

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 28, ISSUE 4/2001  
(469–590)

511.70.01

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

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

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*

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.

Ark. wyd. 10,5. Ark. druk. 7,75. Podpisano do druku we wrześniu 2001 r. Druk ukończono w październiku 2001 r.

## W tym zeszycie „Postępów Biologii Komórki

- Telomeraza jest rybonukleoproteiną o aktywności odwrotnej transkryptyazy (polimerazą DNA zależną od RNA), swoistą dla odcinków telomerowych chromosomów. Enzym jest zbudowany z podjednostki katalitycznej TERT, podjednostki RNA oraz białka stowarzyszonego z telomerazą. Więcej na temat możliwości oceny ekspresji TERT na poziomie pojedynczej komórki znajdzie Czytelnik na stronie 471.
- W dwu artykułach (strony 483 i 497) opisano poznane autoantygeny plemnikowe obecne na powierzchni i we wnętrzu komórki. Może to mieć wartość poznawczą, ale również znaleźć zastosowanie w regulacji rozrodu.
- Duże znaczenie w badaniach nad genetyką rozwoju zarodka rośliny mają mutacje ujawniające się we wczesnych etapach embriogenezy. Analizy fenotypów takich mutantów pozwoliły na poznanie i zrozumienie mechanizmów genetycznej regulacji embriogenezy. Artykuł na ten temat można znaleźć od strony 509.
- Pinealocyty, komórki szyszynki zachowały zdolność do ekspresji wielu białek charakterystycznych dla procesu fototransdukcji. Na ten temat artykuł Czytelnik znajdzie na stronie 571.





**Wykaz recenzentów z tomu 28 z roku 2001\***  
**Referees of the volume 28, 2001**

prof. dr hab. S. Biliński  
doc. dr hab. Barbara Czartoryska  
prof. dr hab. Maria Jerka-Dziadosz  
prof. dr hab. B. Grzelakowska-Sztabert  
doc. dr hab. Amalia Guzdek  
doc. dr hab. B. Kamińska  
prof. dr hab. Jerzy Kawiak  
prof. dr hab. W. Kilarski  
prof. dr hab. Liliana Konarska  
prof. dr hab. A. K. Kononowicz  
dr Katarzyna Kwiatkowska  
prof. dr hab. Piotr Leider  
prof. dr hab. M. J. Olszewska  
prof. dr hab. Zofia Osuchowska  
prof. dr hab. B. Płytycz  
prof. dr hab. S. Rogalska  
prof. dr hab. med. D. Rożynkowa  
prof. dr hab. K. Staroń  
prof. dr hab. K. Szyfter

\*Lista ta będzie uzupełniona w zeszycie PBK 1/2002



## OCENA DŁUGOŚCI TELOMERÓW I AKTYWNOŚCI TELOMERAZY ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

### FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF TELOMERE LENGTH AND TELOMERASE ACTIVITY

Michał DRAGAN, Jacek ROLIŃSKI

Zakład Immunologii Klinicznej, Akademia Medyczna w Lublinie

*Streszczenie:* Regulacja długości telomerów ma decydujące znaczenie w procesie senescencji komórki, immortalizacji oraz onkogenezie. Zachodzi ona głównie dzięki aktywności telomerazy. Telomeraza jest polimerazą DNA zależną od RNA, specyficzną dla odcinków telomerowych, w której decydujące znaczenie odgrywa katalityczna podjednostka hTERT (odwrotna transkryptaza) niezbędna dla aktywności enzymu. Funkcjonowanie układu telomery-telomeraza zostało przedstawione w większości komórek nowotworowych, komórek macierzystych oraz w limfocytach podczas ich różnicowania i aktywacji. Ocena długości telomerów opierała się dotąd głównie na metodzie *Southern blot*, zaś badania aktywności telomerazy na metodzie PCR. W ostatnich publikacjach zaprezentowano techniki oparte na metodzie cytometrii przepływowej, umożliwiające ocenę długości telomerów i ekspresji hTERT na poziomie pojedynczej komórki. Umożliwiają one prostą i szybką ocenę, szczególnie użyteczną w szeroko zakrojonych badaniach klinicznych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 471–481)

*Słowa kluczowe:* telomer, aktywność telomerazy, hTERT, cytometria przepływowa

*Summary:* The regulation of telomere length is involved in the cellular physiology of senescence and mechanism of cell immortalization and tumor formation mainly due to reactivation of telomerase. Telomerase is a telomere specific polymerase which hTERT protein component is catalytic subunit indispensable to its activity. The function of telomere-telomerase system has been demonstrated in most malignant tumors, germ lines and human lymphocytes during differentiation and activation. The measurement of telomere length has traditionally been performed by Southern blot whereas telomerase activity detection by PCR. Recently, flow cytometry based protocols evaluating telomere length and hTERT expression, providing information at single cell level, have been published. These methods offer simple and rapid assay particularly for large-scale study of clinical samples.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 471–481)

*Key words:* telomere, telomerase activity, hTERT, flow cytometry

## WSTĘP

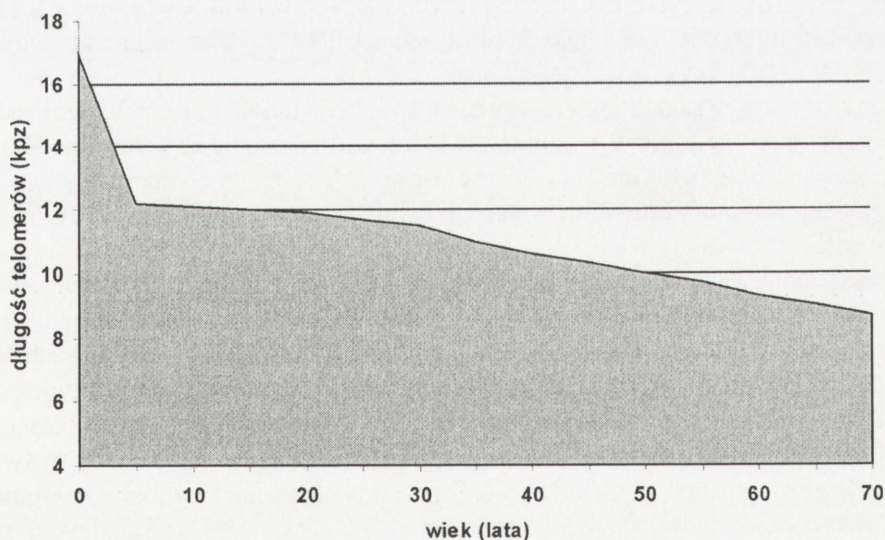
Ludzkie telomery są kompleksami nukleoprotein bogatymi w zasady guaninowe i składają się z sekwencji powtórzeń 5'-T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>-3' tworzących zakończenia chromosomów [8,15,23]. Telomery zabezpieczają DNA przed rearanżacjami prowadzącymi do niestabilności genomu i zmian w kariotypie. Ponieważ polimeraza DNA nie jest w stanie w pełni replikować zakończenia 3' łańcucha DNA, z każdym podziałem komórki związane jest skrócenie chromosomu na skutek utraty telomerowego DNA, co doprowadza w rezultacie do senescencji (starzenia się) komórki. Senescencja jest aktywnym, dynamicznym procesem charakteryzującym się trwałym zatrzymaniem proliferacji komórki, będącym wynikiem krytycznego skrócenia telomerów po charakterystycznej liczbie podziałów (limit Hayflicka) [37]. Ludzkie komórki somatyczne po ok. 50 podziałach stają się niezdolne do dalszych mitoz. Podczas jednego podziału *in vitro* chromosom skraca się o 50–200 nukleotydów, co odpowiada za różnicę pomiędzy długością „młodych” telomerów (15–22 tys. par zasad) a „starych” (8–10 tys. par zasad) [18]. Tak więc według telomerowej hipotezy starzenia się komórek, wraz z wiekiem komórek somatycznych dochodzi do skracania się telomerów, a czynniki zabezpieczające przed tym procesem mogą doprowadzić do nieśmiertelności komórki.

Jednym z mechanizmów chroniących telomery przed redukcją ich długości jest aktywność telomerazy. Telomeraza zbudowana z podjednostek białkowych oraz RNA jest enzymem będącym w stanie zahamować, a nawet odwrócić skracanie telomerów [17,30,39]. Kluczową rolę w aktywności tego enzymu odgrywa hTERT (telomerazowa odwrotna transkryptaza), której działanie katalityczne jest konieczne dla stwierdzenia aktywności układu telomerazy [7,27]. Wprowadzenie hTERT do komórek, które nie wykazywały aktywności telomerazy, powoduje odtworzenie tam jej aktywności oraz ich nieśmiertelność [6,10]. Komponent RNA enzymu (hTR) służy jako wzorzec dla heksanukleotydów nowo odtwarzanych końców chromosomów [38]. Regulacja ekspresji telomerazy jest charakterystyczna dla poszczególnych typów komórek i jest kontrolowana na wielu poziomach zarówno transkrypcyjnych, jak i potranskrypcyjnych. Duża aktywność telomerazy jest powszechna podczas embriogenezy, jednak w większości ludzkich komórek somatycznych ekspresja tego enzymu jest niewykrywalna (oprócz leukocytów, komórek macierzystych, komórek krypt jelitowych). Zmiany aktywności telomerazy limfocytów ściśle związane są z ich wzrostem, różnicowaniem i klonalną ekspansją konieczną w odpowiedzi immunologicznej [13]. Aktywacja limfocytów T i B *in vitro*, różnicowanie się limfocytów B dziewiczych w komórki B centrów rozrodczych (GC), potrafi 100-, a nawet 1000-krotnie zwiększyć aktywność ich telomeraz [19,21,40]. Skracanie telomerów leukocytów jest wynikiem starzenia się tych komórek *in vivo* (około 40 par zasad /rok), może również wynikać z podziałów komórek



w układzie *in vitro*. Sugeruje to, że aktywność telomerazy jest niewystarczająca dla ochrony długości końców chromosomów. Krótsze telomery obecne są w limfocytach szpiku ludzi dorosłych w porównaniu z komórkami izolowanymi z krwi pępowinowej czy płodowej wątroby. W pierwszych 4 latach życia obserwuje się szybkie skracanie telomerów (o około 30%), a następnie powolną, stopniową redukcję długości w kolejnych latach [18,33] (ryc. 1).

W licznych badaniach telomeraza wydaje się być jednym z najbardziej specyficznych markerów procesu nowotworowego. Wysoki poziom telomerazy wykrywany jest w większości nowotworów (80–90% guzów) różnego pochodzenia [9,36]. W komórkach nowotworowych telomery są zazwyczaj krótsze w porównaniu z komórkami prawidłowymi [2,22,29]. Telomeraza będąc markerem komórek nowotworowych, oprócz swojego znaczenia w diagnostyce może stać się wkrótce także celem terapii i znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów [3,41]. Jednak obecność grupy nowotworów z niewykrywalną aktywnością telomerazy świadczy, że inne „alternatywne mechanizmy” mogą brać udział w wydłużaniu telomerów. Właściwa charakterystyka „zegara molekularnego” komórek winna zawierać więc ocenę zarówno aktywności enzymu telomerazy, jak też długości powtórzeń telomerowych.



RYCINA 1. Zmiany długości telomerów limfocytów krwi obwodowej w różnych okresach życia



## OCENA DŁUGOŚCI TELOMERÓW

Podstawową metodę oceny długości telomerów stanowił dotąd *Southern blot* [16], w której przy użyciu enzymów restrykcyjnych dla rejonów subtelomerycznych, np: Rsa I, Msp I, otrzymuje się fragmenty TRF (*telomere restriction fragment*). Metoda ta jest czasochłonna, wymaga dużej ilości komórek do izolacji DNA, a wartości otrzymywanych TRF są zawyżone o kilka tysięcy nukleotydów w stosunku do rzeczywistej długości telomerów.

W roku 1998 dwie niezależne grupy naukowców, jedna kierowana przez Rufer, a druga przez Hultdin, przedstawiły metodę oceny długości telomerów z użyciem cytometrii przepływowej [20,34], stanowiącą rozwinięcie oceny metafazowych chromosomów za pomocą hybrydyzacji *in-situ* (FISH). Wyniki badań telomerów w cytometrze przepływowym wykazują wysoką korelację z pomiarami fragmentów TRF. Jednocześnie metoda ta w przeciwieństwie do *Southern blot* pozwala na wykonanie badania w ciągu kilku godzin. Dzięki użyciu cytometrii przepływowej możliwa jest ocena tysięcy komórek w ciągu kilkudziesięciu sekund oraz ocena ekspresji telomerów w obrębie określonych subpopulacji komórek i połączenie badania z oceną cyklu komórkowego. Metody obu grup badaczy oparte są na podobnych założeniach, skierowane są głównie na ocenę komórek układu krwiotwórczego i uległy pewnym modyfikacjom w ostatnim okresie [5,11,33]. Najistotniejszym elementem procedury jest hybrydyzacja *in-situ* ocenianych telomerów z  $(C_3TA_2)_3$  sondą PNA (*peptide nucleic acid*) sprzężoną z fluorochromem (głównie FITC). Zastępując oligonukleotydy DNA hybrydyzacją z PNA uzyskano znacznie większą stabilność układu przy podobnej swoistości [14].

Bardzo istotnym zagadnieniem w prezentowanej metodzie jest zapewnienie odpowiedniej kontroli badania w celu umożliwienia porównywalności wyników. Metoda prezentowana przez Hultdin [20] oparta jest na jednoczesnej ocenie badanego materiału z komórkami linii 1301 (białaczka limfoblastyczna). Linia 1301 jest tetraploidalna i charakteryzuje się długimi telomerami, dzięki czemu nie „nakłada się” na badaną populację, umożliwiając jej łatwe rozróżnienie na cytogramach. Komórki te zmieszane w stosunku 1:1 z komórkami badanymi stanowią dobrą kontrolę wewnętrzną badania. Wynik badania podawany jest w jednostkach RTL (względnych jednostkach długości) będących stosunkiem intensywności fluorescencji badanej próbki do fluorescencji komórek linii 1301 po odjęciu autofluorescencji (komórki bez PNA). Druga grupa badaczy pod kierunkiem Rufer [34] w swojej metodzie główny nacisk położyła na możliwość porównywania wyników z cytometru przepływowego między różnymi laboratoriami. Uzyskano to dzięki użyciu standaryzowanych jednostek fluorescencji MESF (*Molecules of Equivalent Soluble Fluorochromes*) [35]. Wynik badania podawany jest w wartościach MESF, które opisują intensywność fluorescencji fluorochromu badanej próbki względem fluorescencji

kulek standaryzacyjnych IIIb odczytaną z krzywej kalibracyjnej. Możliwe jest również podanie długości badanych telomerów w postaci ilości par zasad (pz), po przeliczeniu intensywności fluorescencji z jednostek MESF według wzoru podanego poniżej [12,26]:

$$\text{liczba par zasad} = \text{MESF} \times 0,02604 \times 0,019 \times 10^3$$

Do standaryzacji serii wyników istotna jest również jednoczesna ocena długości telomerów komórek linii referencyjnej pochodzących z jednego pasażu.

#### **Zarys procedury oznaczania telomerów w cytometrze przepływowym:**

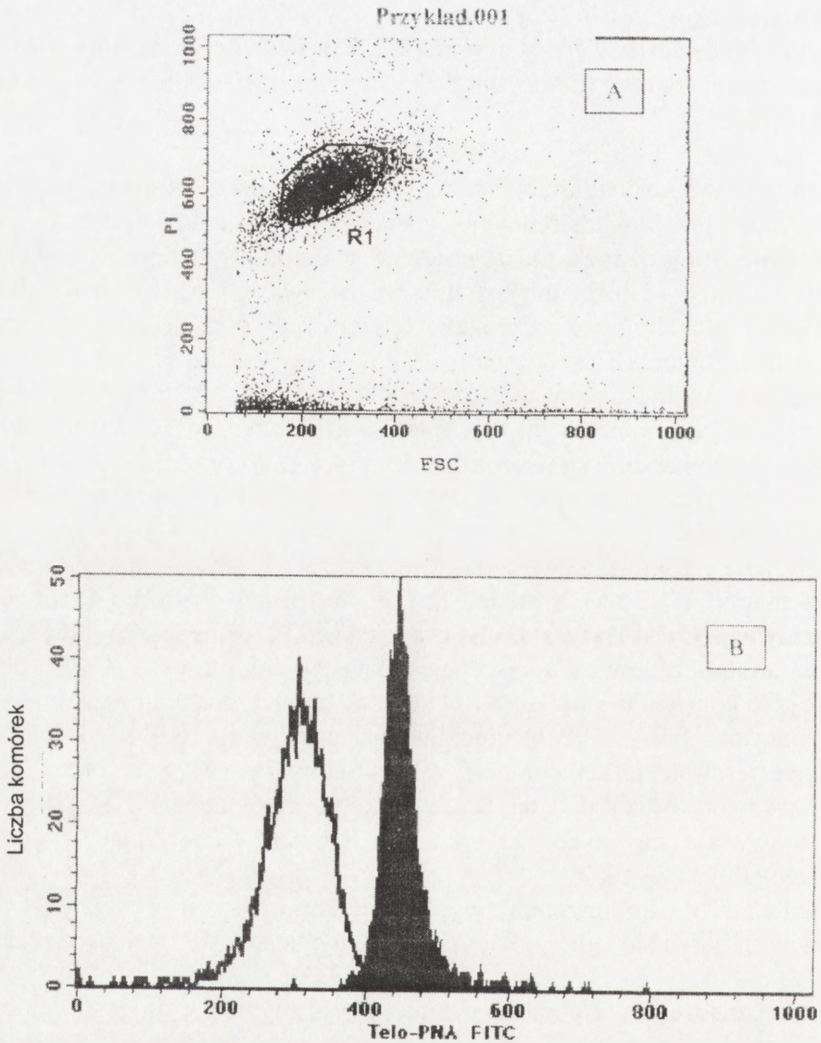
1. Izolacja komórek – Niezbędne jest otrzymanie zawiesiny badanych komórek, co nie stwarza problemów w przypadku leukocytów. W celu oceny wybranych subpopulacji konieczna jest wstępna selekcja pozytywna lub negatywna badanych komórek (np. separacja magnetyczna, rozetki).
2. Permeabilizacja komórek – Jest to etap fakultatywny. Doświadczenia autorów dowodzą, że temperatura konieczna do denaturacji DNA oraz małe rozmiary sondy PNA umożliwiają przeniknięcie jej do wnętrza komórki bez uprzedniej permeabilizacji chemicznej.
3. Hybrydyzacja – Komórki zawieszają się w roztworze hybrydyzacyjnym (20 mM Tris, 70% formamid, 1% BSA). Następnie do komórek badanych dodaje się sondę PNA telomerowego (C<sub>3</sub>TA<sub>2</sub>)<sub>3</sub> sprzężoną zazwyczaj z FITC. W celu oceny fluorescencji tła oceniano początkowo fluorescencję sekwencji chromosomu X [34], obecnie jednak jako kontrola negatywna służą komórki zawieszane w mieszaninie hybrydyzacyjnej bez PNA. W celu umożliwienia dostępu sondy do łańcucha DNA konieczna jest wstępna denaturacja w zakresie temperatur 80–84°C przez około 10 min. Czas hybrydyzacji podany przez Hultdin i współpracowników [20] wynosi ~ 12 h, wydaje się jednak, że już okres 2 h jest wystarczający i dostarcza porównywalnych wyników.
4. Barwienie DNA – Po uprzednim wyłukaniu komórek w roztworze post-hybrydyzacyjnym barwi się jądra jodkiem propydydny łącznie z RNazą bądź wybarwia 7-AAD.

