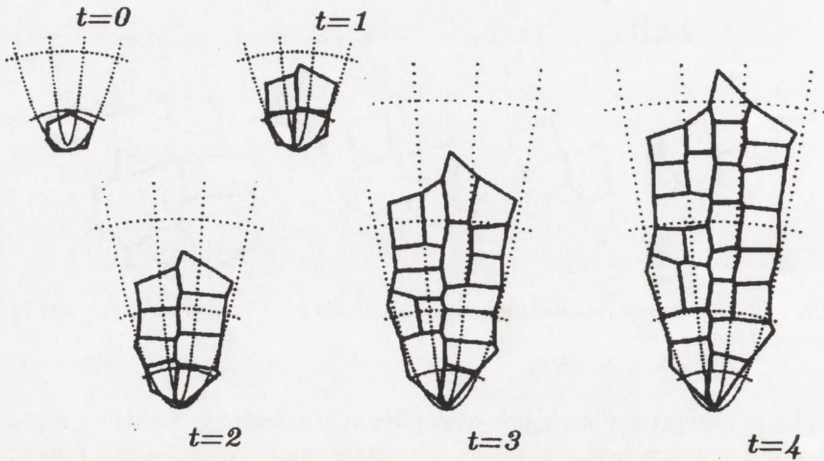


RYSUNEK 4. Przykład zastosowania algorytmu w odniesieniu do dwóch sąsiadujących ze sobą komórek (objaśnienia w tekście)

Symulacja przeprowadzana jest następująco. Zakładamy, że siatka reprezentuje układ komórek wierzchołka w $t = 0$. Działanie pola TW na siatkę powoduje deformację siatki. W trakcie deformacji w siatce pojawiają się coraz to nowe komórki (w wyniku podziałów komórek). W ten sposób wierzchołek rozrasta się. Wprowadzając siatkę z komputera co pewien czas otrzymujemy sekwencję pokazującą, jak wprowadzony na wejściu układ komórek zmienia się w czasie.

Jak pracuje algorytm? Na rysunku 4 pokazano podziały w dwóch sąsiadujących ze sobą komórkach. Komórka po lewej stronie podzieliła się w $t = 3$. Komórka po prawej stronie podzieliła się w $t = 2$, potem podzieliły się jej potomne, ostatecznie otrzymaliśmy z niej tetradę komórek. Komórki nie rosły zatem jednakowo, ponadto podziały komórek mogły być nierówne (zależały od lokalizacji punktu M względem środka komórki). Zauważmy, że nowa ściana nie łączy się z węzłem już istniejącej komórki, a dzięki jej skróceniu, kąty, jakie tworzy ta ściana ze ścianami komórki macierzystej, są realistyczne (przy braku skrócenia byłyby to kąty proste).

Na rysunku 5 pokazano, w jaki sposób powstaje kompleks komórek (grupa komórek o wspólnym pochodzeniu). Z jednej komórki, w wyniku wzrostu i sukcesywnych podziałów tej komórki i komórek w stosunku do niej potomnych, w kolejnych czasach powstaje coraz to bardziej liczna grupa komórek. Weźmy pod uwagę orientację podziałów komórek. Wszystkie nowopowstałe ściany leżą w głównych kierunkach wzrostu, są styczne do jednej z trajektorii kierunków G (wzór kierunków G reprezentują linie kropkowane). Stąd układ komórek wewnątrz kompleksu jest uporządkowany, przejawia się w nim wzór trajektorii kierunków G . Zauważmy, że ściany komórkowe układają się w charakterystyczne zygzaki znane z preparatów anatomicznych. Zygzaki biegą wzdłuż trajektorii kierunków G , charakterystyczne załamania powstają w wyniku podziałów komórek zachodzących prostopadle w stosunku do danej trajektorii.

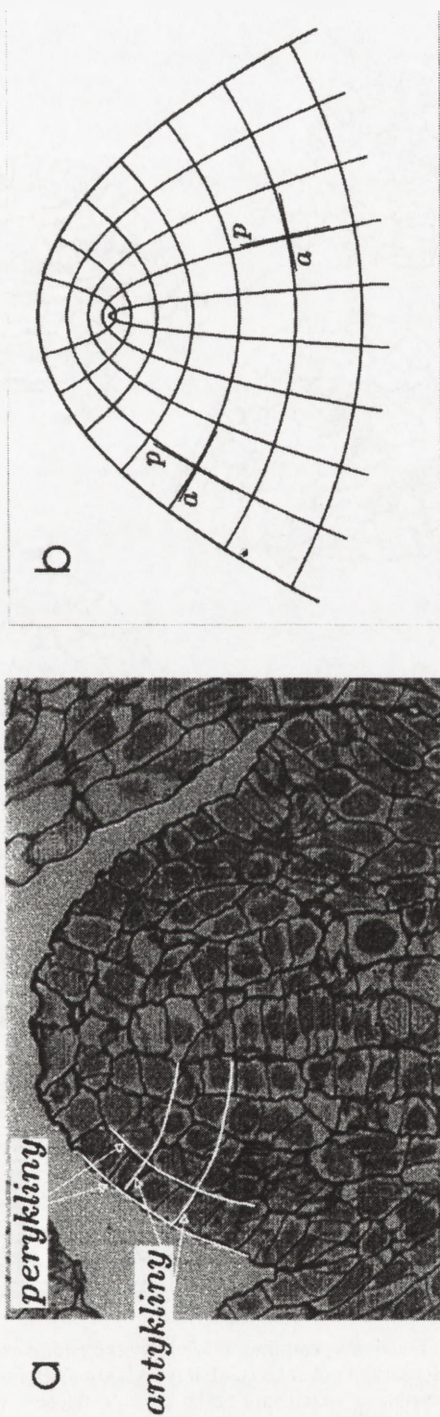


RYSUNEK 5. Powstawanie kompleksu komórek. Komórki dzielą się z uwzględnieniem głównych kierunków wzrostu. W układzie komórek przejawia się wzór trajektorii tych kierunków (reprezentowany przez linie kropkowane)

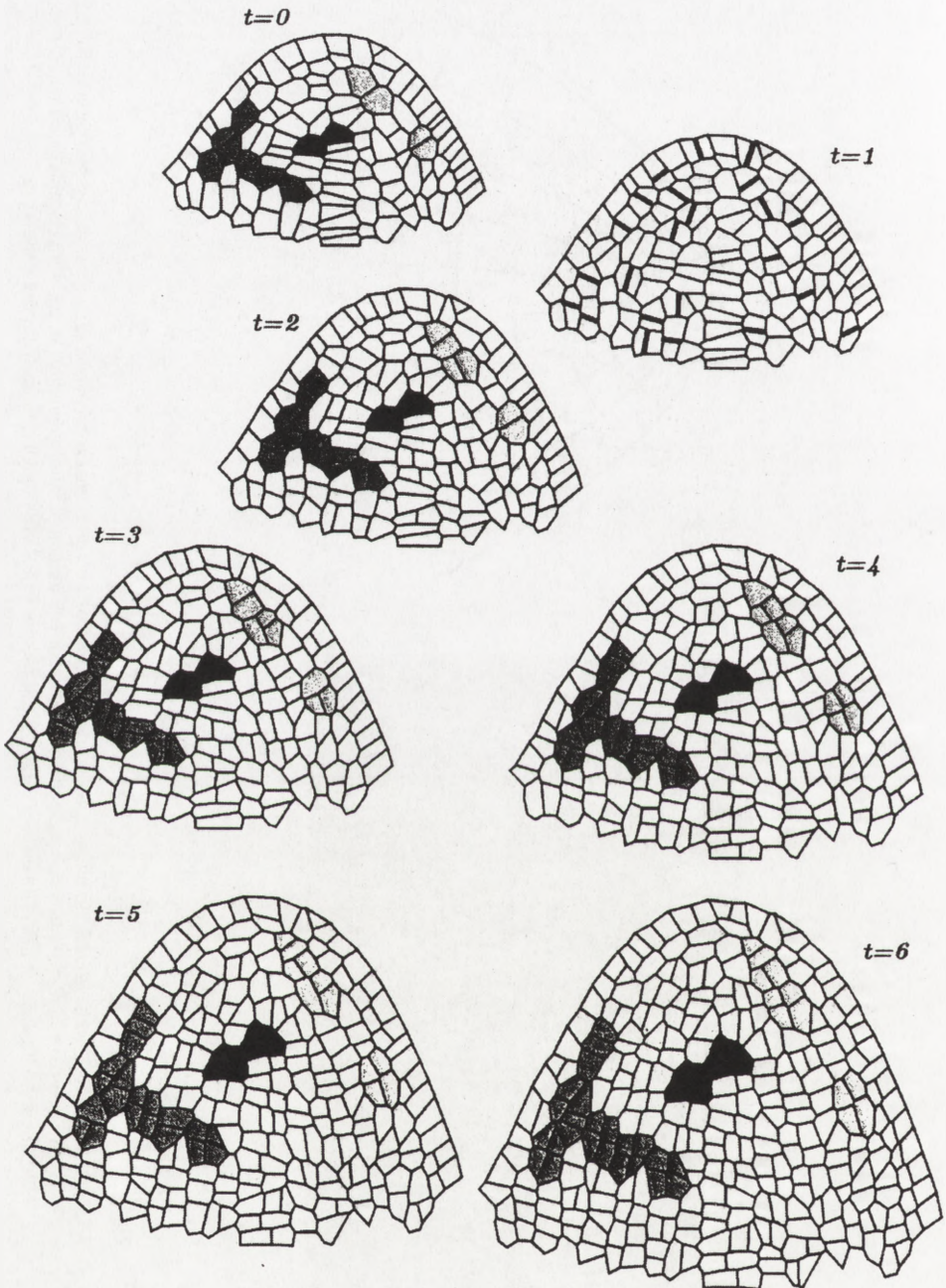
4. ZASTOSOWANIE MODELU DO SYMULACJI WZROSTU MERYSTEMÓW WIERZCHOŁKOWYCH PĘDU I KORZENIA

Weźmy pod uwagę konkretny wierzchołek. Rozważmy najpierw wierzchołek pędu siewki świerka. Przekrój osiowy wierzchołka pokazano na rysunku 6a. Obok, na rysunku 6b mamy wzór trajektorii kierunków G pola TW określonego dla tego wierzchołka. Rozmieszczenie REG_1 w tym polu opisano w poprzednich pracach [20, 31]. Charakteryzuje się ono tym, że wzrost powierzchniowy na powierzchni wierzchołka jest izotropowy, tj. jednakowy w każdym punkcie (wyłącznie w płaszczyźnie stycznej do powierzchni), podczas gdy wzrost w płaszczyźnie przekroju osiowego jest anizotropowy, w każdym punkcie tej płaszczyzny REG_1 w kierunku peryklinalnym jest większe niż REG_1 w kierunku antyklinalnym.