Przykład oznaczenia za pomocą cytometrii przepływowej długości telomerów w separowanych magnetycznie limfocytach B krwi obwodowej przedstawiono na rycinie 2 (badanie wykonane przez autorów).

Jeśli badane komórki charakteryzują się znaczną proliferacją, konieczne jest skorygowanie wyników poprzez wyłączenie komórek będących w fazie S oraz G2/M cyklu komórkowego (np. w układzie FL3-height/FL1-height cytogramu). W cyklu komórkowym dochodzi bowiem do zwiększenia ekspresji telomerów, przeciętnie do 140% w fazie S oraz 180% w fazie G2/M.

Konieczność denaturacji DNA w temp. >80°C omówiona w protokole niesie za sobą szereg niedogodności, z których najistotniejsza jest jednoczesna denaturacja większości białek komórkowych i przeciwciał stosowanych do znakowania antygenów [25]. Uniemożliwia ona równoczesną charakterystykę telomerów oraz anty-





RYCINA 2. Cytometryczna analiza długości telomerów limfocytów B krwi obwodowej: A – komórki bramkowane są (R1) w zależności od fluorescencji jodku propydydy (PI) i FSC – *forward light scatter*; B – w obrębie regionu R1 oceniana jest fluorescencja sondy PNA przeciwko regionom telomerowym (pełny histogram) porównywana z kontrolą negatywną (pusty histogram); wartości FL1 przeliczane są następnie na jednostki MESF

genów powierzchniowych i wewnątrzkomórkowych komórki. Modyfikacje metody zawarte w najnowszych publikacjach [4,31] przynajmniej częściowo omijają ten problem, umożliwiając ocenę subpopulacji bez konieczności ich wcześniejszej separacji. Dokonano tego dzięki zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z względnie termostabilnym fluorochromem Cy5. Komórki po barwieniu



pośrednim – przeciwciała monoklonalne sprzężone z biotyną + streptawidyna z Cy5 – poddawane są utrwaleniu, permeabilizacji i denaturacji jak w przedstawionym wyżej protokole. Dochodzi następnie do hybrydyzacji ze sprzężoną z FITC sondą PNA, co pozwala na 2-kolorową analizę w cytometrze przeplywowym. Wydaje się, że dalsze modyfikacje prezentowanej metody umożliwią wkrótce wieloparametrową ocenę komórek w połączeniu z oceną długości telomerów w cytometrze przeplywowym.

## OCENA EKSPRESJI TELOMERAZY PRZY POMOCY BADANIA hTERT W CYTOMETRZE PRZEPIYWOWYM

„Złotym standardem” w ocenie aktywności enzymu telomerazy wydaje się niepodważalnie metoda TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*) opisana przez Kim i wsp. [22]. Badanie to charakteryzuje się wysoką czułością i w skrócie oparte jest na syntezie telomeru i jego późniejszej PCR amplifikacji. TRAP podobnie jak ocena katalitycznej podjednostki telomerazy hTERT metodą *Northern blot* czy RT-PCR uniemożliwia ocenę ekspresji enzymu w subpopulacjach komórek, a konieczna procedura lizy bezpowrotnie blokuje możliwość dalszych badań w określonych komórkach, np. nowotworowych [28]. Wyniki oceny ekspresji tego enzymu w nowotworach mogą być zawyżone z uwagi na obecność aktywowanych limfocytów naciekających guz (tzw. TIL – *tumor infiltrating lymphocytes*).

Metoda oceny aktywności wewnątrzkomórkowej hTERT w cytometrze przeplywowym w połączeniu z oceną ekspresji innych antygenów komórkowych została przedstawiona przez Ali i wsp. [1]. Zastosowanie tego protokołu pozwala wyróżnić w całym układzie badanych komórek subpopulacje o różnej, często dyskretnej ekspresji enzymu, których wartość zostaje uśredniona w innych wymienionych metodach.

Poniżej przedstawiono **zarys procedury oceny hTERT metodą cytometrii przeplywowej**:

1. Izolacja komórek.
2. Znakowanie antygenów powierzchniowych badanych komórek.
3. Utrwalenie i permeabilizacja – Do utrwalenia komórek używany jest 2% paraformaldehyd. Jako permeabilizator zalecany jest Triton-X100. Wydaje się jednak, że inne znane związki zwiększające przepuszczalność błony komórkowej mogą spełniać również to zadanie. Ali i wsp. w swojej pracy [1] przedstawiają zaburzenia fluorescencji przeciwciał powierzchniowych wynikające z procedury fiksacji i permeabilizacji komórki. W opinii autorów możliwemu spadkowi MFI nie powinien towarzyszyć spadek odsetka komórek znakowanych pozytywnie, co dyskwalifikowałoby tę procedurę.

4. Barwienie wewnątrzkomórkowego białka hTERT – Z powodu braku dostępnego komercyjnie przeciwciała sprzężonego z fluorochromem konieczne jest barwienie pośrednie. Anty-hTERT jest przeciwciałem poliklonalnym, co ogranicza czułość i swoistość tego badania.
5. Kontrola badania – Kontrola izotypowa oraz kontrola z użyciem białka blokującego są dostępne komercyjnie. Wartość ekspresji hTERT otrzymujemy po odjęciu od średniej fluorescencji badanej populacji komórek fluorescencję kontroli.

## PODSUMOWANIE

Zastosowanie cytometrii przepływowej w ocenie długości telomerów i ekspresji telomerazy (aktywność hTERT) jest znaczącym postępowaniem w metodyce badań, a uzyskane wyniki są równoważne, a nawet przewyższają te uzyskiwane dotychczas stosowanymi metodami. Jedną z jej najistotniejszych cech jest możliwość pomiarów w wybranych subpopulacjach komórek pochodzących od jednego dawcy, a szybkość i powtarzalność oceny umożliwia szersze zastosowanie jej w badaniach klinicznych.

Dotychczas przedstawione badania oceniające układ telomery-telomerazy metodą cytometrii przepływowej to m.in.:

- Ocena limfocytów T CD8+ w ostrej fazie infekcji wirusem EBV [31] – Badanie to ujawniło, iż pomimo intensywnej aktywacji i proliferacji specyficznych komórek CD8+ w czasie infekcji EBV zachowują one długie telomery. U większości chorych nie obserwowano skrócenia długości końców chromosomów w okresie powrotu do zdrowia mimo znacznego spadku aktywności telomerazy.
- Badanie długości telomerów granulocytów i limfocytów chorych na anemię aplastyczną (a.a.) i nocną napadową hemoglobinurię [12]. – Telomery granulocytów chorych na a.a. były statystycznie krótsze w porównaniu z kontrolą, a różnice te pogłębiały się wraz z zaawansowaniem choroby. Skuteczna terapia immunosupresyjna powodowała redukcję różnic długości telomerów wobec grupy kontrolnej. Badanie to potwierdziło intensywną proliferację hematopoetycznych komórek pnia w anemii aplastycznej.
- Ocena telomerów komórek krwi obwodowej i szpiku w przewlekłej białaczce szpikowej PBS [11]. – Stwierdzono, że w PBS dochodzi do skrócenia telomerów przy przejściu z fazy przewlekłej w fazę akceleracji i kryzę blastyczną. Leukocyty chorych w fazie przewlekłej PBS, u których w ciągu 2 lat doszło do progresji choroby, miały telomery znamienne krótsze niż telomery chorych pozostających w fazie przewlekłej, bez zaostrzenia blastycznego. Wykazano też, że komórki macierzyste Ph+ intensywniej proliferują w porównaniu z komórkami Ph-.
- Badanie długości telomerów ludzkich antygenowo swoistych komórek T pamięci [13]. – Zbadano, że komórki CD4+CD45RO+ mają krótsze telomery niż limfocyty



CD4+CD45RA+. Redukcja długości pojawiała się pomimo zwiększonej ekspresji telomerazy w aktywowanych i proliferujących limfocytach T.

- Porównawcza analiza długości telomerów w obrębie limfocytów CD8+ [5] – Oceniono, że komórki CD8+CD28– mają telomery znacznie krótsze niż telomery komórek CD8+CD28+. Różnica ta wynikała z klonalnej ekspansji limfocytów T CD8+CD28– i dowodzi ich roli jako końcowo zróżnicowanych komórek efektorowych.
- Ocena potencjału podziałowego komórek klonowanych ciałąt pochodzących z komórek somatycznych w okresie senescencji [24] – Transfer jądrowy przedłużył żywotność komórek starzejących z kilku podziałów do ponad 90, łączyło się to z wydłużeniem telomerów, których długość przewyższała ich długość w grupie kontrolnej. Wyniki te w sposób znaczący różnią się od wyników badań komórek owieczki Dolly, pierwszego klonowanego zwierzęcia, u którego wykryto znacząco krótsze telomery w porównaniu z rówieśniczą kontrolą. Przyczyny różnic w długości telomerów między badanymi klonowanymi ciałętami a owieczką Dolly są nieznane i wymagają dalszych badań.
- Ocena dynamiki zmian długości telomerów u chorych po przeszczepie szpiku [32] – Zaobserwowano skokowe skrócenie telomerów w pierwszym roku po przeszczepie, jednak w kolejnych latach skracanie końców chromosomów monocytów i limfocytów T biorcy było porównywalne z zachodzącym u osób zdrowych. Wydaje się, iż redukcja długości telomerów po przeszczepie szpiku nie ma znaczenia klinicznego i przypomina tę, która następuje w pierwszych latach życia człowieka. Przedstawione w artykule nowe metody oceny telomerów i aktywności telomerazy za pomocą cytometrii przepływowej mogą stać się skutecznym narzędziem do oceny procesów starzenia się komórek i rozwoju nowotworów. Opracowanie tych technik stwarza uzasadniony optymizm dotyczący diagnostyki i oceny przebiegu niektórych chorób, ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych. Wykorzystanie cytometrii w badaniach kinetyki telomerów niewątpliwie wpłynie na dalsze poszerzenie wiedzy na temat biologii komórki.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALI AS, CHOPRA R, ROBERTSON J, TESTA NG. Detection of hTERT protein by flow cytometry. *Leukemia* 2000; **14**: 2176–2181.
- [2] ARTANDI SE, DePINHO RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Cur Opin Genet Dev* 2000; **10**: 39–46.
- [3] AUTEXIER C. Telomerase as a possible target for anticancer therapy. *Chem Biol* 1999; **6**: R299–R303.
- [4] BATLIWALLA FM, DAMLE RN, METZ C, CHIORAZZI N, GREGERSEN PK. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsillar B cells. *J Immunol Methods* 2001; **247**: 103–109.



- [5] BATLIWALLA FM, RUFER N, LANSDORP PM, GREGERSEN PK. Oligoclonal expansion in the CD8+CD28- T cells largely explain the shorter telomeres detected in this subject: analysis by flow FISH. *Hum Immunol* 2000; **61**: 951–958.
- [6] BEATTIE TL, ZHOU W, ROBINSON MO, HARRINGTON L. Reconstruction of human telomerase activity *in vitro*. *Curr Biol* 1998; **8**: 177–180.
- [7] BELAIR CD, YEAGER TR, LOPEZ PM, REZNIKOFF CA. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 13677–13682.
- [8] BLACKBURN EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; **350**: 569–573.
- [9] BŁASIAK J. Telomeraza i rak. *Post Biochem* 1999; **45**: 228–238.
- [10] BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORING GB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; **279**: 349–352.
- [11] BRUMMENDORF TH, HOLYOAKE TL, RUFER N, BARNETT MJ, SCHULZER M, EAVES CJ, EAVES AC, LANSDORP PM. Prognostic implication of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 2000; **95**: 1883–1890.
- [12] BRUMMENDORF TH, MACIEJEWSKI JP, MAK J, YOUNG NS, LANSDORP PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001; **97**: 895–900.
- [13] BURNS JB, LOBO ST, BARTHOLOMEW BD. *In vivo* reduction of telomere length in human antigen-reactive memory T cells. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 1894–1901.
- [14] COREY DR. Peptide nucleic acids: expanding the scope of nucleic acid recognition. *Trends Biotechnol* 1997; **15**: 224–229.
- [15] DHAENE K, VAN MARCK E, PARWARESCH R. Telomeres, telomerase and cancer; an up-date. *Virchows Arch* 2000; **437**: 1–16.
- [16] ENGELHARDT M, KUMAR R, ALBANELL J, PETTENGELL R, HAN W, MOORE M. Telomerase regulation, cell cycle and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; **90**: 182–193.
- [17] GREIDER CW. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 1996; **65**: 337–365.
- [18] HODES RJ. Telomere length, aging, and somatic cell turnover. *J Exp Med* 1999; **190**: 153–156.
- [19] HU BT, LEE SC, MARTIN E, RYAN DH, INSEL RA. Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells *in vivo* and can be re-expressed in memory B cells activated *in vitro*. *J Immunol* 1997; **159**: 1068–1071.
- [20] HULTDIN M, GRONLUND E, NORRBACK KF, ERIKSSON-LINDSTROM E, JUST T, ROOS G. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acid Res* 1998; **26**: 3651–3656.
- [21] IGARASHI H, SAKAGUCHI N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 1997; **89**: 1299–1307.
- [22] KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; **266**: 2011–2015.
- [23] LANSDORP PM, VERWOERD NP, van de RIJKE FM, DRAGOWSKA W, LITTLE MT, DIRKS RW, RAAP AK, TANKE HJ. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 685–691.
- [24] LANZA RP, CIBELLI JB, BLACWELL C, CRISTOFALO VJ, FRANCIS MK, BAERLOCHER GM, MAK J, SCHERTZER M., CHAVEZ EA, SAWYER N, LANSDORP PM, WEST MD. Extension of cell life-span and telomere length in animals clone from senescent somatic cells. *Science* 2000; **288**: 665–669.
- [25] LAUZON W, SANCHEZ DARDON J, CAMERON DW, BADLEY AD. Flow cytometric measurement of telomere length. *Cytometry* 2000; **42**: 159–164.

- [26] LAW H, LAU Y. Validation and development of quantitative flow cytometry-based fluorescence *in situ* hybridization for intercenter comparison of telomere length measurement. *Cytometry* 2001; **43**: 150–153.
- [27] LIU K, SCHOONMAKER MM, LEVINE BL, JUNE CH, HODES RJ, WENG NP. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5147–5152.
- [28] MATTHEWS P, JONES CJ. Clinical implication of telomerase detection. *Histopathology* 2001; **38**: 485–498.
- [29] NOWAK J, LEWANDOWSKI K, JANUSZKIEWICZ D. Rola telomerazy w rozwoju procesu nowotworowego. *Post Biol Kom* 2000; **27** (supl.14): 143–150.
- [30] NUGENT CI, LUNDBLAD V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 1998; **12**: 1073–1085.
- [31] PLUNKETT FJ, SOARES MV, ANNELS N, HISLOP A, IVORY K, LOWDELL M, SALMON M, RICKINSON A, AKBAR AN. The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8+ T cells during acute Epstein-Barr virus infection. *Blood* 2001; **97**: 700–707.
- [32] RUFER N, BRUMMENDORF TH, CHAPUIS B, HELG C, LANSDORP PM, ROOSNEK E. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. *Blood* 2001; **97**: 575–577.
- [33] RUFER N, BRUMMENDORF TH, KOLVRAA S, BISCHOFF C, CHRISTENSEN K, WADSWORTH L, SCHULZER M, LANSDORP PM. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 1999; **190**: 157–167.
- [34] RUFER N, DRAGOWSKA W, THORNBURY G, ROOSNEK E, LANSDORP PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnology* 1998; **16**: 743–747.
- [35] SCHWARTZ A, MARTI GE, POON R, GRATAMA JW, FERNANDEZ-REPOLLET E. Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry* 1998; **33**: 106–114.
- [36] SHAY JW, WRIGHT WE. Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 1996; **8**: 66–71.
- [37] SHERR CJ, DePINHO RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000; **102**: 407–410.
- [38] SZALATA M, SŁOMSKI R. Zakończenia chromosomów: telomery, telomeraza i białka współdziałające. *Post Biol Kom* 2000; **27** (supl.14): 95–117.
- [39] VAZIRI H, BENCHIMOL S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 1998; **8**: 279–282.
- [40] WENG NP, GRANGER L, HODES RJ. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 10827–10832.
- [41] WHITE LK, WRIGHT WE, SHAY JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol* 2001; **19**: 114–120.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 06.06.2001 r.

Przyjęto: 09.07.2001 r.

Adres autora: Zakład Immunologii Klinicznej AM,  
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8

e-mail: drag@eskulap.am.lublin.pl





# AUTOANTYGENY PLEMNIKOWE – I. CHARAKTERYSTYKA IMMUNOBIOLOGICZNA

## SPERM AUTOANTIGENS – I. IMMUNOBIOLOGICAL CHARACTERISATION

Alina DOMAGAŁA, Maciej KURPISZ

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

*Streszczenie:* Antygeny plemników mogą wywoływać reakcje izo- oraz autoimmunologiczne. Stąd też ważne jest zidentyfikowanie, a następnie wyizolowanie autoantygenów plemnikowych, swoiście reagujących z przeciwciałami. Może to nie tylko mieć wartość poznawczą, ale także znaleźć zastosowanie w regulacji rozrodu. W niniejszym artykule opisano poznane autoantygeny plemnikowe obecne zarówno na powierzchni, jak i we wnętrzu komórki. Przedstawiono również wyniki badań opisujących próby uczulania zwierząt laboratoryjnych i użytkowych celem zaindukowania niepłodności.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 483–496)

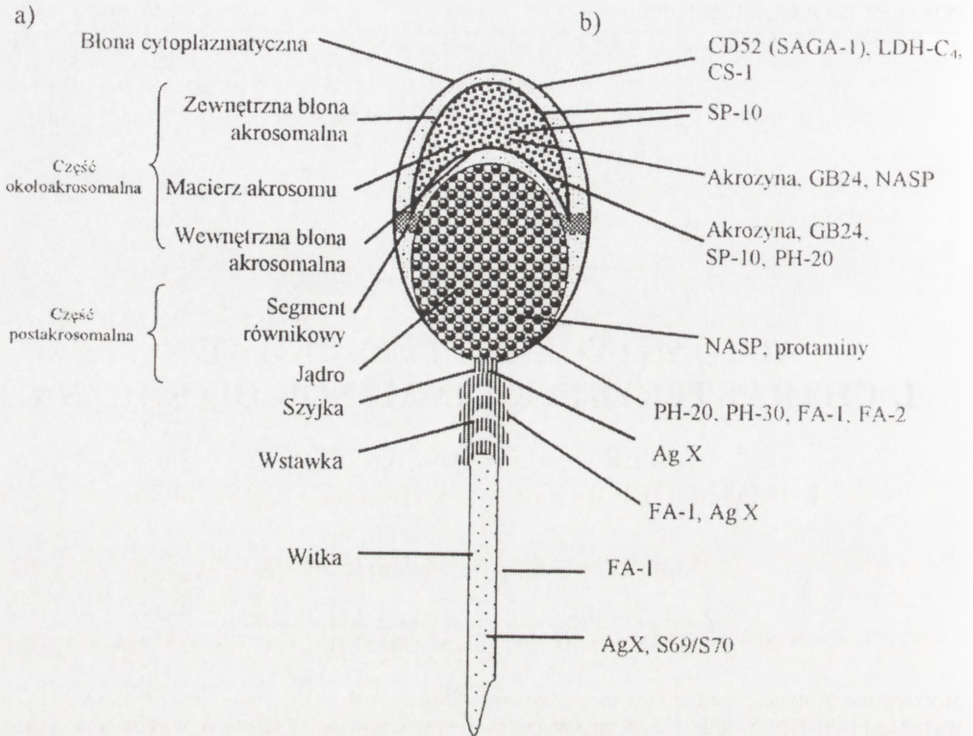
*Słowa kluczowe:* plemniki, autoantygeny, immunogeny, przeciwplemnikowe przeciwciała monoklonalne.

*Summary:* Sperm antigens may provoke iso- and autoimmune responses. Therefore, it is important to identify and to purify isolated sperm entities specifically reacting with antisperm antibodies. This would allow to set an insight into immunological background of infertility and to prospectively develop procedures to vaccinate animal species and human beings for fertility regulation. The present review compiles data concerning the characterisation of the presently recognised sperm antigens that are distributed on the surface of the spermatozoon and within its internal compartments. Results of some animal studies towards identification of immunogenicity of particular sperm antigens are also updated.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 483–496)

*Key words:* sperm, autoantigens, immunogens, antisperm immune responses.

Błona komórkowa plemnika jest mozaiką domen powierzchniowych, które różnią się pomiędzy sobą budową i funkcją [27]. Ograniczenie występowania powierzchniowych komponentów do określonych obszarów błony komórkowej pozwala na zachowanie integralności domen i kontrolę kompleksowej organizacji plazma-



RYCINA 1. Schematyczna budowa plemnika: a – akrosom jest *organellum* zlokalizowanym w przedniej części główki, jego błona zewnętrzna znajduje się pod plazmalemą, natomiast błona wewnętrzna w pobliżu jądra komórkowego; jądro zlokalizowane jest w tylnej części główki, zawiera wysoce skondensowaną chromatinę haploidalnego genomu ojcowskiego; b – lokalizacja opisywanych autoantygenów plemnika (opracowano na podstawie [10] str. 10)

lemmy [8]. Segregację białek w środowisku błony komórkowej określają właściwości termodynamiczne błony oraz jej specjalna struktura pomiędzy domenami ograniczająca dyfuzję sąsiadujących składników. Formowanie specyficznych domen na powierzchni plemników rozpoczyna się już w gonadzie i jest kontynuowane podczas przechodzenia plemników przez wszystkie odcinki układu rozrodczego (także w wyniku oddziaływania z płynem nasiennym) oraz podczas zapłodnienia.

## 1. ANTYPYGENY GŁÓWKI PLEMNIKA

### 1.1. Antygen GB24

Antygen zidentyfikowano za pomocą przeciwciała monoklonalnego, uzyskanego w wyniku uczulania myszy mikrokosmkami wyizolowanymi z ludzkiego łożyska [19]. Przeciwciało to reagowało krzyżowo z antygenem obecnym w ludzkich lim-



focytach i na trofoblaście oraz w akrosomie plemników człowieka, które poddano procedurze zwiększenia przepuszczalności błon lub które uległy reakcji akrosomalnej. Tę lokalizację potwierdzono badaniami ultrastrukturalnymi z wykorzystaniem znakowania fluorescencyjnego, w których wykazano obecność antygeny GB24 na adluminalnej części wewnętrznej błony akrosomalnej i w *matrix* akrosomu, natomiast nie stwierdzono jego obecności na powierzchni komórki [13].

Przypuszczalnie funkcja antygeny GB24 polega na ochronie plemników po odbytej reakcji akrosomalnej w żeńskich drogach rozrodczych, poprzez blokowanie kaskady dopełniacza. Podobną funkcję ochronną białko to pełni wobec komórek autologicznych w relacjach immunologicznych pomiędzy matką a płodem.

## 1.2. Antygen CD52 (SAGA-1)

Isojima i wsp. wykorzystując limfocyty krwi obwodowej pochodzące od kobiety, u której stwierdzono wysokie miano przeciwciał przeciwplemnikowych, uzyskali mysio-ludzkie przeciwciało monoklonalne (mAb – ang. *monoclonal antibody*) nazwane H6-3C4, które wykazywało właściwości aglutynacji oraz immobilizacji plemników (poprzez uruchomienie kaskady komplementu) oraz reagowało z epitopami mającymi N-wiązane reszty cukrowcowe [20].

W niezależnych badaniach [12], przy użyciu mysiego mAb oznaczonego jako S19, o właściwościach aglutynacji i immobilizacji plemników w śluzie szyjkowym oraz blokowania ich wiązania z osłonką przejrzystą komórki jajowej, scharakteryzowano antygen obecny na powierzchni plemników, znany jako SAGA-1 (ang. *sperm agglutination antigen-1* = antygen aglutynujący plemniki-1). Wykazano, że przeciwciało S19 rozpoznawało epitop, w którego skład wchodziły reszty węglowodanowe (obecne w antygenie SAGA-1). Przeprowadzone testy kompetycyjne i układ prążków w reakcji immunoblotowania nasunęły przypuszczenie, że antygeny SAGA-1 i rozpoznawany przez H6-3C4 reprezentują tę samą glikoproteinę(ny) spermy. Analiza sekwencyjna wykazała, że część białkowa obu antygenów jest identyczna i ponadto wykazuje 100% homologię z obecnym na powierzchni limfocytów antygenem CD52. mRNA dla tego antygeny jest produktem genu zlokalizowanego na chromosomie 1 u człowieka. Transkrypty dla CD52 wykryto w komórkach nabłonkowych końcowych fragmentów najądrza i w przewodach wyprowadzających nasienie, nie występowały one natomiast w komórkach szlaku spermatogenezy i w plemnikach ani w początkowych regionach najądrza [37].

Przeciwciała anti-CD52 silnie reagują z komórkami nabłonkowymi wyściełającymi ogon najądrza oraz obecną tam wydzieliną, jak i z plemnikami najądrzowymi (ale nie jądroowymi), co sugeruje pojawienie się tego antygeny na powierzchni komórek dopiero podczas późniejszego dojrzewania plemników. Jest to niezwykle zjawisko w odniesieniu do białek zakotwiczonych w błonie komórkowej za pomocą



glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI – ang. *glycosylphosphatidylinositol*), do których należy antygen CD52.

Antygeny CD52 obecne na plemnikach i limfocytach są glikoizofornami – glikoproteinami o tym samym rdzeniu białkowym, lecz różniącymi się składem i strukturą reszt oligosacharydowych [11]. Ekspresja antygeny CD52 na powierzchni limfocytów postawiła pod znakiem zapytania jego zastosowanie jako potencjalnego kandydata do wyprodukowania szczepionki antykoncepcyjnej ze względu na możliwość wystąpienia reakcji autoagresji. Zidentyfikowanie na plemnikowym CD52 unikatowych glikoform i stwierdzenie ich obecności na wszystkich domenach powierzchniowych gamety męskiej stwarza jednakże możliwości wykorzystania takiej szczepionki. Jednym ze sposobów mogłoby być np. użycie mAbs skierowanych przeciw plemnikowym CD52 w postaci spermicydu dopochwowego lub aktywna immunizacja za pomocą komponentów cukrowcowych, występujących w plemnikowej glikoformie antygeny CD52.

### 1.3. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH-C4)

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH-C4 – ang. *lactate dehydrogenase C4*) jest to enzym glikolityczny, który w formie izozymów, zbudowanych z podjednostek typu A, B lub C, występuje we wszystkich komórkach organizmu. Podjednostki, z których każda jest produktem oddzielnego genu, tworzą homo- lub heterotetrameryczne łańcuchy białkowe, które są tkankowo i funkcjonalnie zróżnicowane.

Izozym dehydrogenazy mleczanowej, zbudowany z podjednostek typu C, występuje wyłącznie w tkance jądra i w plemnikach ssaków. Do jego ekspresji dochodzi podczas profazy pierwszego podziału mejotycznego spermatocytów pierwszego rzędu.

Stwierdzono, że skoro podjednostka C enzymu występuje wyłącznie w/n komórkach szlaku rozrodczego ssaków, to może ona posłużyć jako determinanta unikatowa do wyprodukowania szczepionki antykoncepcyjnej. Przeciwciała przeciw LDH-C4 reagują wyłącznie z plemnikami i nie dają reakcji krzyżowych z izozymami LDH obecnymi w komórkach somatycznych [42]. Testy immunohistochemiczne przeprowadzone na skrawkach ludzkich tkanek jądra, łożyska, mięśni, nerek, jajnika, skóry, serca i macicy z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw ludzkiej LDH-C4 i LDH-A4 potwierdziły występowanie LDH-C4 wyłącznie w tkance jądra [14].

Przeciwciała skierowane przeciw LDH-C4 powodują spadek płodności samic myszy, królika i pawiana [42]. Na uwagę zasługuje fakt, że LDH-C4 jest pierwszym antygenem plemnikowym, który udało się wyizolować w ilościach preparatycznych z tkanki mysiego jądra, a uzyskane przeciwciała nie tylko reagują z LDH-C4 innych gatunków ssaków, ale także powodują aglutynację plemników u królika, myszy i człowieka [22].

Testy immunofluorescencyjne wykazały wiązanie przeciwciał przeciw LDH-C4 do witki (plemniki utrwalone) lub do powierzchni całej komórki (preparaty nie utrwalone) [3]. Metodą *immunogold* wykazano obecność LDH-C4 we wstawce (*matrix* mitochondrialna) oraz witce plemników [4].

Założono, że przeciwciała anty-LDH-C4, obecne w drogach rozrodczych samic uczulanych tym antygenem, mogą powodować zahamowanie koncepcji. Na początku lat osiemdziesiątych przeprowadzono pierwsze próby obniżenia płodności zwierząt laboratoryjnych poprzez ich uczulanie przy użyciu LDH-C4, wyizolowanej z mysich plemników [15]. Próby te zakończyły się zahamowaniem wystąpienia ciąży u 75% samic pawianów, przy czym efekt niepłodności zależał od miana przeciwciał w surowicy zwierząt i był odwracalny.

Przeprowadzono również próby sprowokowania odpowiedzi immunologicznej przeciw plemnikom, wykorzystując syntetyczny peptyd zawierający sekwencję 20 aminokwasów, specyficznych dla mysiej plemnikowej izoformy dehydrogenazy mleczanowej [41]. U samic pawiana zaindukowane w ten sposób przeciwciała spowodowały niepłodność u 70% zwierząt. Również w tym przypadku efekt obniżenia płodności był odwracalny. U zwierząt, uczulanych syntetyczną formą ludzkiej dehydrogenazy mleczanowej, zaobserwowano spadek płodności o 75% [32].

#### 1.4. Antygen tylnego regionu główki-20 – PH-20

PH-20 (ang. *posterior head-20*) jest to antygen tkankowospecyficzny, który ulega ekspresji w haploidalnych komórkach germinalnych jądra, na powierzchni dojrzałych plemników, w regionie postakrosomalnym oraz w wewnętrznej błonie akrosomalnej plemników świnki morskiej [39] i człowieka [23].

PH-20 ma aktywność hialuronidazy, co pozwala plemnikom na penetrację wieńca promienistego; bierze także udział w interakcjach plemnika z komórką jajową. Immunizacja samców świnki morskiej oczyszczonym antygenem prowadziła do zahamowania płodności w 100% przypadków [34]. U samców uczulanych antygenem PH-20 (podawanym wraz z kompletnym, a następnie niekompletnym adjuwantem Freuda) zaobserwowano jednak następujące zmiany histologiczne: autoimmunologiczne zapalenie jąder (tzw. EAO – ang. *experimental autoimmune orchitis*), zanik komórek germinalnych (aspermatoogenezę), fagocytozę plemników przez makrofagi w świetle kanalików jądra i w proksymalnym odcinku ogona najądrza, jak również pojawienie się plemników o nieprawidłowej budowie lub ich zupełny brak w dystalnym odcinku tego narządu [39]. Nie udokumentowano natomiast korelacji pomiędzy występowaniem niepłodności a mianem przeciwciał w surowicy, co sugeruje wpływ dodatkowych czynników na płodność.



### 1.5. Antygen tylnego regionu główki-30 – PH-30

Za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazano obecność PH-30 (ang. *posterior head-30*) w błonie komórkowej plemników przed i po reakcji akrosomalnej, w regionie postakrosomalnym. Ze względu na rolę, jaką antygen ten pełni w procesie zapłodnienia, nazwano go fertyliną [26]. Antygen zbudowany jest z dwóch podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$  (będących integralnymi glikoproteinami błonowymi typu I [5]). Obie podjednostki powstają z większych białek prekursorowych, które ulegają trawieniu proteolitycznemu podczas wędrówki plemników przez najądrze [43]. Podjednostka  $\beta$  fertyliny jest specyficzna dla tkanki jądra świnki morskiej, myszy i małpy [44] oraz człowieka [40], podjednostka  $\alpha$  zaś nie jest białkiem tkankowo-specyficznym [44]. Fertylina  $\beta$  jest produktem genu zlokalizowanego na krótkim ramieniu chromosomu 8 u człowieka [40].

W badaniach nad zastosowaniem fertyliny  $\alpha/\beta$  jako potencjalnego antygeny o właściwościach immunokoncepcyjnych [35] uzyskano niepłodność u 33% samic i 100% samców świnki morskiej uczulanych tym antygenem, jednakże zaobserwowano efekt uboczny w postaci autoimmunologicznego zapalenia najądrzy. Obecnie trwają badania nad określeniem, które peptydy/epitopy prowokują powstanie przeciwciał wywołujących jedynie odpowiedź przeciw plemnikom [40], a nie w tkankach je otaczających.

### 1.6. Antygen związany z procesem zapłodnienia-1 – FA-1

FA-1 (ang. *fertilization antigen-1*) jest to produkowana w gonadzie męskiej konserwatywna cząstka glikoproteinowa, która odgrywa ważną rolę w procesie zapłodnienia. Obecny na powierzchni plemników FA-1 wchodzi w interakcję z cząstką ZP3 osłonki przejrzystej, co prowadzi do wiązania plemników z osłonką i indukuje w nich reakcję akrosomalną [24]. Udowodniono, że FA-1 ulega reakcji z przeciwciałami opłaszczonymi na powierzchni plemników, co pozwala na ich „uwolnienie” z komórek i zaindukowanie reakcji akrosomalnej, a więc na przywrócenie zdolności gamet do zapłodnienia [24].

Testy immunofluorescencyjne wykazały, że mAb anty-FA-1 łączy się do regionu postakrosomalnego główki oraz wstawki i witki, utrwalanych metanolem ludzkich plemników i do tych samych regionów na żywych komórkach bydlęcych [30].

Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw FA-1 blokują proces zapłodnienia poprzez hamowanie reakcji kapacytacji i/lub reakcji akrosomalnej plemników oraz zakłócają ich wiązanie z osłonką przejrzystą.