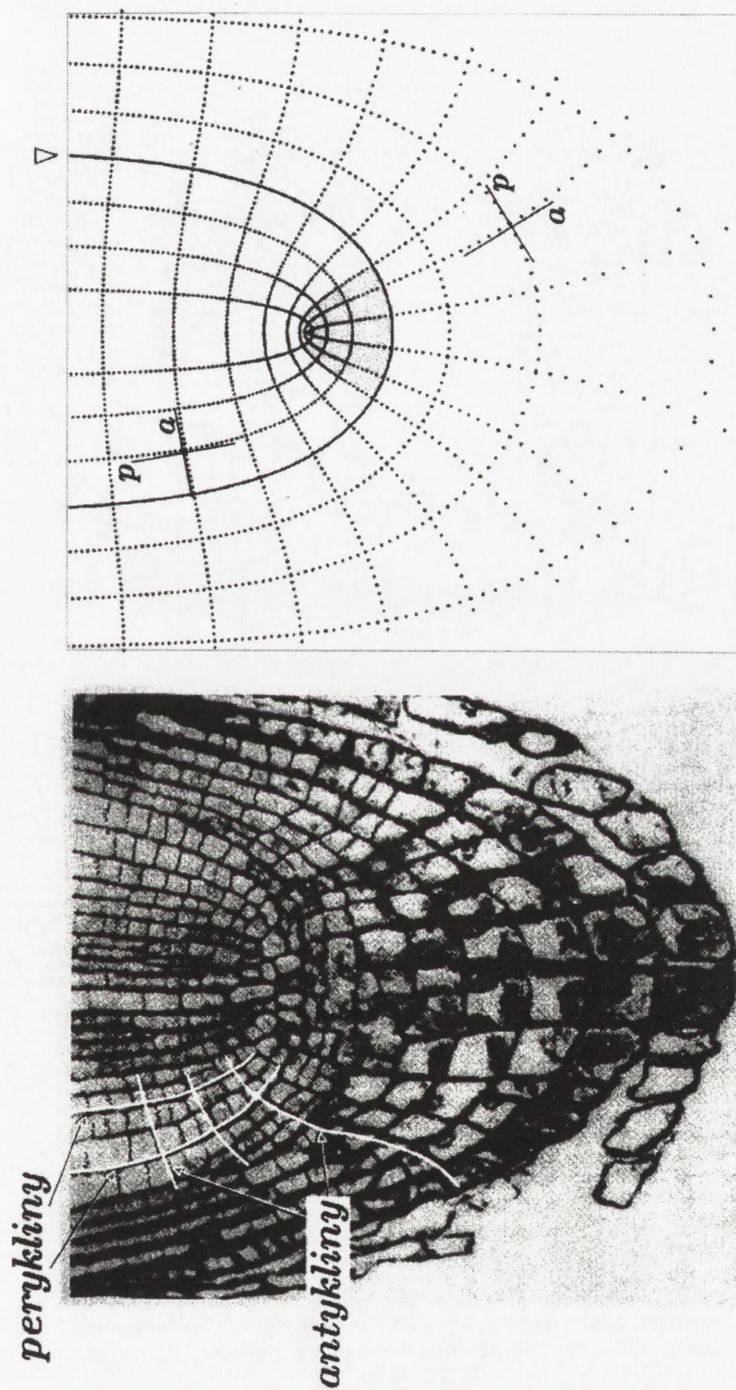
Sekwencje wzrostu i podziałów komórek w omawianym wierzchołku pokazano na rysunku 7. W $t = 0$ mamy siatkę odzwierciedlającą układ komórek pokazany wcześniej na rysunku 6a. W kolejnych czasach wierzchołek rozrasta się. W trakcie wzrostu zachowuje dotychczasowy „czasowaty” kształt. Ponieważ wzrost w płaszczyźnie przekroju osiowego jest anizotropowy, kompleksy komórek są wydłużone w kierunku peryklinalnym. W $t=4$ zaznaczono wszystkie ściany powstałe w przedziale czasu od $t = 0$ do $t = 4$. Większość podziałów komórek to podziały antyklinalne, choć zdarzają się też podziały peryklinalne, natomiast podziałów zorientowanych inaczej nie ma (algorytm nie dopuszcza orientacji niezgodnych z



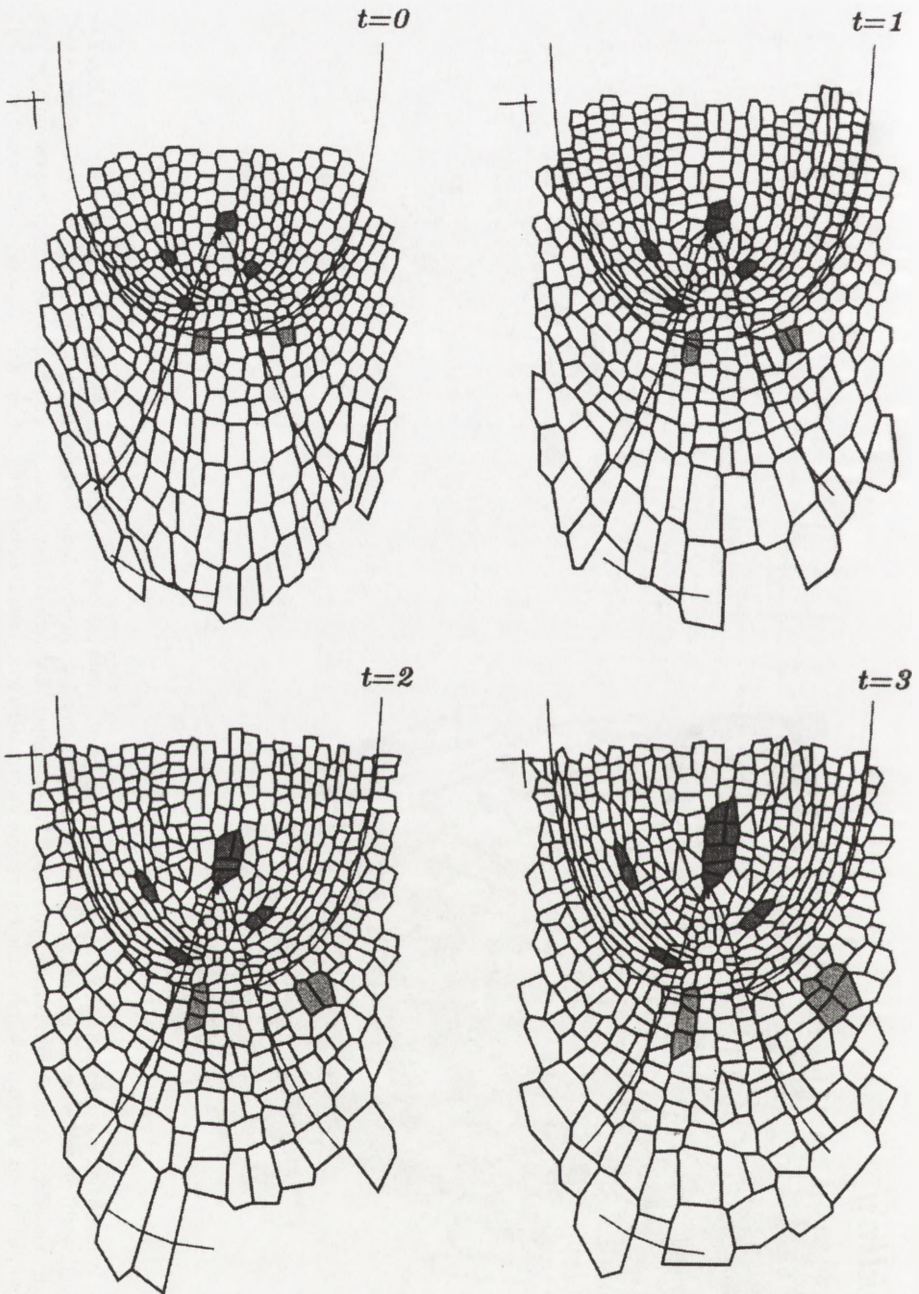
RYSUNEK 6. Wierzchołek pędu siewki świerka: (a) układ komórek w przekroju osiowym; zaznaczono przykładowe perykliny i antykliny, (b) postulowany wzór trajektorii kierunków G reprezentowany przez linie współrzędnych układu paraboloidalnego. W wybranych punktach zaznaczono kierunki peryklinalny – *p* i anyklinalny – *a* (trzeci z kierunków G jest prostopadły do płaszczyzny rysunku)