### 1.7. Antygen związany z procesem zapłodnienia-2 – FA-2

Przeciwciało monoklonalne Vic-1, wyprodukowane w wyniku immunizacji myszy ludzkimi plemnikami [29], wybrano do dalszych analiz, ponieważ charakteryzowało się dużą specyficznością tkankową – reagowało z częścią akrosomalną żywych



(ale nieutrwalonych metanolem) skapacytowanych oraz nieskapacytowanych ludzkich plemników oraz z wstawką i regionem akrosomalnym żywych (również nieutrwalonych) plemników mysich. Przeciwciała nie reagowało natomiast z żadnymi innymi badanymi komórkami i tkankami somatycznymi człowieka. W testach ksenogenicznej penetracji przeciwciała blokowało, w stopniu zależnym od jego stężenia, przenikanie plemników ludzkich do oocytów chemicznych pozbawionych osłonki przejrzystej. Ponadto stwierdzono, że w męskich gametach, oplaszczonych tym przeciwciałem, nie dochodziło do reakcji akrosomalnej i uwolnienia akrozyny. W reakcji immunoblotowania typu Western oraz immunoprecypitacji stwierdzono, że antygen rozpoznawany przez przeciwciała Vic-1, oznaczony jako FA-2 (ang. *fertilization antigen-2*), ma masę cząsteczkową 95 kDa i znajduje się w ekstraktach ludzkich plemników, z których może być izolowany metodą chromatografii powinowactwa.

### 1.8. NZ-1

Sekwencję cDNA kodującą antygen, oznaczony jako NZ-1, sklonowano i zsekwencjonowano z biblioteki cDNA mysiej gonady męskiej, przy użyciu przeciwciał reagujących z powierzchniowymi antygenami plemników o masach cząsteczkowych 14–18 kDa [31]. Przeciwciała klasy IgG, otrzymane w wyniku immunizacji myszy antygenami znajdującymi się w prążkach żelu poliakryloamidowego, o masach 14–18 kDa rozpoznawały antygeny części akrosomalnej i witki żywych oraz utrwalonych metanolem plemników mysich i ludzkich. W testach funkcjonalnych przeciwciała te hamowały penetrację plemników ludzkich do komórki jajowej chomika pozbawionej osłonki przejrzystej oraz przyłączanie plemników mysich do homologicznych oocytów.

Nie znaleziono homologii pomiędzy sekwencją nukleotydową cDNA kodującą antygen NZ-1 oraz sekwencją aminokwasową tego białka z żadną inną znaną sekwencją nukleotydową lub aminokwasową. Hybrydyzacja typu Northern, przeprowadzona z użyciem mRNA wyizolowanego z 11 mysich tkanek (jądra, nerki, wątroby, płuc, mózgu i in.) wykazała ekspresję antygenu NZ-1 wyłącznie w tkance jądra. Świadczy to o specyficzności tkankowej tego białka i możliwości zastosowania go w immunoantykoncepcji. Wstępne badania wykazały bowiem spadek płodności myszy aktywnie immunizowanych tym antygenem [31].

### 1.9. NZ-2

Antygen zidentyfikowano podczas przesiewowej analizy produktów białkowych biblioteki cDNA ludzkiego jądra, które poddawano reakcjom immunologicznym z przeciwciałami uzyskanymi w wyniku uczulania królików antygenami z plemników ludzkich (o masie cząsteczkowej 14–18 kDa), znajdującymi się w wypreparowanych prążkach żelu poliakryloamidowego [45]. Stwierdzono, że antygeny o takiej masie

cząsteczkowej biorą udział w interakcjach plemników ze składnikami osłonki przejrzystej. Przeciwciała uzyskane w reakcji immunoblotowania z ekstraktami ludzkich plemników rozpoznawały antygen o masie cząsteczkowej około 20 kDa. Analiza komputerowa sekwencji cDNA kodującego antygen NZ-2 nie wykazała homologii z żadną inną znaną sekwencją. Udowodniono, że antygen ten jest kodowany przez gen zlokalizowany w chromosomie 7 człowieka. Z analizy sekwencji aminokwasów wynika, że antygen ten ma hydrofobowy odcinek C-końcowy, sugerujący zakotwiczenie tego białka w błonie komórkowej, aczkolwiek nie ma doniesień opisujących jego lokalizację w plemnikach. Wiadomo jedynie, że białko to nie ma żadnych miejsc glikozylacji. Obecnie trwają badania nad przydatnością rekombinowanego antygeny NZ-2 w immunoantykoncepcji oraz w leczeniu niepłodności immunologicznej u ludzi.

### 1.10. SP-10

Antygen zidentyfikowano przy użyciu przeciwciała MHS-10, wyprodukowanego przy zastosowaniu immunogenu w postaci pełnego nasienia [17]. Przeciwciała to blokowało penetrację komórki jajowej chomika przez ludzkie plemniki [1]. W reakcji immunoblotowania zidentyfikowano antygen SP-10 jako serię prążków, odpowiadającą masom cząsteczkowym 18–34 kDa, których polimorfizm okazał się rezultatem alternatywnego składowania i cięć endoproteolitycznych [18, 45]. Badania ultrastrukturalne i biochemiczne wykazały, że antygen SP-10 jest zlokalizowany na wewnętrznych i zewnętrznych błonach akrosomalnych [17]. W badaniach przeprowadzonych w modelu bydłym udowodniono, że zarówno mono-, jak i poliklonalne przeciwciała skierowane przeciw SP-10 hamowały wtórne dołączanie skapacytowanych plemników do osłonki przejrzystej [6].

Antygen SP-10 stanowi obecnie model badawczy do opracowania formy doustnej szczepionki antykoncepcyjnej, przy wykorzystaniu atenuowanych szczepów *Salmonella typhimurium*, produkujących rekombinacyjną formę ludzkiego antygeny SP-10. Udało się wywołać odpowiedź immunologiczną przeciw SP-10 w drogach rozrodczych myszy, którym doustnie podano awirulentną formę rekombinowanych szczepów bakteryjnych [10, 16]. Są to pierwsze opublikowane dane dotyczące sprowokowania odpowiedzi wydzielniczej w przedziale rozrodczym, skierowanej przeciw antygenowi spermy, wyprodukowanemu metodami inżynierii genetycznej i podanemu doustnie.

### 1.11. Akrozyzna

Jest to enzym należący do grupy proteaz serynowych, zlokalizowany w akrosomie ssaków. Pojawia się w formie nieaktywnej, tzw. proakrozyzny o masie cząsteczkowej 53–55 kDa, w stadium wczesnych spermatyd. Podczas reakcji akrosomalnej (za-



inicjowanej przez kontakt plemnika z osłonką przejrzystą oocytu) proakrozyna ulega autoaktywacji. Aktywowana akrozyna, oznaczana jako  $\alpha$ -akrozyna, ulega następnie obróbce proteolitycznej na C-końcu, w wyniku której powstaje produkt o masie cząsteczkowej 38 kDa, zwany  $\beta$ -akrozyną, będący najbardziej stabilną formą enzymu.  $\beta$ -akrozyna uwalniana jest następnie do środowiska. Proteolityczne właściwości enzymu pozwalają na lizę glikoproteinowych komponentów osłonki przejrzystej i penetrację plemnika. Ponadto akrozyna bierze udział w samej reakcji akrosomalnej plemnika i rozpraszaniu macierzy akrosomalnej [38].

Funkcja akrozyny jako autoantygeny nie jest dobrze rozpoznana. Przeciwciała monoklonalne skierowane przeciw akrozynie powodowało hamowanie penetracji plemników chemicznych do osłonki przejrzystej homologicznych oocytów [7]. Jednakże bierna immunizacja samic za pomocą przeciwciała monoklonalnego nie powodowała obniżenia ich płodności ani też zahamowania rozwoju zarodków. Aktywna immunizacja akrozyną królików i owiec nie przyniosła także jednoznacznych i powtarzalnych wyników w postaci obniżenia płodności tych zwierząt [25].

### 1.12. Białko sygnałowe podziałów komórkowych-1 – białko CS-1

Cząsteczka sygnałowa i mechanizm indukcji podziałów zapłodnionego oocytu u ssaków nie są dotąd poznane i stanowią przedmiot badań wielu laboratoriów. Ponieważ samodzielna transkrypcja w ludzkich zarodkach rozpoczyna się dopiero w stadium 4–8 komórek, sygnał do rozpoczęcia pierwszego podziału musi pochodzić z czynników znajdujących się poza jądrem komórkowym zygoty.

Na powierzchni plemnika zidentyfikowano antygen o masie 33 kDa, zbudowany z podjednostek o masach 14 i 18 kDa, oznaczony jako białko CS-1 (ang. *cleavage signal-1*), który może stanowić pierwszy sygnał do podziału zapłodnionej komórki jajowej [28]. Stwierdzono, że białko CS-1 obecne jest na powierzchni plemników różnych gatunków ssaków, w tym człowieka i myszy.

Interesujący jest fakt, iż w surowicy pacjentów (kobiet i mężczyzn), z niepłodnością na tle immunologicznym oraz u osobników o innej etiologii niepłodności, obecne są przeciwciała reagujące z białkiem CS-1, które blokują pierwszy podział zarodków. Sklonowano i zsekwencjonowano cDNA kodujący CS-1 (1828 par zasad, 249 aminokwasów). Nie znaleziono homologii cDNA i jego produktu białkowego z żadną dotychczas poznaną sekwencją nukleotydową lub aminokwasową [21]. Obecnie prowadzone są prace nad zastosowaniem białka CS-1 do produkcji szczepionki antykoncepcyjnej.

## 2. ANTYGENY JĄDRA PLEMNIKÓW

### 2.1. Protaminy

Białka te były pierwszymi autoantygenami wyizolowanymi z ludzkich plemników [36]. Zidentyfikowano je metodą immunofluorescencji pośredniej przy zastosowaniu surowic ludzkich o wysokich mianach ASA (ang. *antisperm antibodies* – przeciwciała przeciwplemnikowe). Za pomocą chromatografii wymiennej i filtracji w żelu wyizolowano i oczyszczono 2 reaktywne antygeny, oznaczając je jako protaminy 1 i 2. Są to białka o charakterze zasadowym, bogate w argininę, zbudowane odpowiednio z 47 i 51 aminokwasów. Homologi protamin wyizolowano z plemników wielu różnych kręgowców.

W jądrze dojrzałego plemnika, protaminy leżą w rowkach helisy DNA i poprzez neutralizację ładunku elektrostatycznego pozwalają na odpowiednią kondensację chromatyny. Poza tym pełnią funkcję stabilizacji kompleksów DNA – białko poprzez wzajemne łączenie się mostkami dwusiarczkowymi.

### 2.2. Białko autoantygenowe jądra plemnika – NASP

NASP (ang. *nuclear autoantigenic sperm protein*) wykryto podczas badań spermy króliczej i stwierdzono obecność homologicznego białka w plemnikach człowieka. W teście immunofluorescencji pośredniej został on zlokalizowany w akrosomie plemników przed reakcją akrosomalną oraz w komórkach poddanych procedurze zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej. W plemnikach, w których doszło do reakcji akrosomalnej, antygen znajduje się w regionie równikowym główki. Analiza cDNA króliczego i ludzkiego NASP wykazała znaczne podobieństwo do cDNA kodującego białko wiążącego histony u *Xenopus* (N1/N2) [33]. Stąd pojawiły się spekulacje, że z uwagi na występowanie w jądrze komórkowym białko NASP może pełnić również funkcję białka wiążącego histony.

Ostatnio [2], przy użyciu surowic (ASA+) od pacjentów po wasektomii, zidentyfikowano immunoreaktywne epitopy białka NASP.

## 3. ANTYGENY WITKI

### 3.1. Antygen S69/S70

Przeciwciała S69 i S70, wyprodukowane w odpowiedzi na antygeny ludzkich plemników, w których uprzednio doszło do reakcji akrosomalnej, reagowały z antygenem występującym w witce ludzkich plemników, po zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej. Przeciwciała te nie reagowały jednak z antygenami żywych



plemników ludzkich ani też z plemnikami innych gatunków zwierząt, nawet po poddaniu ich procedurze zwiększenia przepuszczalności błon. Mikroskopia elektro-nowa pozwoliła na zlokalizowanie antygenów rozpoznawanych przez oba przeciwciała na zewnętrznych włóknach gęstych i potwierdzono ich brak na powierzchni plemników.

Nie odnotowano dalszych doniesień na temat tego, czy przeciwciała S69 i S70 reagują z tym samym antygenem ani też takich, które zawierałyby dalszą charakterystykę tego antygeny.

### 3.2. Antygen X (AgX)

Antygen ten został zidentyfikowany przez Diekmana i wsp. [9] podczas badań przesiewowych biblioteki cDNA ludzkiej gonady męskiej. Do selekcji pozytywnych fagów wykorzystano surowice od niepłodnych pacjentów (ASA+). Stwierdzono, że istnieją 2 izoformy tego białka, oznaczone jako AgX-1 oraz AgX-2, o masach cząsteczkowych odpowiednio 56 i 58 kDa, przy czym antygen AgX-1 występuje wyłącznie w tkankach jądra i w plemnikach, natomiast białko AgX-2 w komórkach somatycznych. Uczulając króliki syntetycznym peptydowym epitopem antygeny X wyprodukowano wysoce specyficzne przeciwciała. Zastosowanie ich w analizie immunofluorescencyjnej pozwoliło na wykrycie antygeny X w szyjce, wstawce i witce plemników ludzkich. Dokładniejsza analiza z użyciem mikroskopu elektronowego wykazała obecność AgX w zewnętrznych włóknach gęstych witki ludzkich plemników, traktowanych detergentami niejonowymi.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDERSON DJ, JOHNSON PM, ALEXANDER NJ, JONES WR, GRIFFIN PD [W] Monoclonal antibodies to human trophoblast and sperm antigens: Report of two WHO – sponsored workshops, June 30, 1986 – Toronto, Canada. *J Reprod Immunol* 1987; **10**: 231–257.
- [2] BATOVA IN, RICHARDSON RT, WIDGREN EE, ORAND MG. Analysis of the autoimmune epitopes on human testicular NASP using recombinant and synthetic peptides. *Clin Exp Immunol* 2000 Aug; **121**: 201–209.
- [3] BEYLER SA, WHEAT TE, GOLDBERG G. Binding of antibodies against antigenic domains of murine lactate dehydrogenase C<sub>4</sub> to human and mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 1985; **32**: 1201–1210.
- [4] BURGOS C, MALDONADO C, GEREZ DE BURGOS NM, AOKI A, BLANCO A. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C<sub>4</sub> in mice. *Biol Reprod* 1995 Jul; **53**: 84–92.
- [5] BLOBEL CP, MYLES DG, PRIMAKOFF P, WHITE JM. Proteolytic processing of a protein involved in sperm - egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol* 1990; **111**: 69–78.
- [6] COONROD SA, WESTUSIN ME, HERR JC. Inhibition of bovine fertilization *in vitro* by antibodies to SP-10. *J Reprod Fertil* 1996; **107**: 287–297.

- [7] DE IOANNES AE, BECKER MI, PÉREZ C, CAPOTE C, BARROS C. Role of acrosin and antibodies in gamete interactions. [w] Alexander NJ, Griffin D, Pieler JM, White GMH [red.] Gamete interaction: Prospects for immunocontraception. Wiley-Liss, Inc. New York 1990: 185–195.
- [8] DIEKMAN AB, GOLDBERG E. Sperm antigens: where are the private specificities. [W] Kurpisz M, Fernandez N [red.] Immunology of Human Reproduction. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford 1995: 2.
- [9] DIEKMAN AB, GOLDBERG E. Characterization of a human antigen with sera from infertile patients. *Biol Reprod* 1994; **50**: 1087–1093.
- [10] DIEKMAN AB, HERR JC. Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am J Reprod Immunol* 1997; **37**: 111–117.
- [11] DIEKMAN AB, NORTON EJ, KLOTZ KL, WESTBROOK VA, HERR JC. Evidence for unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. *Immunol Rev* 1999; **171**: 203–212.
- [12] DIEKMAN AB, WESTBROOK-CASE VA, NAABY-HANSEN S, KLOTZ KL, FLICKINGER CJ, HERR JC. Biochemical characterization of Sperm Agglutination Antigen-1, a human sperm antigen implicated in gamete interactions. *Biol Reprod* 1997; **57**: 1136–1145
- [13] FÉNICHEL P, DOHR G, GRIVAUX C, CERVONI F, DONZEAU M, HSI B. Localization and characterization of the acrosomal antigen recognized by GB24 on human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; **27**: 173–178.
- [14] GOLDBERG E, HERR JC. LDH-C<sub>4</sub> as a contraceptive vaccine. [W] Gupta SK [red.] Reproductive immunology. Narosa Publishing House, New Delhi 1999: 309–315.
- [15] GOLDBERG E, WHEAT TE, POWELL JE, STEVENS VC. Reduction of fertility of female baboons immunized with lactate dehydrogenase-C<sub>4</sub>. *Fertil Steril* 1981; **35**: 214–217.
- [16] HERR JC. Update on the center for recombinant gamete contraceptive vaccinogens. *Am J Reprod Immunol* 1996; **35**: 184–189.
- [17] HERR JC, FLICKINGER CJ, HOMYK M, KLOTZ K, JOHN E. Biochemical and morphological characterization of the intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biol Reprod* 1990; **42**: 181–193.
- [18] HERR JC, KLOTZ K, SHANNON J, WRIGHT RM, FLICKINGER CJ. Purification and microsequencing of the intra- acrosomal protein SP-10. Evidence that SP-10 heterogeneity results from endoproteolytic processes. *Biol Reprod* 1992; **47**: 11–20.
- [19] HSI B, YEH C, FENICHEL P, SAMSON M, GRIVAUX C. Monoclonal natibody GB24 recognizes trophoblast - lymphocyte cross-reactive antigen. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; **18**: 21–27.
- [20] ISOJIMA S, KAMEDA K, TSUJI Y, SHIGETA M, IKEDA Y, KOYAMA K. Establishment and characterization of a human hybridoma secreting monoclonal antibody with high titers of sperm immobilizing and agglutination activities against human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 1987; **10**: 67–78.
- [21] JAVED AA, NAZRK. Human cleavage signal-1 protein: molecular cloning, transcription and immunological analysis of *in vitro* translated protein. *Gene* 1992; **112**: 205–211.
- [22] LEE CY, YUAN JH, GOLDBERG E. Lactate dehydrogenase from the mouse. *Meth Enzymol* 1982; **89**: 351–362.
- [23] LIN Y, KIMMEL LH, MYLES DG, PRIMAKOFF P. Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10071–10075.
- [24] MENGE AC, OHL DA, CHRISTMAN GM, NAZRK. Fertilization antigen -1 (FA-1) removes antisperm antibodies from sperm of infertile men resulting in increased rates of acrosome reaction. *Fertil Steril* 1999; **71**: 256–260.
- [25] MORTON DB, McANULTY PA. The effect on fertility of immunizing female sheep with ram sperm acrosine and hyaluronidase. *J Reprod Immunol* 1979; **1**: 61–73.