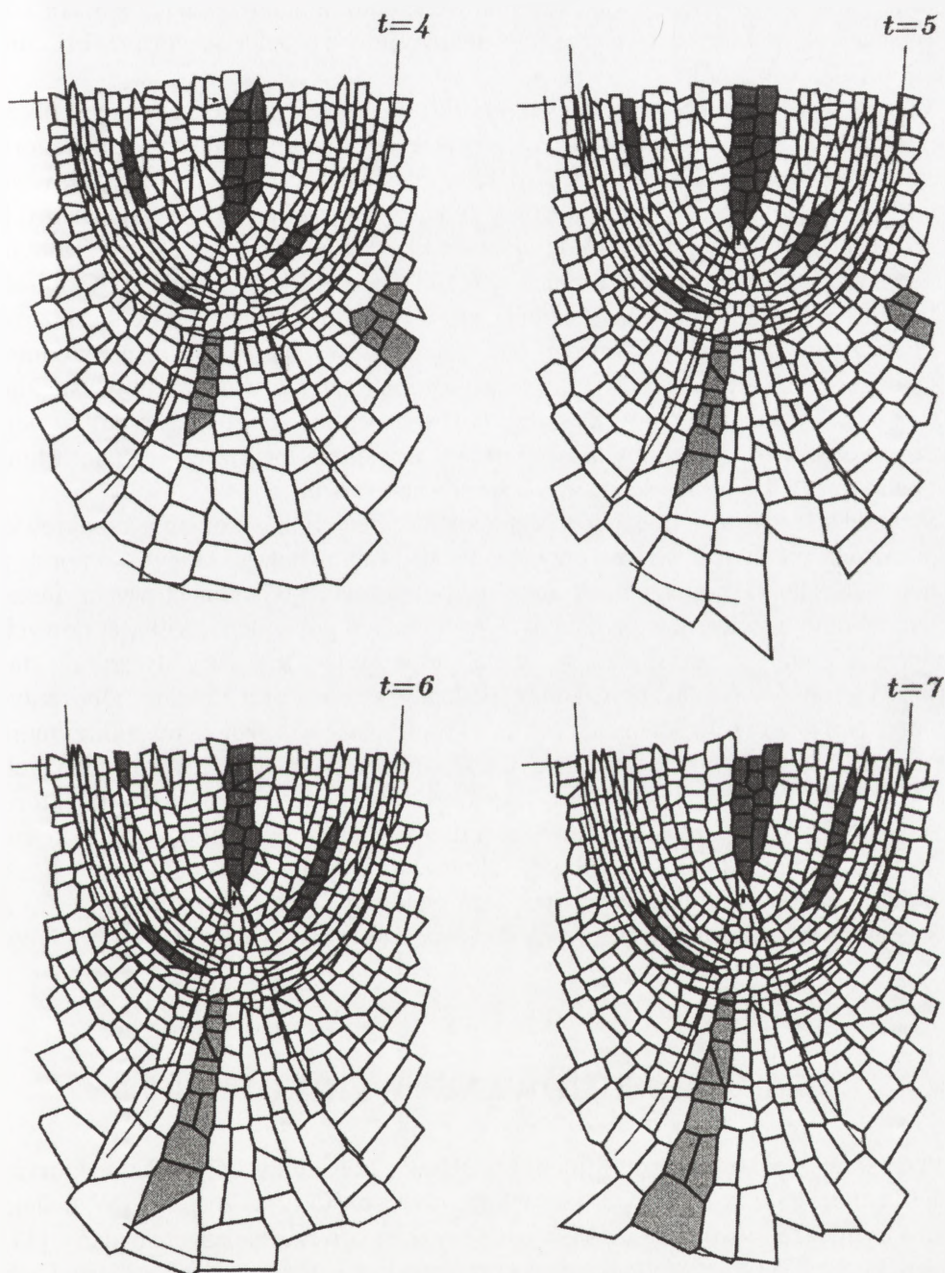
RYSUNEK 7. Sekwencja wzrostu i podziałów komórek w wierzchołku pędu świerka. W $t=0$, wybrane komórki zacieniowano, w kolejnych czasach pokazano podziały tych komórek i ich potomnych. W $t=4$, zaznaczono ściany podziałowe powstałe w przedziale czasu od $t=0$, do $t=4$. Komórki dzielą się w kierunkach G albo peryklinalnie, albo antyklinalnie



RYСУNEK 8. Wierzchołek korzenia rzodkiewki: (a) układ komórek w przekroju osiowym (według Kadej i Kadej [25]), zaznaczono przykładowe perykliny i antykliny, (b) postulowany wzór trajektorii kierunków G reprezentowany przez linie współrzędnych ortogonalnego, korzeniowego układu współrzędnych (odnośnie układu współrzędnych patrz [19]). W wybranych punktach korzenia właściwego i czapeczki zaznaczono kierunki peryklinalny - p i anyklnalny - a . Strzałka pokazuje granicę pomiędzy korzeniem właściwym, a czapeczką. Obszar zacięniowany reprezentuje strefę rzadko dzielących się komórek (*Quiescent Centre*)



RYSUNEK 9. Sekwencja wzrostu i podziałów komórek w wierzchołku korzenia rzodkiewki. W $t=0$, wybrane komórki zaciemniono, w kolejnych czasach, powstały z nich rozbudowane kompleksy komórek. Pole TW reprezentowane jest przez dwie trajektorie kierunków G (cienkie linie), jedna odpowiada



granicy pomiędzy korzeniem właściwym, a czapeczką, druga odpowiada granicy QC od strony proksymalnej. Komórki dzielą się w głównych kierunkach wzrostu. Wzór komórek sam siebie podtrzymuje w trakcie wzrostu. Komórki na peryferiach wierzchołka, które wyszły poza obszar symulacji (reprezentowany przez trzy krótkie odcinkami linii po lewej stronie wierzchołka) nie były rysowane

kierunkami G). Symulacja trwała stosunkowo krótko, niemniej widać, że wzór komórek wewnątrz wierzchołka pozostaje realistyczny i w pierwszym przybliżeniu stabilny.

Weźmy teraz wierzchołek korzenia. Na rys. 7a pokazano przekrój osiowy przez wierzchołek korzenia rzodkiewki. Wierzchołek tego gatunku należy do kategorii wierzchołków mających strefę rzadko dzielących się komórek znaną jako *Quiescent Centre* (QC) [1, 2, 8, 47]. Strefa ta występuje powszechnie u okrytonasiennych [3, 47]. Na rysunku 7b mamy układ trajektorii kierunków G w polu TW określonym dla tego wierzchołka. Rozmieszczenie szybkości wzrostu w wierzchołku z QC opisali Hejnowicz i Karczewski [19]. Podobnie jak w wierzchołku pędu świerka, wzrost w płaszczyźnie przekroju osiowego jest anizotropowy ale inny niż poprzednio. Zasadnicza różnica polega na tym, że na biegunie korzenia właściwego występuje obszar odpowiadający QC. W obszarze tym wzrostu nie ma, podczas gdy w najbliższym otoczeniu QC odpowiadającym pod względem lokalizacji inicjałom funkcjonalnym [1, 47], wartości $RERG_l$ są stosunkowo duże.

Symulację wzrostu i podziałów komórek w wierzchołku korzenia rzodkiewki pokazano na rysunku 9. Siatka przyjęta dla $t=0$ odpowiada układowi komórek z rysunku 8a. Dla $t>0$ wierzchołek zaczyna się rozrastać. Symulacja trwała dłużej niż poprzednio u świerka, w przeciągu całej symulacji pojawiło się kilkaset nowych komórek. Zgodnie z założeniem, wszystkie nowe ściany to ściany styczne do trajektorii kierunków G. Jak poprzednio, podziały są albo peryklinalne, albo antyklinalne. Nowotworzone ściany uzupełniają i w pierwszym przybliżeniu podtrzymują dotychczas istniejący układ komórek. Część ścian komórkowych wprowadzonych w $t = 0$ była skośna w stosunku do trajektorii kierunków G (odnośnie trajektorii kierunków G patrz rys. 8b). Te ściany, stosunkowo nieliczne, nadal pozostają skośne w stosunku do trajektorii kierunków G, ale nie ma to wpływu na całościowy wzór komórek. Ostatecznie, układ komórek jest regularny, stosunkowo stabilny i z upływem czasu, coraz to bardziej przejawia się w nim wzór trajektorii kierunków G.

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Przedstawiono komputerowy model wzrostu i podziałów komórek, w którym komórki dzielą się w głównych kierunkach wzrostu. O tym, że pole TW nadaje się do symulacji wzrostu wiadomo było z szeregu wcześniejszych badań [17, 18, 19, 33, 34, 37]. Wtedy jednak, nie generowano podziałów komórek w kierunkach G w sposób automatyczny. Możliwość tę zapewnia dopiero opisany tu model.

W każdym modelu przeznaczonym do generowania podziałów komórek, istnieje algorytm z przepisami, według których komórki dzielą się w trakcie wzrostu. Modele

proponowane przez innych badaczy [4, 9, 24, 29, 30, 40] nie brały pod uwagę tensorowych cech wzrostu, w szczególności tego, że organ rośnie symplastycznie. Dlatego przepisy zawarte w stosowanych w nich algorytmach dotyczyły jedynie indywidualnych komórek. Opisany model wyróżnia się tym, że generuje podziały komórek w kierunkach G , a to oznacza to, że komórki wyczuwały wzór tych kierunków. Ponieważ wzór kierunków G dotyczy organu, jest to pierwszy przypadek, w którym poziom organu został uwzględniony w algorytmie.

Hipotezę mówiącą o tym, że podziały komórek w odbywają się w płaszczyznach wyznaczonych przez kierunki G uwzględniono w sposób dosłowny, w tym sensie, że nowa ściana była styczna do jednej z trajektorii kierunków G . Dało to dobre rezultaty, generowane wzory komórek były realistyczne i w pierwszym przybliżeniu same siebie podtrzymywały w trakcie wzrostu. Wskazuje to, że hipoteza Hejnowicza nie daje się, jak na razie, sfalsyfikować.

Zadowolające wyniki symulacji nie negują innych hipotez dotyczących podziałów komórek, bowiem hipotezy te są szczególnym przypadkiem zwierającym się w hipotezie Hejnowicza. Dla przykładu, ściana wstawiona zgodnie z postulatem Hofmeistera [23], leży w płaszczyźnie wyznaczonej przez kierunki G , bo na ogół jeden z kierunków G jest kierunkiem najszybszego wzrostu. Podobnie jest z postulatami Sachsa [42] i Errery [6]. Robiono próby modyfikacji zastosowanego tu algorytmu [36]. Sprowadzały się one do osłabienia rygoru wstawiania ściany podziałowej w kierunkach G i uwzględnieniu hipotezy Sachsa. Generowane wzory komórek były jednak mniej realistyczne. Z innych badań wiemy [35], że w obszarach, gdzie kierunki G są słabo widoczne i w związku z tym wydawałoby się, że hipoteza Hejnowicza jest mniej uzasadniona, całościowy wzór kierunków G (można o nim wnioskować w oparciu o te rejony organu, gdzie kierunki G są wyraźne), też jest przynajmniej częściowo uwzględniany. Oznaczałoby to, że zawarta w tensorowym polu szybkości wzrostu informacja o wzorze trajektorii kierunków G dociera do dzielącej się komórki nawet wtedy, gdy kierunki G w miejscu lokalizacji komórki nie są wyraźne.

Z rozważań Hejnowicza w innym miejscu tego zeszytu wiemy, że istnieje związek pomiędzy wzrostem, a naprężeniami. W rosnącym organie obok rozkładu głównych kierunków wzrostu, występuje określony rozkład głównych kierunków naprężeń. W ciałach stałych izotropowych, w których odkształcenia są odwracalne, relacja pomiędzy kierunkami głównymi odkształcenia, a kierunkami głównymi naprężenia jest jasna, kierunek maksymalnego odkształcenia pokrywa się z kierunkiem maksymalnego naprężenia [5]. Wzrost to odkształcenie nieodwracalne, ponadto, tkanka roślinna, ze względu na swoją niejednorodną strukturę i turgor, jest bardziej złożona pod względem właściwości mechanicznych [10, 38], w porównaniu z najczęściej rozpatrywanymi ciałami stałymi. Stąd zdarza się, że kierunek maksymalnego wzrostu nie pokrywa się z kierunkiem maksymalnego naprężenia. Jednak nawet wtedy, główne kierunki wzrostu zgadzają się z głównymi kierunkami naprężeń (bo na

przykład, kierunek maksymalnego wzrostu pokrywa się z kierunkiem, w którym naprężenie jest minimalne). Zatem zakładając podziały komórek w głównych kierunkach wzrostu, uwzględnialiśmy także główne kierunki naprężeń.

6. WNIOSKI

1. Można generować wzrost organu przy użyciu tensora wzrostu wyspecyfikowanego dla tego organu. Warunkiem jest znajomość tensorowego pola szybkości wzrostu wraz z wzorem głównych kierunki wzrostu koniecznym dla określenia kierunków podziałów komórek.
2. Założenie podziałów komórek w głównych kierunkach wzrostu pozwala otrzymać realistyczne i stosunkowo stabilne wzory komórek. Wynika stąd, że hipoteza mówiąca o tym, że ściany podziałowe tworzą się w płaszczyznach wyznaczonych przez te kierunki, nie daje się sfałszyfikować.
3. W badaniach teoretycznych, w których formułowane są algorytmy na podziały komórek, bierze się pod uwagę przede wszystkim indywidualne komórki. W przedstawionym modelu, komórki wyczuwały główne kierunki wzrostu. Ponieważ wzór tych kierunków dotyczy organu, jest to pierwszy przypadek, w którym poziom organu został uwzględniony w algorytmie.

LITERATURA

- [1] BARLOW PW. Cellular patterning in root meristems: Its origins and significance. [w] Waisel Y, Eshel A, Kafafi U [red.], *Plant roots. The hidden half*. New York: Marcel Dekker Inc. 1996: 77–109.
- [2] CLOWES FAL. Localisation of nucleic acids synthesis in root meristems. *J Exp Bot* 1956; **7**: 397–312.
- [3] CLOWES FAL. *Apical meristems*. Oxford: Blackwell Scientific Publ 1961.
- [4] DE BOER MJM, FRACCHIA FD, PRUSINKIEWICZ P. A model for cellular development in morphogenetic fields. [w] Rozenberg G, Salomaa A [red.] *Lindenmayer systems: Impact on Theoretical Computer Science, Computer Graphics, and Developmental Biology*. Berlin: Springer-Verlag 1992: 351–370.
- [5] DERSKI W. *Zarys mechaniki ośrodków ciągłych*. Warszawa: PWN 1975.
- [6] ERRERA L. Über Zellformen und Seifenblasen. *Bot Centralbl* 1888; **34**: 395–398.
- [7] ERICKSON RO. Symplastic growth and symplasmic transport. *Plant Physiol* 1986; **82**: 1153
- [8] FELDMAN LJ. The development and dynamics of the root apical meristem. *Amer J Bot* 1984; **71**: 1308–1314.
- [9] FRACCHIA FD, PRUSINKIEWICZ P, DE BOER MJM. Animation of the development of multicellular structures. [w] Magnenat-Thalmann N, Thalmann D [red.], *Computer Animation90*. Tokyo: Springer-Verlag 1990: 1–19.

- [10] FUNG YC. Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissues. New York: Springer-Verlag 1981.
- [11] GANDAR PW. Analysis of growth and cell production in root apices. *Bot Gaz* 1980; **141**: 131–138.
- [12] GANDAR PW. Growth in root apices. I. The kinematic description of growth. *Bot Gaz* 1983; **144**: 1–10.
- [13] GREEN PB. Growth and cell pattern formation on an axis: critique of concepts, terminology, and modes of study. *Bot Gaz* 1976; **137**: 187–202.
- [14] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych Warszawa.: PWN 1980.
- [15] HEJNOWICZ Z. Vector and scalar fields in modeling of spatial variations of growth rates within plant organs. *J Theor Biol* 1982; **96**: 161–173.
- [16] HEJNOWICZ Z. Trajectories of principal directions of growth, natural coordinate system in growing plant organ. *Acta Soc Bot Pol* 1984; **53**: 29–42.
- [17] HEJNOWICZ Z. Differential growth resulting in the specification of different types of cellular architecture in root meristems. *Environ Exp Bot* 1989; **29**: 85–93.
- [18] HEJNOWICZ Z, HEJNOWICZ K. Modeling the formation of root apices. *Planta* 1991; **184**: 1–7.
- [19] HEJNOWICZ Z, KARCZEWSKI J. Modeling of meristematic growth of root apices in a natural coordinate system. *Amer J Bot* 1993; **80**: 309–315.
- [20] HEJNOWICZ Z, NAKIELSKI J, HEJNOWICZ K. Modeling of spatial variations of growth within apical domes by means of the growth tensor. II. Growth specified on dome surface. *Acta Soc Bot Pol* 1984; **53**: 301–316.
- [21] HEJNOWICZ Z, ROMBERGER JA. Growth tensor of plant organs. *J Theor Biol* 1984; **110**: 93–114.
- [22] HEJNOWICZ Z, ROMBERGER JA. Calculation of rates of cell division in shoot meristems with reference to the growth tensor. *J Theor Biol* 1986; **121**: 59–71.
- [23] HOFMEISTER W. Zusätze und Berichtigungen zu den 1851 veröffentlichten Untersuchungen der Entwicklung höherer Kryptogamen. *Jahrbucher für Wissenschaft und Botanik* 1863; **3**: 259–293.
- [24] HONDA H. Geometrical model for cells in tissues. *Inter Rev Cytol* 1983; **81**: 191–248.
- [25] KADEJ F, KADEJ A. Ultrastructure of the rootcap in *Raphanus sativus*. *Acta Soc Bot Pol* 1970; **39**: 733–737.
- [26] LINTILHAC PM. Differentiation, organogenesis, and the tectonics of cell wall orientation. II. Separation of stresses in a two-dimensional model. *Am J Bot* 1974a; **61**: 135–140.
- [27] LINTILHAC PM. Differentiation, organogenesis, and the tectonics of cell wall orientation. III. Theoretical considerations of cell wall mechanics. *Am J Bot* 1974b; **61**: 230–237.
- [28] LYNCH TM, LINTILHAC PM. Mechanical signals in plant development: A new method for single cell studies. *Developmental Biol* 1997; **191**: 246–256.
- [29] MATELA RJ, RANSOM R. A topological model of cell division: Structure of the computer program. *BioSystems* 1985; **18**: 65–78.
- [30] MOMBACH JCM, DE ALMEIDA RMC, IGLESIAS JR. Mitosis and growth in biological tissues. *Physical Review E* 1993; **48**: 598–602.
- [31] NAKIELSKI J. Spatial variations of growth within domes having different patterns of principal growth directions. *Acta Soc Bot Pol* 1987; **56**: 611–623.
- [32] NAKIELSKI J. Distribution of linear growth rates in different directions in root apical meristems. *Acta Soc Bot Pol* 1991; **60**: 77–86.
- [33] NAKIELSKI J. Regeneration in the root apex; Modelling study by means of the growth tensor. [w] Karalis TK [red.] Mechanics of Swelling., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag NATO ASI Series 1992; vol. H **64**: 179–191.
- [34] NAKIELSKI J. Growth field and cell displacements within the root apex. [w] Alt W, Deutsch A, Dunn G [red.] Dynamics and Cell Tissue Motion. Basel: Birkhauser 1997: 267–274.