- [26] MYLES DG, KIMMEL LH, BLOBEL CP, WHITE JM, PRIMAKOFF P. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for egg - sperm fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4195–4198.
- [27] MYLES DG, KOPPEL DE, PRIMAKOFF P. Defining sperm surface domains. [W] Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH [red.] Gamete Interaction: Prospects for immunocontraception. Wiley-Liss, Inc. New York 1990: 1–11.
- [28] NAZ RK. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol Reprod* 1992; **46**: 130–139.
- [29] NAZ RK, MORTE C, GARCIA FRAMIS V, KAPLAN P, MARTINEZ P. Characterization of a sperm-specific monoclonal antibody and isolation of 95-kilodalton fertilization antigen-2 from human sperm. *Biol Reprod* 1993; **49**: 1236–1244.
- [30] NAZ RK, PHILLIPS TM, ROSENBLUM BB. Characterization of the fertilization antigen-1 for the development of a contraceptive vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 573–577.
- [31] NAZ RK, ZHU X. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding for a novel testis-specific antigen. *Mol Reprod Dev* 1997; **48**: 449–457.
- [32] O'HERN PA, LIANG ZG, BAMBRA CS, GOLDBERG E. Colinear synthesis of an antigen-specific B-cell epitope with a „promiscuous” tetanus toxoid T-cell epitope: a synthetic peptide immunocontraceptive. *Vaccine* 1997; **35**: 1761–1766.
- [33] O'RAND MG, RICHARDSON RT, ZIMMERMAN LJ, WIDGREN EE. Sequence and localization of human NASP: conservation of a *Xenopus* histone -binding protein. *Devel Biol* 1992; **154**: 37–44.
- [34] PRIMAKOFF P, WOOLMAN-GAMER L, TUNG KSK, MYLES D. Reversible effect of PH-20 immunization in male guinea pigs. *Biol Reprod* 1997; **56**: 1142–1146.
- [35] RAMARAO CS, MYLES DG, WHITE JM, PRIMAKOFF P. Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin  $\beta$  subunit. *Mol Reprod Dev* 1996; **43**: 70–75.
- [36] SAMUEL T, KOLK A. Auto-antigenicity of human protamines. [W] Lepow JH, Crosier R [red.] Vasectomy: Immunologic and pathophysiologic effects in animals and man. Academic Press, Inc. New York 1979: 205–220.
- [37] SCHRÖTER S, DERR P, HARALD SC, NIMTZ M, HALE G, KIRCHOFF C. Male-specific modifications of human CD52. *J Biol Chem* 1999; **274**, 42: 29862–29873.
- [38] TESARIK J, DRAGORAD J, PEKNICOVA J. Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1988; **50**: 133–141.
- [39] TUNG KSK, PRIMAKOFF P, WOOLMAN-GAMER L, MYLES DG. Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20. *Biol Reprod* 1997; **56**: 1133–1141.
- [40] VIDAEUS CM, von KAPP-HERR C, GOLDEN WL, EDDY RL, SHOWS TB, HERR JC. Human fertilin : identification, characterization, and chromosomal mapping of an ADAM gene family member. *Mol Reprod Dev* 1997; **46**: 363–369.
- [41] WHEAT TE, GOLDBERG E. Antigenic domains of the sperm-specific lactate dehydrogenase C<sub>4</sub> isozyme. *Molec Immunol* 1985; **22**: 643–649.
- [42] WHEAT TE, GOLDBERG E. Sperm-specific lactate dehydrogenase C<sub>4</sub>: Antigenic structure and immuno-suppression of fertility. *Isosymes Cur Top Biol Med Res* 1983; **7**: 113–130.
- [43] WOLFSBERG TG, BAZAN JF, BLOBEL CP, MYLES DG, PRIMAKOFF P, WHITE JM. The precursor region of a protein active in sperm - egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10783–10787.
- [44] WOLFSBERG TG, STRAIGHT PD, GERENA LR, HUOVILA AP, PRIMAKOFF P, MYLES GG, WHITE JM. ADAM: A widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* 1995; **169**: 378–383.

- [45] WRIGHT RM, SURI AK, KORNREICH B, FLICKINGER CJ, HERR JC. Cloning and characterization of the gene coding for the human acrosomal protein SP-10. *Biol Reprod* 1993; **49**: 316–325.
- [46] ZHU X, NAZ RK. Cloning and sequencing of cDNA encoding for a human sperm antigen involved in fertilization. *Mol Reprod Dev* 1998; **51**: 176–183.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 10.06.2001 r.*

*Przyjęto: 10.07.2001 r.*

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



## AUTOANTYGENY PLEMNIKOWE – II. ASPEKTY FUNKCJONALNE I APLIKACYJNE

### SPERM AUTOANTIGENS – II. APPLICATION AND FUNCTIONAL ASPECTS

Alina DOMAGAŁA, Maciej KURPISZ

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

*Streszczenie:* Głównym komponentem zewnętrznej powierzchni błony komórkowej *Eucaryota* są ugrupowania cukrowcowe. Ich obecność warunkuje właściwości fizykochemiczne, immunologiczne oraz biologiczne błony komórkowej. Reszty oligosacharydowe, jako jednostki niosące niezwykle bogatą informację biologiczną, odgrywają także zasadniczą rolę w interakcjach międzykomórkowych. W procesie zapłodnienia, interakcje glikoproteinowych receptorów i ich ligandów, obecnych na powierzchni gamety męskiej i żeńskiej, warunkują gatunkowo-specyficzne rozpoznanie oraz prawidłowy przebieg poszczególnych etapów zapłodnienia. W artykule przedstawiono również aspekty opracowania szczepionki antykoncepcyjnej, opartej na strukturach gamety męskiej.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 497–507)

*Słowa kluczowe:* glikoproteiny, plemnik, zapłodnienie, immunoantykoncepcja.

*Summary:* Sugar moieties represent the main component of external cell surface in *Eucaryota*. Their presence not only determines the physicochemical, immunological and biological properties of the plasma membrane. Sugar moieties do play a major role in cell interactions. During fertilisation, male and female gamete receptors and their ligands undergo reciprocal interactions, determining the species-specific recognition and they control the subsequent fertilisation stages. Main aspects of the development of a contraceptive vaccine, based on components of the male gamete are also outlined.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 497–507)

*Key words:* glycoproteins, sperm, fertilisation, immunocontraception.

## 1. ROLA POWIERZCHNIOWYCH RESZT OLIGOSACHARYDOWYCH PLEMNIKA

Łańcuchy cukrowcowe stanowią główny składnik zewnętrznej powierzchni komórek eukariotycznych i często są charakterystyczne dla określonego typu komórek [6]. Na różnych stadiach różnicowania komórkowego ulegają ekspresji różne łańcuchy węglowodanowe (w wielu przypadkach rozpoznawane przez specyficzne przeciwciała), które tworzą tzw. antygeny różnicowania. W dorosłych organizmach, ekspresja poszczególnych ugrupowań cukrowcowych jest komórkospecyficzna. Ten sam polipeptyd ulegając ekspresji w dwóch różnych typach komórek (lub tkanek) tego samego gatunku jest różnie glikozylowany, stąd komórki mają unikatowy glikotyp.

Komórkospecyficzne węglowodany biorą udział w interakcjach międzykomórkowych. Są one cząstkami rozpoznawanymi przez białka wiążące reszty cukrowcowe, do których należą lektyny i glikozylotransferazy [6]. Odmienność struktur węglowodanowych w różnych typach komórek pozwala na dostarczenie specyficznych sygnałów, rozpoznawanych przez odpowiednie cząsteczki receptorowe. Zmiany zachodzące w strukturze powierzchniowych łańcuchów węglowodanowych są źródłem pojawiania się komórek z różnymi cząsteczkami sygnałowymi, których obecność jest konieczna w cyklu różnicowania komórkowego. Zmiany zachodzące w strukturze powierzchniowych węglowodanów ułatwiają także komórkom nowotworowym interakcje z innymi komórkami, np. prowadząc do przerzutów.

Łańcuchy węglowodanowe mają unikatową i kompleksową strukturę. W przeciwieństwie do kwasów nukleinowych i białek, mogą się z sobą łączyć w więcej niż jeden sposób: jedna reszta cukrowcowa może się przyłączyć do grup hydroksylowych sąsiadującego cukru, znajdujących się w 3 lub 4 różnych pozycjach. Ponadto połączenie pomiędzy dwiema resztami cukrowcowymi, w zależności od rodzaju izomeru, może przybierać formy wiązania  $\alpha$ - lub  $\beta$ -, dodatkowo reszty węglowodanowe tworzą liczne rozgałęzienia. Ta ostatnia cecha zdecydowanie wyróżnia węglowodany spośród innych makromolekuł biologicznych, które zawierają prawie wyłącznie struktury linearne.

Modyfikacje strukturalne łańcuchów węglowodanowych są teoretycznie nieskończone, w praktyce jednakże istnieje ograniczona pula wariacji strukturalnych. Jest to spowodowane tym, iż węglowodany nie są bezpośrednimi produktami genów pierwszorzędowych, są one bowiem syntetyzowane przez glikozylotransferazy, które są białkowymi produktami genów. Glikozylotransferazy z kolei katalizują tworzenie łańcuchów oligo- i polisacharydowych oraz glikozylację białek i lipidów komórkowych. W związku z tym, w każdej komórce musiałyby istnieć osobne geny dla każdej nowej struktury łańcuchów oligosacharydowych, co niosłoby zbyt dużą ich dywersyfikację. Ponadto, węglowodany są bardzo często syntetyzowane ze wspólnej cząsteczki prekursorowej, a to ogranicza zmienność produktów finalnych.



Różnorodność i złożoność jednostek węglowodanowych w glikoproteinach sprawia, że nie tylko są one bogate w informację, ale mają też duże znaczenie funkcjonalne. Stwierdzono, że reszty cukrowce glikoprotein determinują ich właściwości fizykochemiczne (lepkość, rozpuszczalność, ładunek, odporność na denaturację), immunologiczne (powinowactwo do układu immunologicznego) oraz właściwości biologiczne. Reszty oligosacharydowe łańcuchów glikoproteinowych pełnią różnorodne funkcje biologiczne:

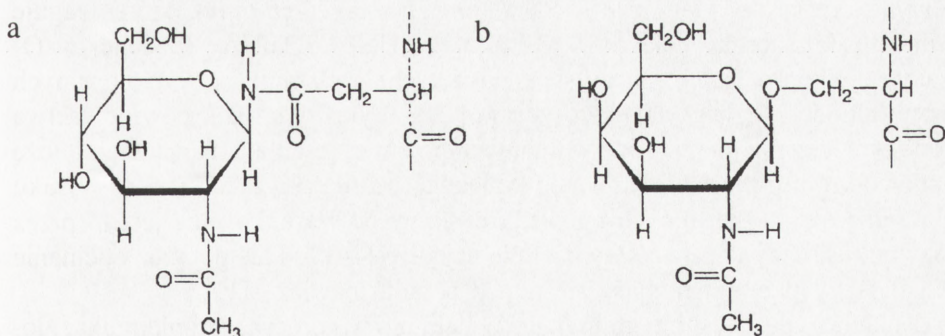
- stanowią ochronę przed proteolizą zarówno zewnątrz-, jak i śródkomórkową;
- wykazują aktywność biologiczną (np. HCG);
- wpływają na proces wbudowywania białek do błon komórkowych;
- wewnątrzkomórkową migrację, przepuszczalność i wydzielanie;
- rozwój embrionalny i różnicowanie;
- odpowiedzialne są za umiejscowienie się przerzutów nowotworowych [11].

Węglowodany pełnią bardzo ważną rolę w oddziaływaniu plemnika i komórki jajowej w procesie zapłodnienia. Dojrzały oocyt ssaków otoczony jest przez osłonkę przejrzystą. Receptor na powierzchni plemnika rozpoznaje połączone wiązaniami O-glikozydowymi oligosacharydy osłonki przejrzystej, co inicjuje reakcję akrosomalną, a w konsekwencji penetrację osłonki przejrzystej i zapłodnienie.

Na podstawie sposobu wiązania pomiędzy łańcuchem polipeptydowym a łańcuchem oligosacharydowym, glikoproteiny mogą być podzielone na 4 klasy [13]:

- zawierające wiązanie między Ser lub Thr a GalNAc,
- proteoglikany zawierające wiązanie pomiędzy Ser a Xyl,
- kolagen zawierający wiązanie pomiędzy hydroksylizyną (Hyl) a Gal,
- glikoproteiny zawierające wiązanie między Asn a GlcNAc.

Ponieważ proteoglikany i kolagen występują stosunkowo rzadko, dlatego też określenie glikoproteiny O-wiązane używa się do opisywania glikoprotein pierwszej grupy, natomiast glikoproteiny N-wiązane do opisywania ostatniej grupy. Liczba łańcuchów oligosacharydowych przyłączonych do jednego łańcucha polipeptydo-



RYCINA 1. a – N-acetyloglucozamina połączona z resztą asparaginową (wiązanie N-glikozydowe), b – N-acetylogalaktozamina połączona z resztą serynową (wiązanie O-glikozydowe)

wego może zmieniać się od 1 do 30 i więcej, a liczba reszt cukrowcowych tworzących jeden łańcuch oligosacharydowy waha się od 2 lub 3 do bardzo wielu. Ponadto niektóre glikoproteiny zawierają łańcuchy oligosacharydowe zarówno O-, jak i N-wiązane.

N- i O-wiązane reszty cukrowcowe są rozgałęzione i mają strukturę trzecio- i czwartorzędową. Poszczególne miejsca glikozylacji nie zawierają struktur oligosacharydowych jednego typu, ale raczej konserwatywną populację łańcuchów oligosacharydowych. Zjawisko to określane jest jako mikroheterogenność, a ponieważ większość łańcuchów glikoproteinowych zawiera szereg miejsc glikozylacji, łańcuchy te tworzą tzw. glikoformy, które różnią się strukturą i miejscem przyłączenia reszt oligosacharydowych do danej sekwencji aminokwasowej.

## 2. ROLA RESZT OLIGOSACHARYDOWYCH NA POWIERZCHNI PLEMNIKÓW

W momencie opuszczania nabłonka plemnikotwórczego plemniki są niezdolne do zapłodnienia komórki jajowej. Proces ich dojrzewania morfologicznego i funkcjonalnego zachodzi dopiero w trakcie wędrówki przez najądrze. W wyniku zachodzących tam procesów, plemniki nabywają zdolności do ruchu oraz przyłączania się do osłonki przejrzystej oocytu.

Błona komórkowa plemnika, odgrywająca zasadniczą rolę we wczesnych etapach procesu zapłodnienia, podlega w najądrzach licznym modyfikacjom biochemicznym. Następuje tam nie tylko adsorpcja makrocząsteczek (obecnych w płynie nasiennym) do powierzchni błony komórkowej, ale także ekspozycja na powierzchni plazmalemmy uprzednio zamaskowanych makrocząsteczek (w wyniku rearanżacji antygenów błonowych) oraz obróbka istniejących antygenów przez proteazy, glikozydazy i/lub glikozylotransferazy obecne w płynie najądrzowym [22, 23]. Licznym zmianom ulegają reszty cukrowcowe glikoprotein tworzących plazmalemmę. Udowodniono, że lektyna orzeszków ziemnych – PNA (ang. *peanut agglutinin*), która reaguje z terminalną cząsteczką galaktozy w strukturze Gal $\beta$ 1,3GalNAc (obecnej w O-wiązanych glikoproteinach), łączy się z powierzchnią plemników wyizolowanych z głowy (ale nie z ogona) najądrza szczura [20]. Wyraźny spadek powinowactwa PNA do powierzchni plemników, w miarę ich przemieszczania w najądrzach, może być spowodowany przez maskowanie końcowej cząsteczki galaktozy, w wyniku przyłączania się do niej innych reszt cukrowcowych. Warunkowane jest to przez glikozylotransferazy obecne w wydzielinie najądrza [24] lub też poprzez odcinanie reszt galaktozy przez znajdującą się tam  $\beta$ -D-galaktozydazę [19].

$\alpha$ -D-mannozydaza jest integralnym enzymem błony komórkowej plemnika, zlokalizowanym w przedniej części główki plemnika, która uczestniczy w interakcjach gamet u szczura. Stwierdzono, że białko to pełni funkcję receptora, rozpoznając



komplementarne cząsteczki na powierzchni osłonki przejrzystej [25]. Wykazano ponadto, że aktywność tego enzymu wzrasta w miarę przemieszczania się plemników w najądrzu, czego nie można tłumaczyć jedynie wzrostem aktywności metabolicznej plemnika, ponieważ plemniki opuszczające jądro są komórkami ostatecznie zróżnicowanymi i mają bardzo ograniczone zdolności syntezy nowych produktów [21]. Udowodniono, że enzym w formie nieaktywnego prekursora syntetyzowany jest w gonadzie i ulega obróbce proteolitycznej w najądrzu (przez enzymy o aktywności trypsynopodobnej), w wyniku której pojawia się on w formie aktywnej.

Liczne zmiany w błonie komórkowej plemnika zachodzą podczas procesu kaptacji – następuje wtedy usuwanie bądź redystrybucja peryferyjnych i integralnych glikoprotein błonowych, w efekcie czego formowane są domeny powierzchniowe, biorące udział w interakcjach z receptorami plemnikowymi na komórce jajowej. Wzajemne oddziaływania receptorów indukują reakcję akrosomalną plemnika, która umożliwia jego penetrację przez osłonkę przejrzystą i zapłodnienie oocyty.