- [35] NAKIELSKI J. Tensorial model for growth and cell division in the shoot apex. [w] Gromow M, Carbone A [red.] Pattern formation in biology, dynamics and computer sciences. World Scientific Publishing 1999 (w druku).
- [36] NAKIELSKI J. Tensorowy model wzrostu w zastosowaniu do wierzchołka korzenia. Praca hab. 1999 (w druku)
- [37] NAKIELSKI J, BARLOW PW. Principal directions of growth and the generation of cell patterns in wild-type and gib-1 mutant roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown *in vitro*. *Planta* 1995; **196**: 30–39.
- [38] NIKLAS KJ. Plant Biomechanics. An Engineering Approach to plant Form and Function. The Univ. of Chicago Press 1992.
- [39] PRIESTLEY JH. Studies in the physiology of cambial activity.II. The concept of sliding growth. *New Phytol* 1930; **29**: 96–140.
- [40] PRUSINKIEWICZ P. Visual models of morphogenesis. *Artificial Life* 1994; **1**: 61–74.
- [41] RICHARDS OW, KAVANAGH AJ. The analysis of the relative growth gradients and changing form of growing organisms: Illustrated by Tobacco leaf. *Amer Nat* 1943; **77**: 385–399.
- [42] SACHS J. Ueber die Anordnung der Zellen in jüngsten Pflanzenteilen. *Arb. d. bot. Inst. in Würzburg* 1878 II: 46–104.
- [43] SACHS J. Lecture XXVII. Relations between growth and cell-division in the embryonic tissues. In *Lectures in Plant Physiology*. Oxford UK: Clarendon Press 1887: 431–459.
- [44] SILK WK. Quantitative descriptions of development. *Ann Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 479–518.
- [45] SILK WK. Steady form from changing cells. *Int J Plant Sci* 1992; **153**: S49–S58.
- [46] SILK WK, ERICKSON RO. Kinematics of plant growth. *J Theor Biol* 1979; **76**: 481–501.
- [47] WEBSTER PL, McLEOD RD. The root apical meristems and its margins. [w] Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U [red.] *Plant roots. The hidden half*. New York: Marcel Dekker Inc 1996: 51–76.

Adres autora:

Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

PRZEMIANY CHROMOSOMOWE TOWARZYSZĄCE RÓŻNICOWANIU KOMÓREK ROŚLINNYCH

CHROMOSOME CHANGES IN PLANT CELL DIFFERENTIATION

Jolanta MAŁUSZYŃSKA

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin, Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: Różnicowanie komórek w ontogenezie roślin, które jest wyrazem ekspresji odmiennych genów, dotyczy strukturalnych i funkcjonalnych przemian struktur komórkowych, w tym również jądra komórkowego, a przede wszystkim chromosomów. Przemiany te obejmują procesy takie jak endoreduplikacja, amplifikacja lub eliminacja chromatyny, heterochromatyzacja, modyfikacja DNA i białek. W czasie ontogenezy roślin występują przemiany prowadzące do zmiany zawartości jądrowego DNA i liczby chromosomów w komórkach ulegających różnicowaniu. U większości zbadanych gatunków roślin okrytonasiennych wykazano występowanie somatycznej poliplodalności (polisomia). Rośliny nagoniasienne i pozostałe gatunki okrytonasienne to rośliny niepolisomatyczne. Tkanki tych roślin różnicują w stanie diploidalnym, komórki zawierają DNA na poziomie 2C, który jest typowy dla fazy G1 cyklu komórkowego.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; *Supl. 13: 127–136*)

Słowa kluczowe: apoptoza, endoreduplikacja, genom, jądro komórkowe, kultury *in vitro*, różnicowanie komórek, telomery,

Summary: Varieties of alternations in chromosomes occur during plant cell differentiation. These included endoreduplication, chromatin amplification and elimination, heterochromatinization, DNA and protein modification. In the majority of angiosperms species, the cells of differentiated tissues contain endoreduplicated nuclei (polysomatic species). The remaining species of angiosperms and gymnosperms undergo differentiation in a diploid condition having nuclei in G1 phase (non-polysomatic species).

(*Advances in Cell Biology* 1999; *Supl. 13: 127–136*)

Key words: apoptosis, cell differentiation, endoreduplication, genome, nucleus, *in vitro* culture, telomeres

WSTĘP

Różnicowanie komórek w ontogenezie roślin, które jest wyrazem ekspresji odmiennych genów, dotyczy strukturalnych i funkcjonalnych przemian różnych struktur komórkowych, w tym również jądra komórkowego, a przede wszystkim chromo-

somów. W czasie różnicowania pozycja chromosomów w jądrze komórkowym może ulegać zmianie w związku ze zmianą ekspresji genów. W komórkach merystematycznych, często dzielących się, występuje tzw. Rablowski układ chromosomów [40], który potem ulega zmianie wraz ze zmianą ekspresji genów.

W dyskusji nad przemianami chromosomowymi podczas różnicowania komórek należy rozważać dwie możliwości: jedną, że w zróżnicowanych komórkach mogą występować różnorodne przemiany, gdyż są one tolerowane w komórkach już nie dzielących się i drugą, że przemiany chromosomowe są przyczyną różnicowania. Ciągłe posiadamy niewystarczającą ilość informacji aby rozstrzygnąć ten dylemat. Występowanie przemian chromosomowych podczas różnicowania komórek jest znane od dawna, ale ciągle nie w pełni zrozumiane. Przemiany te obejmują procesy, takie jak: endoreduplikacja, amplifikacja lub eliminacja chromatyny, heterochromatyzacja, modyfikacja DNA i białek. Przemiany towarzyszące różnicowaniu komórek są lepiej poznane dla komórek zwierzęcych niż roślinnych [34, 46].

Cytogenetyczne badania komórek podczas różnicowania są trudne, gdyż są to na ogół komórki nie dzielące się. Dlatego też do niedawna badania te dotyczyły głównie określania zmian w zawartości jądrowego DNA. Pierwsze doniesienia o poliploidalności w komórkach zróżnicowanych były opublikowane w już 1934 roku [22]. Ale szersze cytogenetyczne badania roślinnych komórek zróżnicowanych rozpoczęto w latach pięćdziesiątych. Do wiodących badaczy należeli D'Amato [8], Geitler [16], Tschermak-Woess [47], a w Polsce Olszewska [35]. Rozwój nowych technik, takich jak cytometria przepływowa i hybrydyzacja kwasów nukleinowych *in situ*, umożliwiają obecnie badanie chromosomów nie tylko podczas podziału mitotycznego i mejotycznego, ale również w jądrach interfazowych komórek zróżnicowanych. Liczba chromosomów i ich położenie może być określana na podstawie lokalizacji sekwencji DNA chromosomowo-specyficznych użytych jako sonda do hybrydyzacji *in situ*. Dodatkowych informacji o stanie chromosomowym komórek dostarczają obserwacje tych komórek i tkanek w kulturach *in vitro*.

Komórki roślinne po zakończeniu podziału mitotycznego mogą wejść w następny podział i kontynuować swoją merystematyczną funkcję, inne komórki mogą stać się komórkami macierzystymi mejospor i przejść podział mejotyczny. Jeszcze inne mogą rozpocząć procesy różnicowania, które w niektórych przypadkach kończą się programowaną śmiercią – apoptozą. W prezentowanym przeglądzie pragnę przedstawić niektóre dane dotyczące przemian chromosomowych występujących w zróżnicowanych komórkach roślinnych.

ZMIANY ZAWARTOŚCI DNA I LICZBY CHROMOSOMÓW W CYKLU ŻYCIOWYM ROŚLINY

Zwykło się przyjmować, że liczba chromosomów i zawartość jądrowego DNA są wartościami stałymi i charakterystycznymi dla gatunku. Stąd został wprowadzo-

nysymbol C (*constant*) dla gametycznej zawartości DNA. Jeżeli haploidalne gamety zawierają więcej niż jeden genom, gatunki określamy jako poliploidalne, auto- lub allo- poliploidalne, w zależności od ich pochodzenia. Badania molekularne ostatnich lat wykazały, na podstawie porównywania map genetycznych, że gatunki uznawane jako diploidalne są w rzeczywistości poliploidami np. kukurydza jest tetraploidem a nie diploidem, jak wcześniej uważano [1]. Współczesne diploidalne gatunki *Brassica* pochodzą od gatunku ancestralnego o niższej liczbie chromosomów i są *de facto* wtórnymi poliploidami zwanymi często paleoploidami [39]. Gatunki auto- i allo-poliploidalne są często poliploidami wielokrotnymi [45]. Wielokrotną poliploidalność udowodniono dla przeszło 40 gatunków roślin. Najwyższą liczbą przodków, jaką określono dla gatunku poliploidalnego jest 13, u *Draba norvegica* i *Tragopogon miscellus* [28]. Dowodem na poliploidalny charakter wielu gatunków jest również syntenia [33]. W czasie ewolucji gatunki poliploidalne podlegają przemianom prowadzącym do ich diploidyzacji [13].