Plemniki mają ograniczoną zdolność biosyntezy, stąd główną rolę w modyfikacjach komponentów oligosacharydowych błony komórkowej, podczas dojrzewania, pełnią czynniki obecne w płynie nasiennym, a zwłaszcza obecne tam enzymy.

Jedną z funkcji reszt cukrowcowych, obecnych na powierzchni komórek plemnikowych, jest udział w gatunkospecyficznym zapłodnieniu. Ugrupowania węglowodanowe nadają powierzchni gamet męskich ładunek ujemny, dzięki czemu nie dochodzi do ich autoaglutynacji. Ponadto reszty węglowodanowe maskują autoantygeny plemników przed atakiem własnego układu immunologicznego, ponieważ jak wiadomo autoantygeny te pojawiają się późno (pokwitanie) i już po wykształceniu przez układ immunologiczny mechanizmów autotolerancji. Są zatem traktowane jako antygeny „obce”.

Glikokoniugaty obecne na powierzchni plemników (i innych komórek) są silnie immunogenne. Badania z wykorzystaniem przeciwciał immobilizujących plemniki, obecnych w surowicy krwi u nieplodnych pacjentek, pozwoliły na obserwację, że reagowały one zwłaszcza z częścią cukrowcową antygenów plemnikowych [8]. Utlenienie reszt cukrowcowych w plemnikowych ekstraktach antygenowych, przy pomocy TMFS (ang. *trifluoromethane sulphonic acid*, kwas trifluorometylosiarkowy) i nadjodanu, wywoływało prawie całkowity zanik reaktywności przeciwciał. Wykazano równocześnie, że reszty cukrowcowe, obecne na powierzchni plemników, są silnie immunogenne i indukują reakcje immunologiczne przeciwko plemnikom.

Z uwagi na strukturalne podobieństwo glikozylowanych determinant antygenowych na powierzchni różnych komórek, przeciwciała mogą wchodzić w reakcje krzyżowe z niespokrewnionymi komórkami. Dlatego poliklonalne przeciwciała, pierwotnie wyprodukowane w surowicy, w odpowiedzi na antygeny bakteryjne lub wirusowe mogą wtórnie reagować z antygenami obecnymi na plemnikach. Jeśli zaś antygeny te uczestniczą w procesie zapłodnienia, reakcje takie mogą prowadzić

do niepłodności o podłożu immunologicznym. Również produkcja przeciwciał monoklonalnych rozpoznających swoiście jeden typ komórek jest utrudniona z uwagi na występowanie glikozylowanych epitopów.

Udowodniono reakcje krzyżowe przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw plemnikom z antygenami obecnymi na powierzchni komórek somatycznych (erytrocytów) oraz różnych szczepów bakteryjnych (bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych), które były zdeterminowane obecnością podobnych reszt cukrowcowych na powierzchni komórek [9]. W cytowanej pracy, z 30 testowanych przeciwciał monoklonalnych, skierowanych przeciw antygenom plemnikowym, 26 rozpoznawało antygeny obecne na powierzchni komórek *E. coli* 08, a 25 na powierzchni *Streptococcus viridans* i *Staphylococcus aureus*. Natomiast po deglikozylacji lipopolisacharydów ściany komórkowej szczepów *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* i *E. coli*, stwierdzono pozytywne reakcje tylko w 3 badanych próbkach przeciwciał. Nasuwa to przypuszczenie, że ASA (ang. *antisperm antibodies* – przeciwciała przeciwplemnikowe) obecne u niektórych kobiet mogą reprezentować przeciwciała reagujące krzyżowo, których produkcja została zainicjowana przez infekcje bakteryjne.

Reaktywność krzyżowa monoklonalnych ASA z glikozylowanymi antygenami, obecnymi na powierzchni erytrocytów i limfocytów, została udokumentowana w innych badaniach tej samej grupy [10]. Wykazano obecność immunodominujących reszt cukrowcowych (N-acetyloglukozoaminy i N-acetylogalaktozoaminy) związanych z glikolipidową częścią błony komórkowej plemnika w indukowaniu odpowiedzi humoralnej.

### 3. PERSPEKTYWY IMMUNOANTYKONCEPCJI

Główną strategią dla opracowania szczepionki antykoncepcyjnej opartej na mieszaninie składników swoistych dla gamety męskiej jest zdefiniowanie powierzchniowych determinant autoantygenowych, które mają znaczenie funkcjonalne i zarazem są specyficzne dla tego typu komórek. Założenie specyficzności komórkowej potencjalnych antygenów jest tu kluczowe, biorąc pod uwagę niebezpieczeństwo sprowokowania odpowiedzi autoimmunologicznej.

Pomysł stosowania szczepionki immunoantykoncepcyjnej można w uproszczeniu przedstawić następująco: skutek podania mieszaniny odpowiednio dobranych i spreparowanych antygenów plemnikowych kobiecie lub mężczyźnie, następuje produkcja krążących przeciwciał lub uczulenie komórek efektorowych, które zablokują proces zapłodnienia i pozwolą na utrzymywanie się wywołanego stanu niepłodności bez żadnych skutków ubocznych. Stan też może i powinien być odwracalny [4].

W 1989 r. C. Darjassi, współwynalazca pierwszej doustnej hormonalnej pigułki antykoncepcyjnej (1951 r.) napisał: „Szczepionka antykoncepcyjna będzie najbardziej



*rewolucyjnym wynalazkiem w dziedzinie regulacji poczęć. Zmieni ona radykalnie nasze pojęcie ludzkiej płodności, jeśli młodzi mężczyźni lub/i kobiety będą mieli możliwość pozostawania niepłodnymi aż do momentu podjęcia decyzji o świadomym rodzicielstwie” [5].*

W skali globalnej istnieje duża potrzeba wynalezienia alternatywnego w stosunku do obecnie stosowanych środka zapobiegającego niepożądanym poczęciom, ponieważ ze statystyk wynika, że każdego dnia dochodzi do około miliona ciąży, z których średnio połowa jest nieplanowana [4].

Zakładając możliwość podawania szczepionki powodującej odwracalny efekt niepłodności w 1- do 3-letnich przedziałach czasowych, taki sposób antykoncepcji niósłby szereg korzyści: niski koszt, zwłaszcza w porównaniu z kosztami stosowania doustnych środków antykoncepcyjnych prawie przez cały cykl miesięczny, akceptację społeczną (zwłaszcza jeśli szczepionka taka działałaby na etapach poprzedzających zapłodnienie), łatwość stosowania (możliwość podania przy okazji innych szczepień) oraz dyskrecję (w porównaniu do np. pigułek lub implantów podskórnych).

Potencjalne substancje immunogenne, oparte na swoistych antygenach gamety męskiej, muszą być tak zlokalizowane na powierzchni plemników, aby mogły być łatwo dostępne dla przeciwciał i/lub komórek efektorowych. Do takich immunogenów należą więc integralne antygeny błonowe plemników (lub substancje pochodzące z plazmy nasienia, trwale opłaszczone na powierzchni komórek) bądź antygeny związane z wewnętrzną błoną akrosomalną, która po reakcji akrosomalnej staje się zewnętrzną błoną główki plemnika (w części przedniej).

W związku z tym, że ASA mogą być przyczyną niepłodności zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn, teoretycznie szczepionka antykoncepcyjna mogłaby być stosowana bez względu na płeć. Praktycznie jednak sugeruje się podawanie jej kobietom, ponieważ w jajowodzie koncentrację plemników wyraża się tylko w dziesiątkach lub setkach komórek, natomiast w męskich drogach rozrodczych wynosi ona  $10^8$ – $10^9$  komórek. Zatem miano przeciwciał, powodujących zablokowanie możliwości zapłodnienia przez mężczyznę, musiałoby być nieporównywalnie większe aniżeli w śluzie szyjkowym lub płynie jajowodowym.

Spośród autoantygenów, które obecnie są przedmiotem badań laboratoryjnych przeprowadzanych na zwierzętach, wytypowano: LDH-C4, PH-20, SP-10, FA-1, FA-2, CS-1, NZ-1, NZ-2. Ponadto stale prowadzi się poszukiwania nowych antygenów plemnikowych, które mają znaczenie w procesie zapłodnienia i uczestniczą w reakcjach auto- i izoimmunologicznych.

Niedawno zidentyfikowano kolejną, obecną wyłącznie w tkance ludzkiego jądra i w regionie akrosomalnym plemników (nieskapacytowanych i po kapacytacji) sekwencję polipeptydową oznaczoną jako YLP<sub>12</sub>, która być może także znajdzie zastosowanie w immunologicznej antykoncepcji [15]. Dowiedziono, że zidentyfikowany peptyd uczestniczy w interakcjach plemnik – ZP (zona pellucida). Syntetyczny polipeptyd oparty na sekwencji YLP<sub>12</sub> i skierowane przeciw niemu

fragmenty Fab' specyficznie blokowały przyłączanie ludzkich plemników do osłonki przejrzystej ludzkich oocytów. Daje to nadzieję na wykorzystanie opisywanej sekwencji nie tylko do opracowania szczepionki antykoncepcyjnej, ale również do diagnostyki i leczenia niepłodności męskiej wynikającej z dysfunkcji gamet (znalezienie markerów niepłodności immunologicznej) [15].

Przyjmuje się, że aby szczepionka mogła być zaakceptowana do powszechnego użytku, musi powodować obniżenie płodności u co najmniej 80% osobników z immunizowanej populacji [14].

Ponieważ kluczowym (i gatunkowo specyficznym) etapem procesu zapłodnienia jest przyłączenie plemnika do osłonki przejrzystej komórki jajowej, zatem antygeny biorące w nim udział są najczęściej brane pod uwagę jako kandydaci do produkcji szczepionki antykoncepcyjnej.

FA-1 jest autoantygenem plemników, który ma zdolność aktywacji receptora rozpoznającego elementy komplementarne, obecne na ZP. Sklonowano cDNA kodujący białko FA-1 i opisano jego sekwencję. Aktywna immunizacja zwierząt rekombinowanym antygenem FA-1 spowodowała długotrwały i odwracalny efekt niepłodności wskutek działania specyficznego ASA [14]. Pojawiło się także doniesienie wskazujące na możliwość zastosowania tego antygeny do leczenia ludzkiej niepłodności, ponieważ zaobserwowano zdolność antygeny FA-1 do adsorpcji ASA opłaszczonych na powierzchni plemników u osób uczulonych, a w konsekwencji poprawę zdolności zapładniającej plemników [11].

Również przeciwciała skierowane przeciw rekombinowanemu antygenowi NZ-1 i NZ-2 powodowały zablokowanie interakcji plemników z osłonką przejrzystą, a tym samym obniżały płodność poddanych tym procedurom myszy.

Szczepienia pawianów syntetycznym peptydem o sekwencji opartej na fragmencie immunodominującego epitopu dehydrogenazy mleczanowej, połączonym z toksyną błonicy przyniosły efekt w postaci obniżenia płodności tych zwierząt o 70–75%, który zanikał po roku od przeprowadzenia ostatniego szczepienia [16].

Oprócz doświadczeń z użyciem znanych autoantygenów plemnikowych oraz poszukiwań nowych immunodominujących cząsteczek, obecnych na męskich gametach, trwają również prace nad opracowaniem lepszych adjuwantów oraz innych nośników, których obecność powoduje wzrost immunogenności antygenów, np. przez zastosowanie liposomów, niejonowych polimerów (*polylactide - polyglycolide microspheres*) i atenuowanych żywych wektorów (wirus ospy krowiej/*Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus Calmette-Guerin*).

Dotychczas nie opracowano technologii, która pozwoliłaby na indukcję lokalnej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw plemnikom w męskich drogach płciowych, bez jednoczesnego spowodowania odczynu zapalnego jąder. Nie znaleziono bowiem odpowiedniego modelu zwierzęcego, w którym zostałyby wiernie odtworzone warunki panujące w układzie rozrodczym u mężczyzn. Natomiast dość dobrze poznane jest zjawisko lokalnej odpowiedzi immunologicznej przeciw ple-



mnikom w żeńskich drogach płciowych. Większość znajdujących się tam ASA produkowana jest w szyjce macicy, ponieważ w blaszce właściwej błony śluzowej (*lamina propria*) znajdują się liczne komórki plazmatyczne, produkujące głównie wydzielnicze przeciwciała klasy IgA, ale również IgG oraz IgM [17]. Komórki plazmatyczne produkujące przeciwciała IgA i IgG, obecne w sąsiedztwie gruczołów endometrium, są źródłem przeciwciał w macicy, która jest organem pozbawionym skupisk tkanki limfoidalnej [7], natomiast przeciwciała obecne w płynie jajowodowym pojawiają się w wyniku przesiekania z surowicy [18], a ich miano (w pewnej proporcji) odzwierciedla stężenie przeciwciał we krwi. Badania przeprowadzane na modelach zwierzęcych sugerują, że stężenie ASA w płynie jajowodowym u osobników, posiadających wysokie miano przeciwciał przeciwplemnikowych w surowicy, może być wystarczające dla zablokowania funkcji gamety męskiej [14].

Udowodniono, że immunizacja prowadzona wyłącznie w żeńskich drogach rozrodczych nie wystarczy do osiągnięcia wysokiego miana przeciwciał wydzielniczych [3]. Bardziej sensownym rozwiązaniem wydaje się być podawanie szczepionki doustnie i/lub drogą pozajelitową, co potwierdzają badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym, w których samice myszy uczulane antygenami plemnikowymi (podanymi doustnie) miały tylko częściowo obniżoną płodność [2], natomiast połączenie immunizacji doustnej z dopochwową doprowadzało do znacznej redukcji płodności u szczurzy [1]. Mediatorem uzyskanego efektu niepłodności były obecne w wydzielinie pochwy przeciwciała klasy IgA, których wysokość miana była proporcjonalna do długości utrzymywania okresu obniżonej płodności.

Wyniki uzyskane na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że konstruowanie szczepionki, która dawałaby efekt spadku płodności, porównywalny z doustnymi hormonalnymi środkami antykoncepcyjnymi, nie może być oparte na wykorzystaniu jednego antygeny plemników, ale raczej mieszaniny wielu autoantygenów. Obecnie trwają badania nad ich scharakteryzowaniem i potencjalną możliwością wykorzystania do tych celów. Równolegle prowadzi się prace nad opracowaniem takiej formuły szczepionki, która pozwoliłaby na spowodowanie lokalnej odpowiedzi immunologicznej w drogach płciowych, przez aktywację większości obecnych tam limfocytów B. Pozwoliłoby to na wystąpienie i oddziaływanie ASA we wszystkich odcinkach układu rozrodczego.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALLARDYCE RA. Effect of ingested sperm on fecundity in the rat. *J Exp Med* 1984; **159**: 1548–1553.
- [2] ALLARDYCE RA, RADEMAKER M. Female genital tract immunity and infertility after oral vaccination with sperm antigens in mice. *Adv Exp Med Biol* 1987; **216**: 1807–1813.

- [3] CZERKINSKY C, PRINCE SJ, MICHAŁEK SM, JACKSON S, RUSSEL MW, MOLDOVEANU Z, MGHEE JR, MESTECKY J. IgA antibody producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **138**: 1398–1402.
- [4] DIEKMAN AB, NORTON EJ, KLOTZ KL, WESTBROOK VA, HERR JC. Evidence for unique N-linked glycan associated with human infertility on sperm CD52: a candidate contraceptive vaccinogen. *Immunol Rev* 1999; **171**: 203–212.
- [5] DJERASSI C. The bitter pill. *Science* 1989; **245**: 356–361.
- [6] FUKUDA M. Cell surface carbohydrates: cell-type specific expression. [w] Fukuda M, Hindsgaul O [red.] *Molecular Glycobiology*. IRL Press, Oxford University Press, 1994: 1–43.
- [7] HEAD JR, BILLINGHAM RE. Concerning the immunology of the uterus. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1986; **10**: 76–81.
- [8] KOYAMA K, KAMEDA K, NAKAMURA N, KUBOTA K, SHIGETA M, ISOJIMA S. Recognition of carbohydrate antigen epitopes by sperm-immobilizing antibodies in sera of infertile women. *Fertil Steril* 1991; **56**: 954–959.
- [9] KURPISZ M, ALEXANDER NJ. Carbohydrate moieties on sperm surface: physiological relevance. *Fertil Steril* 1995; **63**: 158–165.
- [10] KURPISZ M, CLARK GF, MAHONY M, ANDERSON TL, ALEXANDER NJ. Mouse monoclonal antibodies against human sperm: evidence for immunodominant glycosylated antigenic sites. *Clin Exp Immunol* 1989; **78**: 250–255.
- [11] MENGE AC, OHL DA, CHRISTMAN GM, NAZ RK. Fertilization antigen-1 (FA-1) removes antisperm antibodies from sperm of infertile men resulting in increased rates of acrosome reaction. *Fertil Steril* 1999; **71**: 256–260.
- [12] MURRAY R.K. Glikoproteiny i proteoglikany. [W] Kokot F [red.] *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 750.
- [14] NAZ RK. Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol Rev* 1999; **171**: 193–202.
- [15] NAZ RK, ZHU X, KADAM AL. Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocontraception. *Biol Reprod* 2000; **62**: 318–324.
- [16] O'HERN PA, BAMBRA CS, ISAHAKIA M, GOLDBERG E. Reversible contraception in female baboons immunized with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol Reprod* 1995; **52**: 331–339.
- [17] PRICE RJ, BOETTCHER B. The presence of complement in human cervical mucus and its possible relevance to infertility in women with complement dependent sperm immobilizing antibodies. *Fertil Steril* 1979; **32**: 61–66.
- [18] SCHUMACHER GFB. Humoral immune factors in the female reproductive tract and their changes during the cycle. [W] Dhindsa DS, Schumacher GFB [red.] *Immunological aspects of infertility and fertility regulation*. New York: Elsevier/North Holland 1980: 93–142.
- [19] SKUDLAREK MD, TULSIANI DRP, ORGEBIN-CHRIST MC. Rat epididymal luminal fluid acid  $\beta$ -galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. *Biochem J* 1992; **286**: 907–914.
- [20] SRIVASTAVA A, OLSON GE. Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Mol Reprod Dev* 1991; **29**: 357–364.
- [21] TULSIANI DRP, CORNWALL GA, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CHRIST MC. Increase in sperm plasma membrane  $\alpha$ -D-mannosidase correlates with the development of sperm binding ability. [W] Baccetti B [red.] *Comparative spermatology 20 years after*. Raven Press, New York 1991: 703–707.
- [22] TULSIANI DRP, NAGDAS SK, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CHRIST MC. Rat sperm plasma membrane mannosidase: Localization and evidence for proteolytic processing during epididymal maturation. *Dev Biol* 1995; **167**: 584–595.



- [23] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ARAKI Y, ORGEBIN-CHRIST MC. Purification and characterization of two forms of  $\beta$ -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). *Biochem J* 1995; **305**: 41–50.
- [24] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, HOLLAND MK, ORGEBIN-CHRIST MC. Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biol Reprod* 1993; **48**: 417–428.
- [25] TULSIANI DRP, SKUDLAREK MD, ORGEBIN-CHRIST MC. Novel  $\alpha$ -D-mannosidase of rat sperm plasma membrane: Characterization and potential role in sperm - egg interactions. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1257–1267.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 10.06.2001 r.*

*Przyjęto: 10.07.2001 r.*

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





# GENETYCZNA REGULACJA EMBRIOGENEZY U ROŚLIN

## GENETIC REGULATION OF PLANT EMBRYOGENESIS

Agnieszka GRABOWSKA, Marcin FILIPECKI, Anna LINKIEWICZ

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie:* W ciągu ostatnich kilku lat osiągnięto zasadniczy postęp w identyfikowaniu genów związanych z procesem rozwoju zarodka. Badania te oparte były głównie na analizie mutantów zarodkowych modelowej rośliny – *Arabidopsis thaliana*. Duże znaczenie w badaniach nad genetyką rozwoju zarodka mają mutacje ujawniające się we wczesnych etapach embriogenezy, zwłaszcza takie, u których rozwój zarodka zatrzymany jest w ściśle określonym stadium. Analizy fenotypów takich mutantów pozwoliły na poznanie i zrozumienie mechanizmów genetycznej regulacji embriogenezy. Wiele genów współuczestniczących w procesie tworzenia roślinnego zarodka zostało już sklonowanych i dokładnie scharakteryzowanych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 509–527)

*Słowa kluczowe:* embriogeneza, mutanty zarodkowe, *Arabidopsis thaliana*

*Summary:* Over the past several years, substantial progress has been made toward the identification of genes involved in the embryo development. The majority of available information is coming from the analyses of embryo mutants of model plant – *Arabidopsis thaliana*. The special interest is given to the mutations in early stages of embryogenesis including those where the development is arrested in a specific stage. Analysis of such mutants enables recognition and understanding mechanisms of genetic regulation of embryogenesis. Many genes which are involved in the plant embryo formation had been cloned and precisely characterized.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 509–527)

*Key words:* embryogenesis, embryo mutants, *Arabidopsis thaliana*

## WSTĘP

W procesie embriogenezy z zapłodnionej komórki jajowej w wyniku kolejnych podziałów powstaje zarodek, z którego rozwija się osobnik dorosły. Podczas tego procesu ekspresji ulega wiele genów, jednak tak naprawdę wciąż nie wiadomo, ile z nich działa specyficznie w rozwoju zarodka. W ostatnich latach zidentyfikowano i opisano wiele genów uczestniczących w kontroli wczesnych etapów embriogenezy zygotycznej. Badania te oparte były głównie na molekularnej i genetycznej analizie mutantów zarodkowych modelowej rośliny – rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Rozwój zarodka u tej rośliny zachodzi według typu *Onagrad*, w którym praktycznie tylko z komórki apikalnej rozwija się zarodek właściwy.

Kolekcje mutantów, które są wykorzystywane w większości badań nad rozwojem zarodka, uzyskano między innymi przez mutagenезę indukowaną T-DNA i EMS. Szczególne zainteresowanie poświęca się mutantom wczesnych stadiów embriogenezy oraz takim, u których rozwój zarodka jest zatrzymany w ściśle określonym stadium. Zmiany morfologiczne spowodowane przez te mutacje można podzielić na następujące klasy:

- (1) delecja części zarodka w osi apikalno-bazalnej,
- (2) zaburzenia struktury wzoru radialnego,
- (3) zmiana morfologii zarodka, siewki.

Większość z tych mutacji ujawnia się z kolei na jednym z trzech krytycznych etapów:

- (1) pierwszy podział zygoty,
- (2) tworzenie protodermy,
- (3) przejście ze stadium globularnego do sercowatego.

Analiza tych mutantów oraz ekspresji odpowiadających im genów dostarczyła wielu cennych informacji o molekularnych mechanizmach regulacji embriogenezy. Wciąż jednak liczne geny, wpływające na morfogenезę zarodka, nie są poznane. Jednym z powodów jest bez wątpienia letalny charakter mutacji tych genów.

Celem niniejszej pracy jest omówienie podstawowych mechanizmów regulujących rozwój zarodka u *Arabidopsis* oraz przedstawienie aktualnej sytuacji w zakresie molekularnej charakterystyki genów uczestniczących w procesie embriogenezy.

## PIERWOTNA POLARYZACJA ZARODKA

Zapłodniona komórka jajowa, od której rozpoczyna się proces embriogenezy, dzieli się szereg razy według określonego planu. Powstaje kulisty prazarodek, który w wyniku kolejnych podziałów komórkowych przekształca się w zarodek spolaryzowany z wykształcającą się osią pędowo-korzeniową, zwaną też osią apikalno-bazalną. Wzdłuż tej osi, wyznaczonej przez merystemy wierzchołkowe pędu i korzenia, znajdują się podstawowe struktury budujące zarodek, później siewkę



oraz roślinę dorosłą. Struktury te tworzą w zarodku dość prosty wzór liniowy, kolejno: merystem wierzchołkowy pędu, liścienie, hypokotyl, korzeń oraz merystem korzeniowy. Wzór ten i jego struktury są wyznaczane na bardzo wczesnych etapach rozwoju zarodkowego [30].

Polarność można już zaobserwować w budowie komórki jajowej, na co może wpływać polarna struktura załączka. Taki wpływ na kształtowanie osi apikalno-bazalnej w zarodku ma miejsce jedynie w przypadku embriogenezy zygotycznej. W przypadku embriogenezy somatycznej, w której zarodki powstają z komórek innych niż zygota i nie ma bezpośredniego wpływu tkanki macierzystej, polarność może być indukowana warunkami kultury [42].

Brak lub ograniczony wpływ tkanki macierzystej na proces formowania osi zarodka stwierdzono także w warunkach naturalnych. Przykładem może tu być *Fucus*, u którego czynnikiem indukującym polarność jest światło. Jednak w tym przypadku zarówno zapłodnienie komórki jajowej, jak i dalszy rozwój zygoty odbywają się w wodzie, poza rośliną mateczną. Obserwowana u *Fucus* indukcja polarności światłem odbywa się w ciągu pierwszych dziesięciu godzin po zapłodnieniu [3, 25, 34, 58].

Niezależnie od opisanych czynników mogących wpływać na polarność zarodka, faktem jest to, że pierwszy podział zygoty u *Arabidopsis* odbywa się w komórce silnie spolaryzowanej, w której większość cytoplazmy i jądro są zlokalizowane na biegunie chalazalnym. W wyniku poprzecznego, asymetrycznego podziału mitotycznego powstają dwie komórki potomne, które różnią się wielkością oraz dalszymi losami w rozwoju zarodkowym. Komórka apikalna powstająca na biegunie chalazalnym zygoty jest mniejsza, bogata w organelle cytoplazmatyczne i to z niej, w wyniku dalszych podziałów, formuje się zarodek właściwy. Na silnie zwakuo- lizowanym biegunie mikropylarnym powstaje większa komórka bazalna, która ma mniej organelli, lecz bogatsza jest w białka i RNA. Z komórki tej w wyniku kolejnych podziałów powstaje wieszadełko oraz część merystemu korzeniowego. Do tej pory nie ustalono, co dokładnie decyduje o dalszym rozwoju komórek apikalnej i bazalnej u roślin wyższych. Badania prowadzone na innych roślinach sugerują, że zdeterminowanie dalszych losów rozwojowych tych komórek może mieć miejsce zarówno przed, jak i po podziale zygoty. Na przykład u *Fucus* zygota jest spolaryzowana przed podziałem i to determinuje dalszy rozwój komórek potomnych [34].

Pierwszym genem wykazującym zróżnicowaną komórkową ekspresję w zarodku rzodkiewnika jest *ATML1* (*Arabidopsis thaliana merystem layer 1*) [41, 68]. Gen ten ulega transkrypcji tylko w komórce apikalnej i jej potomnych. Różnice w ekspresji tego genu w określonych komórkach sugerują, że może on pełnić funkcje regulatorowe w kształtowaniu wzoru apikalno-bazalnego. Jest to hipoteza bardzo prawdopodobna zważywszy, że koduje on białko będące czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym homeodomenę [41, 68].

Przypuszcza się, że bezpośredni udział w polaryzacji zarodka *A. thaliana* bierze gen *GNOM* (*GN*), znany też jako *EMB30* [50]. Zygota mutantka *gn* dzieli się bowiem symetrycznie i powstają komórki potomne równej wielkości. Z komórki bazalnej powstaje jednak skrócone wieszadełko, a z apikalnej rozwija się zarodek właściwy. Tak więc asymetryczność podziału nie jest jedynym czynnikiem decydującym o realizacji szlaku rozwojowego komórek [50].

Sekwencja białka kodowanego przez gen *EMB30* jest bardzo podobna do sekwencji białka drożdżowego *Sec7p* [11, 69]. *Sec7p* jest z kolei glikoproteiną transportowaną z siateczki endoplazmatycznej do aparatu Golgiego [55]. Białko to odgrywa kluczową rolę we wzroście komórek drożdżowych, odpowiadając za prawidłowe podziały oraz separację komórek drożdży [69]. Podobnie jak *Sec7p*, tak i *EMB30* może wpływać na syntezę i sekrecję glikoprotein, które są niezbędne do prawidłowego wzrostu komórek. Wiele nieprawidłowości występujących u mutantka *gn* można wytłumaczyć zaburzeniami w syntezie oraz sekrecji składników budujących ściany komórkowe, co z kolei ma wpływ na prawidłowe podziały komórkowe, ekspansję komórek, kontakty między komórkami oraz stabilizację osi apikalno-bazalnej [69]. Potwierdzają to badania, które wykazały, że w kalusie, siewkach oraz liściach mutantka *gn* lokalizacja pektyn oraz innych polisacharydów budujących ściany komórkowej jest zmieniona w porównaniu z formą dziką, co być może wpływa na podziały, ekspansję oraz adhezję komórek [70].

Gen *GNOM* może być również pośrednio związany z polarnym transportem auksyny w zarodku [72]. Mutacja tego genu powoduje bowiem zaburzenia w transporcie oraz prawidłowym rozmieszczeniu produktu genu *PIN FORMED 1* (*PIN1*), który koduje transmembranowe białko niezbędne w transporcie auksyn oraz w powstawaniu prawidłowego gradientu tego hormonu [21, 72].

## FORMOWANIE APIKALNO-BAZALNEJ OSI ZARODKA

W anatomii i morfologii zarodka przyjęto terminologię analogiczną do stosowanej w odniesieniu do siewki. Na tej podstawie w rozwijającym się zarodku wyróżnia się trzy domeny: apikalną, centralną oraz bazalną. Domena apikalna składa się z merystemu wierzchołkowego pędu, liścieni oraz górnej części hypokotyla, domena centralna – z hypokotyla, natomiast domena bazalna – z korzenia oraz merystemu korzeniowego.

Domeny zarodka określa się również na podstawie płaszczyzn kolejnych podziałów komórkowych zygoty zachodzących podczas embriogenezy, wychodząc z założenia, że każda komórka ma przypisaną określoną rolę ontogenetyczną [35]. W tym schemacie już pierwszy podział zygoty wyznacza pierwszą płaszczyznę graniczną domen w rozwijającym się zarodku. Prawie wszystkie elementy budujące zarodek właściwy są pochodzenia apikalnego. Wyjątek stanowi centralna część merystemu korzeniowego oraz komórki inicjalne czapeczki, które są pochodzenia



bazalnego. Po podziale poprzecznym komórki apikalnej powstają dwie komórki, które w wyniku kolejnych podziałów dają dwie warstwy komórek, między którymi przebiega kolejna płaszczyzna graniczna. Górna warstwa komórek daje początek domenie apikalnej, na którą składają się merystem wierzchołkowy oraz liścienie w dojrzałym zarodku, natomiast dolna warstwa komórek daje początek domenie centralnej, na którą składają się nasady liścieni, hypokotyl, korzeń oraz proksymalne komórki inicjalne merystemu korzeniowego. Po podziale komórki bazalnej powstaje hypofiza (w polskojęzycznej literaturze stosowane są również terminy: hypophysis, hypofyza i wstawka) dająca początek centralnej części merystemu korzeniowego oraz komórkom inicjalnym czapeczki.

Domeny zarodka wyznaczane kolejnymi podziałami nie charakteryzują się pełną specyficznością organową siewki. Co więcej, analiza fenotypów mutantów związanych z tworzeniem osi apikalno-bazalnej zarodka dowodzi, że geny ją determinujące podlegają ekspresji w domenach ustalonych właśnie podczas podziałów komórkowych, a nie, jak wcześniej sądzono, w domenach związanych z obecnością organów zarodka. Te ostatnie jednak z powodzeniem mogą służyć do opisywania fenotypów mutacji różnych genów zaangażowanych w embriogenezę.

## PRZYKŁADY MUTANTÓW WZORU ORGANIZACJI ZARODKA NA OSI APIKALNO-BAZALNEJ

Wśród mutantów morfologicznych i anatomicznych *A. thaliana* wyróżnia się grupy mutantów charakteryzujące się delecjami lub anomaliami rozwojowymi różnych organów zarodka wzdłuż osi apikalno-bazalnej [49].

Prawidłowy rozwój domen apikalnej i centralnej jest uwarunkowany ekspresją genu *GURKE* (*GK*) [75]. Przy silnym fenotypie mutantu *gurke* (*gk*) zarodek pozbawiony jest liścieni, górna część hypokotyli jest zredukowana, a w miejsce merystemu wierzchołkowego pojawia się struktura tworząca nieuporządkowaną masę komórek. Pierwsze defekty rozwojowe u tego mutantu ujawniają się w stadium sercowatym zarodka.

Gen *FACKEL* (*FK*) jest z kolei genem wpływającym na rozwój domeny centralnej. U mutantu *fk* wybiórczej redukcji ulega hypokotyl, w efekcie czego liścienie, które mają zmieniony kształt i których jest często więcej niż dwa, wyrastają bezpośrednio z korzenia. Pierwsze anomalie rozwojowe u tego mutantu są widoczne już w stadium globularnym. Komórki budujące zarodek są powiększone, zakłóceniu ulega porządek podziałów komórkowych (podziały komórkowe zachodzą w przypadkowych płaszczyznach), a powstające ściany komórkowe są niekompletne [49, 67]. Analiza molekularna genu *FK* wykazała, że koduje on reduktazę sterolu C-14, enzym niezbędny w biosyntezie steroli i brasionosteroli – roślinnych substancji, będących cząsteczkami sygnałnymi między innymi w rozwoju embrionalnym [28, 67].

Do prawidłowego rozwoju domeny centralnej, hypofizy oraz kształtowania osi apikalno-bazalnej niezbędny jest gen *MONOPTEROS* (*MP*) [28, 56]. Pierwsze zmiany u mutantu *mp* są już widoczne w zarodku ośmiokomórkowym. Zakłócenia wzoru podziałów komórek zarodka właściwego prowadzą do powstania czterech warstw komórek – zamiast dwóch. Ponadto górna komórka wieszadełka, z której normalnie powstaje centralna część merystemu korzeniowego oraz inicjalne komórki czapeczki, dzieli się horyzontalnie. Te nieprawidłowości wzoru podziałów zachodzące zarówno w domenie centralnej, jak i w hypofizie powodują, że mutant *mp* pozbawiony jest hypokotyli, korzenia, merystemu korzeniowego, oraz są przyczyną anomalii w organizacji oraz funkcjonowaniu tkanki przewodzącej liścieni [5]. Gen *MP* koduje białko będące regulatorem transkrypcji, które prawdopodobnie jest zdolne do modyfikacji aktywności genów związanych z przekazywaniem sygnałów w szlaku biosyntezy auksyny [26].

## RÓŻNICOWANIE MERYSTEMÓW I KSZTAŁTOWANIE TKANEK

Podczas wczesnych etapów embriogenezy, rozwijający się zarodek składa się wyłącznie z komórek embrionalnych, to znaczy zdolnych do podziału, cienkościennych, bogatych w cytoplazmę i zewnętrznie do siebie podobnych. Podczas dalszych etapów rozwoju zarodka podziały komórkowe zostają ograniczone do szczytowych partii apikalnego bieguna – merystemu wierzchołkowego pędu oraz bazalnego bieguna korzenia – merystemu korzeniowego.

### MERYSTEM WIERZCHOŁKOWY PĘDU

Merystem wierzchołkowy pędu daje początek wszystkim nadziemnym częściom rośliny. U *A. thaliana* powstaje on z tej samej warstwy komórek co liścienie. Najpierw jednak pojawiają się primordia liścieniowe, które widoczne są w stadium późnoglobularnym zarodka, a potem następuje inicjacja merystemu wierzchołkowego pędu, która trwa do stadium torpedy [2, 47]. Zidentyfikowano i poznano czasowo-przestrzenny wzór ekspresji licznych genów współuczestniczących w inicjacji i formowaniu tego merystemu [8].