W cyklu życiowym rośliny występują cykliczne zmiany fazy haploidalnej i diploidalnej, znane jako przemiana pokoleń – gametofitu i sporofitu. Gametofit powstaje z mejospory jest haploidalny i wytwarza gamety. Sporofit powstaje z zygoty w wyniku podziałów mitotycznych, a następnie w wyniku podziału mejotycznego wytwarza mejospory. W nasieniu występuje zróżnicowanie genetyczne, obok diploidalnej zygoty zawierającej dwa genomy rodzicielskie, występuje triploidalne bielmo z dwoma genomami matki i jednym ojcowskim. To wszystko otoczone jest diploidalną tkanką pochodzącą z rośliny matecznej.

W czasie ontogenezy rośliny, oprócz ściśle kontrolowanych przemian związanych z mitotycznym cyklem komórkowym charakterystycznym dla komórek merystematycznych, występują inne przemiany prowadzące do zmiany zawartości jądrowego DNA i liczby chromosomów w komórkach różnicujących. U około 90% zbadanych gatunków roślin okrytonasiennych wykazano występowanie somatycznej poliploidalności (polisomia, endopoliploidalność), tzn. komórki somatyczne tych roślin w czasie różnicowania podlegają endopoliploidyacji, tworząc w efekcie miksploidalne tkanki. Rośliny takie określa się jako polisomatyczne [10]. Przykładem tego typu rośliny może być *Arabidopsis thaliana*. W tkankach roślin tego gatunku stwierdzono wzrost poliploidalności w komórkach somatycznych wraz z rozwojem do poziomu 32C DNA [15]. Stopień endopoliploidalności może różnić się u różnych ekotypów. Interesujące, że u roślin tetraploidalnych poziom endopoliploidalności jest taki jak u roślin diploidalnych [29].

Rośliny nagonasienne i pozostałe gatunki okrytonasienne to rośliny niepolisomatyczne. Tkanki tych roślin różnicują się w stanie diploidalnym, komórki zawierają DNA na poziomie 2C typowym dla fazy G1. Wiele roślin typu niepolisomatycznego występuje w rodzinie *Compositae*, przykładem mogą być *Helianthus annuus* i *Crepis capillaris*. Cytometryczny pomiar zawartości jądrowego DNA w liściach

Crepis capillaris wykazuje wyraźny szczyt odpowiadający poziomowi 2C DNA [28]. Innym przykładem rośliny nie polisomatycznej jest *Lilium longiflorum* [3].

Różnicowanie komórek w fazie G1 wskazuje na blokadę w punkcie kontrolnym G1/S cyklu komórkowego, uniemożliwiającą wejście komórek w fazę syntezy DNA (S). U roślin polisomatycznych komórki przechodzą fazę S, ale nie następuje podział jądra. Taki skrócony cykl komórkowy bez podziału jądra prowadzi do wielokrotnej replikacji DNA i endopoliploidalności komórek. Zmiany zawartości jądrowego DNA podczas ontogenezy są chyba najlepiej poznanym typem przemian występującym podczas różnicowania komórek [2, 36].

Poliploidyzacja komórek somatycznych podczas ich różnicowania występuje powszechnie u roślin i zwierząt. Może być ona wynikiem endoreduplikacji, endomitoz, zaburzeń cytokinezy lub fuzji komórek. Endoreduplikacja jest ściśle kontrolowanym procesem występującym w pewnych stadiach różnicowania w określonych tkankach i komórkach. Poziom poliploidalności jest specyficzny dla danych komórek, tkanek, gatunku a nawet odmiany. Proces ten wymaga ominięcia lub zahamowania mechanizmu, który odpowiedzialny jest, w normalnym cyklu komórkowym, za niedopuszczenie do rozpoczęcia replikacji DNA bez zakończenia poprzedniej mitozy [32]. Może to być, jak wykazano u *Drosophila*, utrata aktywności cykliny mitotycznej i tworzenie MPF (*mitosis promoting factor*), przy stałej ekspresji cykliny fazy S. Podobne zmiany stwierdzono w komórkach endospermu kukurydzy. Endoreduplikacja jest wynikiem zahamowania mitoz poprzez inhibicję fatora MPF i indukcję kinazy fazy S [18].

Jakie są zalety endopoliploidalności? Najprostszą odpowiedzią jest stwierdzenie, że zwiększona jest liczba kopii DNA potrzebna do syntezy odpowiednich białek. W cyklu endopoliploidyzacji synteza białek może się odbywać bez przerwy potrzebnej na mitozę. Tworzenie komórek o zwiększonych wymiarach wydaje się być bardziej „ekonomiczne” niż duża liczba małych, do tworzenia których potrzeba mniej błon, mniej ściany komórkowej [5].

Wprowadzenie cytometrii przepływowej, metody, która pozwala w krótkim czasie przeprowadzić pomiary zawartości DNA w tysiącach lub nawet milionach jąder komórkowych bez konieczności badania komórek w stadium mitozy otworzyło nowe możliwości badania poziomu poliploidyzacji komórek w poszczególnych organach i typach tkanek podczas rozwoju roślin [12, 17].

W zróżnicowanych komórkach interfazowych niektórych gatunków o stopniu poliploidalności można wnioskować na podstawie liczby chromocentrów. Zróżnicowana liczba chromocentrów w różnych tkankach może wynikać z nie pełnej replikacji całego genomu [7]. W jądrach komórkowych *Arabidopsis thaliana* liczba chromocentrów odpowiada liczbie chromosomów. Zwiększona liczba chromocentrów wskazuje na wystąpienie poliploidyzacji, która w komórkach zróżnicowanych może się odbywać w drodze endoreduplikacji. Natomiast zwiększenie wielkości

chromocentrow przy nie zmienionej ich liczbie może wskazywać na wystąpienie endomitoz [30].

Istnieje wiele doniesień o zróżnicowanej replikacji DNA w jądrach diploidalnych w wyniku amplifikacji lub nie replikowania pewnych genów lub niekodujących sekwencji powtarzalnego DNA. Udokumentowanie takich obserwacji jest trudniejsze ze względu na niedostatecznie czułe metody badania. Cytometria przepływowa daje pewne możliwości, ale tylko odnośnie zmian w całkowitej zawartości jądrowego DNA i tak porównując zawartość DNA w jądrach wierzchołków wzrostu pędu i korzenia kukurydzy z zawartością DNA w komórkach mezofilu, stwierdzono, że podczas rozwoju i różnicowania następuje utrata jakichś sekwencji DNA [4].

Jak już wspomniano, wykorzystując do hybrydyzacji *in situ* określone sekwencje DNA, jako markery chromosomów, można śledzić niektóre przemiany chromosomowe nawet w jądrach interfazowych. Lokalizacja dwóch sond, 5S rDNA i 45S rDNA w chromosomach *Arabidopsis thaliana* pozwala zidentyfikować pięć par chromosomów. Na podstawie liczby sygnałów hybrydyzacji *in situ* w jądrach interfazowych można wnioskować o ploidalności badanych komórek. Wykorzystano sondy rDNA do śledzenia przemian w jądrach interfazowych tapetum *Arabidopsis*, szczególnie trudnego obiektu do badań cytogenetycznych. Pozwoliły one na prześledzenie poliploidyacji w tapetum roślin diploidalnych i tetraploidalnych [48].

PRZEMIANY W CHROMATYNIE; METYLACJA, ACETYLACJA, TELOMERY

Podczas różnicowania komórek przemiany dotyczą nie tylko zawartości DNA, ale również struktury chromosomów i modyfikacji chromatyny. Specyficznym sposobem eliminacji sekwencji DNA jest inhibicja ich aktywności na drodze kondensacji chromatyny, zmiany wzoru metylacji DNA lub acetylacji histonów. Szczególnie ważną rolę w rozwoju roślin odgrywa zmiana poziomu i wzoru metylacji DNA [37, 41]. Istotną rolę w regulacji aktywności genów i kondensacji chromatyny przypisuje się również acetylacji histonów. Acetylowane histony są charakterystyczne dla DNA aktywnych genów, deacetylacja wiąże się inaktywacją genów [23].

Cytogenetycznym wskaźnikiem zmian w aktywności transkrypcyjnej DNA może być wykrywanie aktywności genów rRNA drogą srebrzenia. Jest szereg doniesień wskazujących na zmianę aktywności rDNA w czasie rozwoju roślin. Przykładem mogą być rośliny pszenżyta, w którego komórkach somatycznych nieaktywne są loci rDNA pochodzące od żyta, natomiast w młodych ziarnach pyłku wszystkie loci wykazują ekspresję [44]. W merystemach korzeni zarodkowych cebuli stwierdzono cztery aktywne loci rDNA, podczas gdy w korzeniach przybyszowych tylko jedna para jest aktywna [20].

Jednym z szerzej badanych elementów chromosomów podczas rozwoju organizmu są telomery. Telomery są istotnymi elementami chromosomu. Zabezpieczają chromosomy przed degradacją przez egzonukleazy i fuzją ich końców. Pełnią istotną rolę w ułożeniu chromosomów w jądrze interfazowym poprzez przyłączanie do matriksu jądrowej. Ostatnie badania wykazują, że telomery są strukturami bardzo dynamicznymi i ich rola jest znacznie bardziej złożona niż przypuszczano początkowo. Nie tylko umożliwiają prawidłową replikację całych chromosomów, ale również uczestniczą w kontroli cyklu komórkowego, starzeniu się komórek i ich śmierci. [38]. Prawidłową replikację telomerów zapewnia enzym telomeraza, która działa jako odwrotna transkryptaza, przyłączając własne RNA, jako matrycę, do 5' końca DNA. Brak telomerazy powoduje skracanie odcinków telomerowych przy każdym następnym podziale komórki. Z badań komórek człowieka wiadomo, że telomery ulegają skracaniu w czasie różnicowania i starzenia się komórek. Komórki hodowane *in vitro* mogą przejść określoną liczbę podziałów, która zależy od wieku osobnika, od którego pobrano tkankę. W komórkach somatycznych człowieka nie stwierdzono aktywności telomerazy z wyjątkiem nieśmiertelnych komórek linii płciowej, regenerujących tkanek krwi i nabłonka oraz niektórych nowotworów.

Wiele danych wskazuje, że u roślin, podobnie, występuje zmiana aktywności telomerazy w czasie rozwoju. Badania na różnych gatunkach roślin wskazały, że aktywność telomerazy związana jest z aktywnością podziałową tkanki. Już McClintok [31] wykazała, że końce pękniętych chromosomów kukurydzy są naprawiane w komórkach zarodka, ale nie w komórkach endospermu. W komórkach zarodka aktywna telomeraza dobudowuje *de novo* brakujące telomery.

Zmianę aktywności telomerazy wraz z rozwojem stwierdzono u kilku gatunków roślin. Aktywność telomerazy stwierdzono w tkankach merystematycznych i nie zróżnicowanych komórkach soi i *Arabidopsis*, natomiast brak lub bardzo niska aktywność w zróżnicowanych tkankach dojrzałych roślin [14]. U *Hordeum vulgare* i *Melandrium album* stwierdzono skracanie telomerów wraz ze wzrostem i starzeniem się roślin, podczas gdy w komórkach długoterminowego kalusa (ang. *long-term callus*) nastąpił kilkakrotny wzrost liczby kopii sekwencji telomerowych [25, 42]. Wyniki te wskazują, że aktywność telomerazy jest charakterystyczna dla komórek wykazujących trwałe zdolności podziałowe.

PROGRAMOWANA ŚMIERĆ KOMÓRKI JAKO JEDEN Z MECHANIZMÓW RÓŻNICOWANIA

W opisie rozwoju roślin często spotykamy określenie, że jakieś organy, tkanka lub komórka ulega degeneracji lub zamieraniu. Znaczy to, że na pewnym etapie rozwoju określone komórki podlegają procesom, ściśle kontrolowanym genetycznie, prowadzącym do ich śmierci, tzn. że podlegają programowanej śmierci komórkowej.

Proces ten poznany jest lepiej dla komórek zwierzęcych i określany jako apoptoza. Apoptoza obejmuje szereg procesów zapoczątkowanych zmianami białek błonowych, następnie uruchomieniem systemu proteolitycznego, zmiany w mitochondriach, a następnie fragmentację jądrowego DNA, przez cięcia w odcinkach internukleosomowych. W wyniku powstają fragmenty odpowiadające wielokrotności nukleosomów (180–200 pz), które podczas elektroforezy tworzą drabinkę. Ostatecznie protoplast rozpada się na otoczone błoną ciała apoptotyczne. Innymi wskaźnikami apoptozy może być utrata otoczki jądrowej i uwalnianie jąderka do cytoplazmy, jak np. podczas tworzenia suspensora. [19, 21].

Apoptoza jest ważną częścią prawidłowego procesu ontogenezy i rozmnażania. Przykładem może być degradacja trzech z tetrazy megaspor, komórek tapetum, różnicowanie komórek ksylemu, różnicowanie kwiatów męskich i żeńskich, powstawanie dziur i wcięć w liściach powszechnie znanego filodendrona, degradacja komórek czapeczki, komórki szyjki słupka, przez które kiełkuje łagiewka pyłkowa.

Apoptoza może być indukowana czynnikami egzogennymi lub endogennymi, może obejmować eliminację całej komórki, ten typ związany jest głównie ze starzeniem, lub tylko protoplastu jak w przypadku ksylogenezy. W ostatnich latach scharakteryzowano i wyizolowano wiele genów związanych z programowaną śmiercią komórek roślinnych. Buchanan-Wollaston [6] przedstawiła listę 40 sklonowanych genów, które wykazują zwiększoną aktywność transkrypcyjną podczas starzenia się liści. Wyselekcjonowano i scharakteryzowano wiele mutantów szczególnie *Arabidopsis*, które mają zaburzoną genetyczną kontrolę odpowiedzi na czynniki normalnie wywołujące procesy starzenia lub śmierci komórki, takie jak np. etylen lub patogeny. Zaburzenie procesów reperacji uszkodzeń DNA prowadzi do powstania aberracji chromosomowych, które mogą być przyczyną nieplanowanej apoptozy [43].

KONSEKWENCJE SOMATYCZNYCH PRZEMIANY CHROMOSOMOWYCH W HODOWLI *IN VITRO*

Zmiany kariologiczne występujące w komórkach podczas różnicowania są jedną z przyczyn przemian genetycznych obserwowanych w tkankach hodowanych *in vitro*, jak i w zregenerowanych z nich roślinach. Przemiany te określane są jako zmienność somaklonalna [26]. Częstotliwość i rodzaj przemian somaklonalnych zależy od wielu czynników związanych z rodzajem i warunkami kultury *in vitro*, ale pierwszym źródłem przemian są, te obecne już w pierwotnym eksplantacie [9, 24, 27]. Potwierdzeniem tego może być porównanie przemian chromosomowych w kalusie *Crepis capillaris* ($2n = 6$), rośliny niepolisomatycznej i *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$), rośliny wysoce miksploidalnej. Kalus *Crepis capillaris* charakteryzuje się wyjątkową stabilnością. W pierwszym roku hodowli kalusa nie obserwowano

ilościowych ani strukturalnych przemian chromosomowych, pojawiły się one dopiero po dłuższym czasie kultury *in vitro*. Należy jednak podkreślić, że z kalusa długoterminowego, który wykazywał nawet pewien procent komórek poliploidalnych, regenerowały tylko diploidalne korzenie i pędy [28]. Przeciwnie, u *Arabidopsis thaliana*, już w pierwszym tygodniu kultury pierwotnej, podczas kalogenezy, obserwowano wysoki procent komórek poliploidalnych. Liczba komórek poliploidalnych początkowo wzrastała wraz z czasem hodowli, ale po kilku pasażach pozostawała na stałym poziomie. Po kilku miesiącach hodowli większość komórek dzielących się wykazywała liczbę chromosomów odpowiadającą wartości 4–5 n , ale obserwowano również pojedyncze metafazy z 80 chromosomami. Należy również podkreślić, że stopień poliploidalności kalusa otrzymanego z roślin diploidalnych i tetraploidalnych był bardzo podobny, co może wskazywać, że jest to maksymalny lub optymalny poziom poliploidalności dla komórek tego gatunku. Kalus *Arabidopsis* mimo wysokiej poliploidalności charakteryzował się dobrymi zdolnościami regeneracyjnymi. Wśród roślin zregenerowanych, obok diploidalnych, występowały rośliny tri-, tetra- i heksaploidalne [29]. Wyniki te wydają się wskazywać, że *Arabidopsis thaliana*, roślina typu polisomatycznego „lepiej toleruje” poliploidalność niż *Crepis capillaris*.

MUTACJE W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH

U roślin wyższych trudno jest wyznaczyć linię generatywną komórek. Komórki somatyczne występujące w merystemie mogą, z zależności od ich położenia, stać się komórkami generatywnymi, mega- lub mikrosporocytami lub znaleźć się w pąkach przybyszowych. Mutacje i strukturalne przemiany chromosomów, które powstaną w komórkach somatycznych mogą znaleźć się w pąkach przybyszowych i być przyczyną zmienności wśród roślin rozmnażanych wegetatywnie. Jeżeli zmutowana komórka somatyczna stanie się w komórką generatywną, mutacja może zostać przekazana do następnych pokoleń roślin i być utrwalona w procesie ewolucji [11].

LITERATURA

- [1] AHN S, ANDERSON JA, SORRELLS ME, TANKSLEY SD. Homoeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. *Mol Gen Genet* 1993; **241**: 483–490.
- [2] BASSIP. Quantitative variations of nuclear DNA during plant development: a critical analysis. *Biol Rev* 1990; **65**: 185–225.
- [3] BENNICI A. Cell differentiation in a diploid state in *Lilium longiflorum* tissues. *Protoplasma* 1979; **101**: 127–131.
- [4] BIRADAR DP, RAYBURN AL. Intraplant nuclear DNA contents variation in diploid nuclei of maize (*Zea mays*). *J Exp Bot* 1993; **44**(263): 1039–1044.

- [5] BRYANS C, SMITH DL. Endopoliploidy, cell volume and nuclear volume interrelationships in cotyledones of the *Leguminosae*. *Ann Bot* 1985; **55**: 225–237.
- [6] BUCHANAN-WOLLASTON V. The molecular biology of leaf senescence. *J Exp Bot* 1997; **48**: 181–199.
- [7] CECCARELLI M, MOROSI L, CIONINI G. Chromocenter association in plant cell nuclei: determinants, functional significance, and evolutionary implications. *Genome* 1998; **41**: 96–103.
- [8] D'AMATO F. Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. *Caryologia* 1952; **4**: 311–358.
- [9] D'AMATO F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1985; **3**: 73–112.
- [10] D'AMATO F. Polyploidy in cell differentiation. *Caryologia* 1989; **42**: 183–211.
- [11] D'AMATO F. Role of somatic mutations in the evolution of higher plants. *Caryologia* 1997; **50**: 1–15.
- [12] DOLEZEL J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J Appl Genet* 1997; **38**: 285–302.
- [13] FELDMAN M, LIU B, SEGAL G, ABBO S, LEVY AA, VEGA JM. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homologous chromosomes. *Genetics* 1997; **147**: 1381–1387.
- [14] FITZZGERALD MS, McKNIGHT TD, SHIPPEN D. Characterisation and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 14422–14427.
- [15] GALBRAITH DW, HARKINS KR, KNAPP S. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 1991; **96**: 985–989.
- [16] GEITLER L. Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia 6 C*, Springer, Vienna, 1953.
- [17] GENDREAU E, HÖFTE H, GRANDJEAN O, BROWN S, TRAAS J. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant J* 1998; **13**: 221–230.
- [18] GRAFI G, LARKINS BA. Endoreduplication in maize endosperm: involvement of M-phase promoting factor inhibition and induction of S phase-related kinases. *Science* 1995; **269**: 1262–1264.
- [19] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [20] HASTEROK R, MAŁUSZYŃSKA J. Sequential silver staining and FISH – their use to distinguish active from inactive rDNA loci. *Plant Cytogenetics*, Maluszynska J [ed.], Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego (Univ of Silesia Press), Katowice, 1998; pp. 168–172.
- [21] HAVEL L, DURZAN DJ. Apoptosis in Plants. *Bot Acta* 1996; **109**: 268
- [22] HEITZ E. Über a- und b-heterochromatin sowie Konstanz und Bau der Chromosomen bei *Drosophila*. *Biol Zentralbl* 1934; **54**: 588–609.
- [23] JEPPESEN P. Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. *BioEssays* 1997; **19**: 67–74.
- [24] KARP A. Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *Newsletter IAPTC* 1989; **58**: 2–11.
- [25] KILIAN A, STIFF C, KLEINHOF A. Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 9555–9559.
- [26] LARKIN PJ, SCOWCROFT WR. Somaclonal variation -- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 1981; **60**: 197–214.
- [27] LEE M, PHILLIPS RL. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; **39**: 413–437.
- [28] LEITCH IJ, BENNETT MD. Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science* 1997; **2**: 470–476.

- [28] MAŁUSZYŃSKA J. B chromosomes of *Crepis capillaris* (L.) Waller. *in vivo* and *in vitro*. Prace Naukowe Uniwersytetu Śląskiego Nr 1147, Katowice, 1990.
- [29] MAŁUSZYŃSKA J, FRAŚ A. *Arabidopsis thaliana* w kulturach *in vitro*. *Zesz Nauk AR Krakow* 1997; **318**: 13–21.
- [30] MALUSZYŃSKA J, HESLOP-HARRISON JS. Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1991; **1**(2): 159–166.
- [31] McCLINTOCK B. The stability of broken ends in *Zea mays*. *Genetics* 1941; **26**: 234–282.
- [32] MILLER OJ. Chromosome changes in cell differentiation. *Genetics* 1997; **146**: 1–8.
- [33] MOORE G, DEVOS KM, WANG Z, GALE MD. Grasses, line up and form a circle. *Current Biol* 1995; **5**: 737–739.
- [34] NAGL W. Chromosomes in differentiation. [w] Sharma, A.K.; Sharma, A. [red] Chromosome and Cell Genetics. New York, London, Gordon and Breach Science Publishers 1985: 135–171.
- [35] OLSZEWSKA MJ. Zjawiska mixoploidalnosci u *Narcissus poeticus* L. *Acta Soc Bot Polon* 1952; **21**: 688–700.
- [36] OLSZEWSKA MJ, OSIECKA R. The relationship between 2 C DNA content, systematic position, and the level of nuclear DNA endoreduplication during differentiation of root parenchyma in some dicotyledonous shrubs and trees. Comparison with herbaceous species. *Biochem Physiol Pflanz* 1984; **174**: 641–657.
- [37] OLSZEWSKA MJ. Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin. *Post Biol Kom* 1999; ten Supplement
- [38] PARADUE ML, DEBARYSHE PG. Telomers and telomerase: more than the end of the line. *Chromosoma* 1999; **108**: 73–82.
- [39] QUIROS C. Hypothetical model for *Brassica* genome structure and evolution, in: D. Murphy (Ed.), Rapeseed Today and Tomorrow Cambridge 1995; pp. 1063–1065.
- [40] RABL C. Ueber zelltheilung. *Morphologisches Jahrb* 1885; **10**: 214–330.
- [41] RICHARDS EJ. DNA methylation and plant development. *Trends in Genet* 1997; **13**: 319–323.
- [42] RIHA K, FAJKUS J, SIROKY J, VYSKOT B. Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell* 1998; **10**: 1691–1698.
- [43] SCHUBERT I, OUD JL, PICH U. Unscheduled apoptosis in meristematic plant cells is triggered via terminal deletions in artificially elongated chromosome arms. *Theor Appl Genet* 1998; **96**: 1022–1026.
- [44] SILVA M, QUEIROZ A, NEVES N, BARAO A, CASTILHO A, MORAIS-CECILIO L, VIEGAS W. Reprogramming of rye rDNA in triticale during microsporogenesis. *Chromosome Research* 1995; **3**: 492–496.
- [45] SOLTIS DE, SOLTIS PS. The dynamic nature of polyploid genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8089–8091.
- [46] THERMAN E. Chromosome behavior in cell differentiation: A field ripe for exploration? *Genetics* 1995; **141**: 799–804.
- [47] TSCHERMAK-WOESS E. Karyologische Pflanzenanatomic. *Protoplasma* 1956; **46**: 237–244.
- [48] WEISS H. Mitotyczne i mejotyczne chromosomy *Arabidopsis thaliana* (L.) Hyhn. Praca Doktorska. Uniwersytet Śląski, Katowice, 1999.

Adres autora:

Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

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 odpowiedzialnej 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 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznych z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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 przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 444) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów, i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na białym 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. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji konieczności w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiadzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,	tak	nie	Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została wysłana do innej redakcji	tak	nie
tabel i rycin.	tak	nie	Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	tak	nie
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.	tak	nie	Odpowiadam za całość pracy opisaną w zał. maszyn.	tak	nie
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście artykułu	tak	nie		tak	nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępie Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. *podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENTS

STARZENIE SIĘ W ASPEKCIE KOMÓRKOWYM CELLULAR ASPECTS OF AGING	1
Wprowadzenie – Introduction	2
OLIŃSKI R., JURGOVIK M.: Wolnorodnikowe uszkodzenia zasad azotowych DNA i ich rola w procesie starzenia oraz chorobach wieku podeszłego Oxidative DNA base modifications and their role in ageing and degenerative diseases	3
BILIŃSKI T.: Rola mechanizmów antyoksydacyjnych w procesie starzenia się. Badania modelowe The role of antioxidant mechanisms in aging. Model studies	23
MYŚLIWSKA J.: Zmiany ekspresji receptorów na powierzchni limfocytów T w procesie starzenia się człowieka Age-related changes of the surface receptors of T lymphocytes	29
KURPISZ M., FISZER D.: Wybrane aspekty starzenia się komórek gonady męskiej Some aspects of aging in cells of male gonad	47
KMIEĆ Z.: Związane ze starzeniem modyfikacje w działaniu hormonów uwarunkowane zmianami na poziomie receptorowym i efektorowym Changes in hormone receptors and signal transduction during aging	57
MECHANIZMY RÓŻNICOWANIA I WZROSTU KOMÓREK U ROŚLIN PLANT CELLS DIFFERENTIATION AND GROWTH MECHANISMS	69
Wprowadzenie – Introduction	70
HEJNOWICZ Z. Anizotropia naprężeń w ścianach komórkowych a wpływ auksyny na szybkość wzrostu pędu i korzenia Mechanical stress anisotropy in cell walls and the effect of auxin on the elongation rate in shoots and roots	71
OLSZEWSKA M. J.: Zmiany metylacji cytozyny podczas różnicowania komórek u roślin Changes in cytosine methylation during plant cell differentiation	83
TREBACZ K.: Mechanizmy przekazywania sygnałów w obrębie komórek i całych roślin Mechanisms of signal transmission within cells and whole plants	95
NAKIELSKI J.: Symulacje wzrostu i podziałów komórek w merystemie. Znaczenie głównych kierunków wzrostu Simulations of growth and cell divisions in the meristem. Significance of the principal directions of growth	109
MAŁUSZYŃSKA J.: Przemiany chromosomowe towarzyszące różnicowaniu komórek roślinnych Chromosome changes in plant cell differentiation	127