Do inicjacji oraz prawidłowego wykształcenia merystemu wierzchołkowego pędu niezbędny jest gen *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*) [19, 38]. Mutant *stm* charakteryzuje się brakiem merystemu, co jest spowodowane zaburzeniami podziałów komórek w warstwach, z których normalnie powstaje tunika i korpus. Liścienie oraz pozostałe organy zarodka *stm* rozwijają się normalnie [19]. Sekwencja genu *STM* wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji genów klasy *KNOTTED* (*KNO*), których produkty białkowe zawierają homeodomenę, i pełnią rolę regulatorów trans-



krypcji [59]. Aida i współpracownicy [1] badali interakcje między genem *STM* a innym genem współodpowiedzialnym za formowanie merystemu wierzchołkowego pędu – *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)*. Okazało się, że ekspresja *CUC* jest niezbędna dla prawidłowej ekspresji *STM*, a tym samym do formowania merystemu wierzchołkowego pędu. Nie jest jednak wyjaśnione, w jaki sposób produkt *CUC* aktywuje *STM*. Możliwe, że białko *CUC*, które zawiera domenę *NAC*, bezpośrednio aktywuje transkrypcję *STM* [1]. Ostatnie badania dowodzą, że funkcjonalnie gen *CUC* spełnia nadrzędną rolę w stosunku do *STM* [73].

Kolejnymi genami uczestniczącymi w formowaniu merystemu wierzchołkowego pędu, a zarazem działającymi niezależnie od *STM* są geny: *WUSCHEL (WUS)* oraz *CLAVATA (CLV) 1, 2, 3* [16, 51]. Gen *WUS* odgrywa ważną rolę w inicjowaniu podziałów komórek w merystemie wierzchołkowym pędu, natomiast geny *CLV 1, 2, 3* biorą udział w inicjacji organów [66]. Produkt genu *WUS* jest czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym homeodomenę [20]. Geny *CLV1* i *CLV2* kodują kinazy receptorowe będące składnikami systemu przekazywania sygnałów [29], natomiast *CLV3* koduje białko o charakterze ligandu, które działa w kompleksie białek kodowanych przez *CLV1* i *CLV2* [76]. Po szczegółowej analizie genu *WUS* i genów *CLV* okazało się, że *WUS* jest negatywnie regulowany przez kompleks białek *CLV* [9, 66]. Zaobserwowano, że podwójny mutant *wus/clv* ma taki sam fenotyp jak mutant *wus*, co sugeruje, że gen *WUS* jest wymagany dla prawidłowego fenotypu *clv*. Co więcej obszar ekspresji genu *WUS* został nieznacznie powiększony u mutantu *clv* w stosunku do fenotypu dzikiego, co wskazuje, że kompleks białek *CLV* może działać przez represję genu *WUS* [9, 66]. Kolejnymi genami odpowiedzialnymi za komórkową oraz funkcjonalną organizację merystemu wierzchołkowego pędu są: *FASCIATA1 (FAS1)* i *FASCIATA2 (FAS2)*. U mutantów *fas* w przeciwieństwie do mutantów *clv* zaobserwowano ograniczoną ekspresję genu *WUS*. Produkty genów *FAS1* i *2* będące czynnikami transkrypcyjnymi mogą zatem odgrywać krytyczną rolę w organizacji wierzchołkowego merystemu pędu poprzez regulację genów niezbędnych w formowaniu merystemu [31].

Long i Barton [39] przedstawili kolejny model współdziałania oraz zależności pomiędzy trzema innymi genami związanymi między innymi z powstawaniem merystemu wierzchołkowego pędu: *AINTEGUMENTA (ANT)*, *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)* oraz *CLAVATA1 (CLV1)* a genem *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*. Autorzy dokonali analizy wzorów ekspresji wymienionych genów u fenotypu dzikiego zarodków *Arabidopsis* oraz w zarodkach mutantu *stm*. W przypadku genu *STM* ekspresja inicjowana była w stadium późnoglobularnym zarodka i początkowo dotyczyła jednej lub dwóch komórek, później obserwowana była w rejonie, w którym wykształca się merystem wierzchołkowy pędu, między liścieniami. W rejonie tym wyróżnia się dwie części: centralną (ECR ang. *embryogenic central region*) i peryferyczną (EPR ang. *embryogenic peripheral region*) i to właśnie w części centralnej gen *STM* ulegał ekspresji. Kolejnym badanym genem był gen *UFO*,

który uczestniczy w kształtowaniu merystemu kwiatowego i wierzchołkowego pędu, a białko kodowane przez ten gen zawiera motyw F-box i pełni funkcje regulatorowe [36, 60]. W fenotypie dzikim ekspresja *UFO* następowała poczynając od stadium wczesnosercowatego zarodka i częściowo pokrywała się z ekspresją genu *STM*, z tą tylko różnicą, że nie obejmowała EPR oraz warstwy L1. Badając ekspresję genu *UFO* w zarodkach mutantu *stm* wykazano, że istnieje bezpośrednie współdziałanie obu badanych genów. Jeżeli chodzi o wspomniany już wcześniej gen *CLVI*, to wyniki badań wskazują na regulację jego ekspresji przez *STM*. Transkrypt genu *CLVI* wykrywano od stadium wczesnosercowatego i podobnie jak w przypadku genu *UFO* jego obecność pokrywała się ze wzorem ekspresji genu *STM*, czyli również z wyjątkiem obszaru EPR oraz warstwy L1. Taki wzór ekspresji zaobserwowano zarówno w zarodkach o fenotypie dzikim, jak i w zarodkach mutantu *stm*, z tą różnicą, że w zarodkach mutantu ekspresja była nieznacznie obniżona. Kolejnym badanym genem był gen *ANT*, który jest regulatorem transkrypcji o wysokim podobieństwie do *APETALA2* [18]. Ekspresja *ANT* inicjowana jest w stadium 32-komórkowym zarodka i początkowo jest ograniczona zaledwie do kilku komórek. Potem od stadium globularnego wzór ekspresji występował w postaci pierścienia pokrywającego się z miejscem tworzenia liścieni oraz częściowo pokrywał się z ekspresją genu *STM*, obejmując region EPR. Pomimo że wzór ekspresji *STM* i *ANT* częściowo pokrywają się, to nie zaobserwowano jednak żadnych bezpośrednich powiązań między nimi, jak w przypadku *UFO* i *STM*.

## MERYSTEM KORZENIOWY I POPRZECZNY WZÓR ORGANIZACJI TKANKOWEJ

U rzodkiewnika pierwotny merystem korzeniowy składa się z dwóch warstw komórkowych, otaczających „strefę spoczynkową” (ang. *quiescent centre*). Zarówno „strefa spoczynkowa”, jak i komórki inicjalne czapeczki wywodzą się z hypofizy. Górna warstwa proksymalnych komórek inicjalnych merystemu korzeniowego, która daje początek wszystkim tkankom korzenia, jest pochodzenia apikalnego. Wzór poprzecznej organizacji korzenia, czyli koncentryczne, warstwowe rozmieszczenie tkanek, jest stosunkowo prosty. Można wyróżnić następujące tkanki: epidermę, korę pierwotną, endodermę, perycykl oraz tkankę przewodzącą [17].

Jak wcześniej wspomniano, pierwsza płaszczyzna podziałowa, wyróżniająca domeny w zarodku przecina merystem korzeniowy na część apikalną i hypofizalną. Na podstawie tego podziału można wyróżnić mutanty hypofizalne, u których zaburzony jest rozwój merystemu korzeniowego. Jednym z nich jest mutant *hobbit* (*hbt*), u którego pierwsze zmiany są widoczne już podczas wczesnych etapów embriogenezy i dotyczą nieprawidłowych podziałów hypofizy, co prowadzi do pozabawienia siewki funkcjonalnego merystemu korzeniowego oraz czapeczki.



Wszystkie pozostałe elementy siewki rozwijają się normalnie, w tym proksymalne komórki inicjalne merystemu korzeniowego pochodzenia apikalnego [63, 82].

U innych mutantów z zaburzonym rozwojem korzenia: *root meristemless (rml)* [12] i *stump (stp)* [6] merystem korzeniowy rozwija się w zarodku normalnie i dopiero w siewce zostaje zahamowany jego wzrost. Istnieją zatem różne poziomy regulacji aktywności merystemu korzeniowego w rozwoju embrionalnym i postembrionalnym [35].

Koncentryczne ułożenie tkanek w korzeniu jest związane z aktywnością komórek inicjalnych, które dzieląc się dają komórki pochodne, te z kolei różnicują się w określone elementy tkanek. Próbowano określić, czy sam merystem determinuje powstawanie koncentrycznego wzoru tkanek. Wyniki badań dowodzą jednak, że sam merystem korzeniowy nie zawiera wewnętrznej informacji determinującej tworzenie odpowiednich tkanek, natomiast wykształcone już tkanki korzenia determinują powstawanie odpowiedniego wzoru tkankowego z merystemu korzeniowego [62]. Dowodzą tego doświadczenia polegające na usuwaniu komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy w korzeniu siewki *A. thaliana*, po których to zabiegach komórki perycyklu przejmowały ich funkcje. Stwierdzono ponadto, że po usunięciu zróżnicowanych już komórek kory pierwotnej i endodermy wzór tkankowej organizacji korzenia nie był odtwarzany. Komórki inicjalne kory pierwotnej i endodermy nie dzieliły się, kiedy nie miały kontaktu z komórkami już wykształconymi. Sugeruje to, że w korzeniu komórki inicjalne otrzymują informację o wzorze tkanek z wykształconych już komórek [78, 79]. Również podczas tworzenia korzeni bocznych u *A. thaliana* najpierw następuje organizowanie się tkanek, a dopiero potem powstaje aktywny merystem korzeniowy [46].

## USTALENIE WZORU POPRZECZNEGO W DOMENIE CENTRALNEJ

Koncentryczne rozmieszczenie tkanek w domenie centralnej rozpoczyna się stosunkowo wcześnie. Już w stadium szesnastokomórkowym zarodka rozpoczynają się podziały peryklinalne dające początek protodermie, która stanowi prekursor epidermy. Na przykładzie *A. thaliana* można stwierdzić, że przestrzenna organizacja pozostałych tkanek rozpoczyna się od stadium globularnego zarodka [22].

Chociaż protoderma formuje się zarówno w domenie apikalnej, jak i centralnej zarodka, to dalszy rozwój wzoru poprzecznego ogranicza się tylko do domeny centralnej. Podziały peryklinalne zachodzące w komórkach położonych pod warstwą protodermy prowadzą do powstawania wszystkich tkanek wewnętrznych. Podczas pierwszych podziałów powstaje warstwa komórek mięksiszowych, które otaczają centralne primordium waskularne, które w wyniku kolejnych podziałów daje początek perycyklowi oraz tkankom przewodzącym. W stadium torpedy z warstwy mięksiszu

zarodka różnicuje się endoderma oraz kora pierwotna. Formowanie kory pierwotnej i endodermy w korzeniu rzodkiewnika wymaga dwóch asymetrycznych podziałów komórkowych. Pierwszy podział komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy to podział antyklinalny dający początek dwóm komórkom siostrzanym z różnym potencjałem rozwojowym. Jedna kontynuuje funkcje komórki inicjalnej, druga natomiast dzieli się peryklinalnie generując w ten sposób komórki budujące endoderme i korę pierwotną [64].

U wielu mutantów zarodkowych *A. thaliana* zaburzony jest rozwój określonych tkanek, co z kolei prowadzi do zmian wzoru poprzecznego tkankowej organizacji organów rośliny. Zmiany te dotyczą najczęściej hypokotyla i korzenia. Sugeruje to, że w obu tych organach w kształtowaniu poszczególnych tkanek współdziałają te same grupy genów [64]. U większości mutantów tego typu powstałe zmiany są spowodowane nieprawidłowymi podziałami komórkowymi zachodzącymi w poszczególnych warstwach. Prowadzi to do redukcji liczby oraz typów powstających komórek. Przykładem takich mutantów są: *short root (shr)* i *scarecrow (scr)*, u których nastąpiła utrata warstw komórkowych między epidermą a perycyklem [61]. U obu tych mutantów występują antyklinalne podziały komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy, ale późniejsze podziały peryklinalne, prowadzące u roślin typu dzikiego do zwiększenia liczby warstw komórkowych, nie zachodzą. W efekcie u mutantu *shr* brak jest warstwy endodermy, a u *scr* – endodermy i kory pierwotnej [4, 15, 46, 61, 64]. Mutacja innego genu *WOODEN LEG (WOL)* powoduje zaburzenia w rozwoju tkanki przewodzącej. W korzeniu rzodkiewnika ksylem formuje się jako pierwszy, potem w wyniku asymetrycznych podziałów formuje się floem i prokambium. U mutantu *wol*, u którego jest zredukowana liczba komórek przewodzących, wykształca się tylko ksylem [61].

Okazało się, że brak niektórych tkanek we wzorze poprzecznym często nie jest spowodowany brakiem informacji niezbędnej do specyfikacji komórek, ale niedostateczną liczbą komórek, z których mogłyby powstawać poszczególne tkanki [61]. Pewne światło na to zagadnienie rzuciły doświadczenia przeprowadzone na podwójnych mutantach zarodkowych, do otrzymania których wykorzystano mutantu *fass (fs)* charakteryzującego się zwiększoną liczbą warstw komórkowych [74] oraz mutanty *scr*, *shr* i *wol* pozbawione poszczególnych tkanek. Analiza fenotypów podwójnych mutantów wykazała, że w przypadku *scr/fass* i *wol/fass* defekty były znoszone, to znaczy powstawały odpowiednio endoderma i kora pierwotna w przypadku mutantu *scr* oraz floem w przypadku mutantu *wol*. Uzyskane wyniki sugerują, że zarówno gen *SCR*, jak i *WOL* nie odpowiadają za specyfikację komórek, a jedynie za prawidłowe podziały komórkowe. Fenotyp mutantu *shr* nie był znoszony przez mutację *fass*, co z kolei sugeruje, że gen *SHR* może specyficznie determinować rozwój endodermy [61].

Formowanie wzoru poprzecznej organizacji tkanek w zarodku może być indukowane więc przez co najmniej dwie klasy genów. Pierwsza obejmuje geny,



które są bezpośrednio związane z determinacją komórek, na przykład gen *SHR*. Do drugiej należą geny determinujące rozwój poszczególnych tkanek pośrednio, na przykład przez podziały komórkowe (*SCR*, *WOL*) [62]. Analizy molekularne tych trzech genów wykazały, że pełnią one funkcje regulatorowe. Gen *SCR* jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny genów GRAS i zawiera pięć charakterystycznych motywów: LHR I, VHIID, LHR II, PFYRE i SAW. Pierwsze trzy motywy odpowiadają za wiązanie DNA: LHR I i LHR II pośredniczą w interakcjach biało – białko, a VHIID w interakcjach białko – DNA. Funkcja dwóch pozostałych motywów nie jest poznana do tej pory [37, 57]. Produkt genu *SHR* jest również czynnikiem transkrypcyjnym i wykazuje dużą homologię do *SCR*. Po szczegółowej analizie ekspresji tych dwóch genów okazało się, że *SHR* spełnia funkcję nadrzędną w stosunku do *SCR* [27]. Gen *WOL* natomiast koduje białko, które odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów związanych z asymetrycznymi podziałami zachodzącymi w komórkach inicjalnych tkanki przewodzącej [44].

## MECHANIZMY RÓŻNICOWANIA SIĘ KOMÓREK

Poznanie mechanizmów prowadzących do różnicowania się komórek jest niezbędne dla całościowego zrozumienia zjawisk zachodzących podczas rozwoju zarodka. Różnicowanie komórek obejmuje wiele powiązanych ze sobą procesów natury chemicznej, fizjologicznej i morfologicznej, prowadzących do specjalizacji komórek. Podczas różnicowania się tkanek dochodzi do zmian właściwości poszczególnych komórek oraz ich interakcji. Interesującą kwestią jest sposób determinacji poszczególnych komórek: skąd komórki budujące tkanki znają swoje przeznaczenie?

Początkowo sądzono, że czynniki determinujące los komórek mogą występować już w zygocie, a dokładniej mówiąc w ścianie komórkowej zygoty i są przekazywane do wszystkich komórek potomnych. Hipotezę tę początkowo zaproponowano dla wyjaśnienia determinacji komórek protodermy u *Citrus jambhiri* [10]. Zygota u tego gatunku pokryta jest cienką warstwą kutikuli, która stanowi marker morfologiczny dla powstającej warstwy komórek protodermy. Protoderma powstawała tylko z tych komórek potomnych zygoty, które posiadały warstwę kutikuli stanowiącej w tym przypadku rodzaj informacji pozycyjnej od zygoty.

Obserwując różnicowanie się protodermy w zarodku rzodkiewnika można przypuszczać, że istotne znaczenie ma tutaj pierwszy podział w płaszczyźnie peryklinarnej oddzielający zewnętrzną warstwę komórek. Badania nad mutantem *fass A. thaliana* nie potwierdzają tego przypuszczenia. W zarodkach *fs*, pomimo nieregularnych płaszczyzn podziałów komórek, występują prawidłowo wykształcone wszystkie tkanki, w tym również protoderma [74].

Drugą hipotezą wyjaśniającą przebieg i regulację determinacji komórek jest działanie morfogenów specyficznych substancji, które docierałyby do zarodka z wie-

szadelka i bielma. Przypuszcza się, że stężenie morfogenów może odgrywać zasadniczą rolę w procesach różnicowania się komórek, tak jak ma to miejsce u zwierząt [23]. U *A. thaliana* wykazano obecność mRNA genu *ATML1*, który jest pierwszym markerem polarnośći w zarodku, nie tylko w protodermie zarodka, ale również w wykształconym bielmie. Sugerować by to mogło, że ekspresja tego genu w protodermie jest związana z działaniem specyficznych substancji docierających do zarodka z bielma [41]. Jest to kwestia szeroko dyskutowana, chociaż brak jest bezpośrednich dowodów, że substancje takie mogą decydować o rozwoju komórek w zarodku [35].

Kolejny proponowany mechanizm determinacji komórek jest związany z komunikacją międzykomórkową. We wszystkich procesach morfogenetycznych istotną rolę odgrywają czynniki wzrostowe – hormony. U roślin podobnie jak u zwierząt hormony nie powstają we wszystkich komórkach, ale są syntetyzowane w określonych ośrodkach, z których są rozprowadzane do sąsiednich komórek, tkanek i organów. Nie ulega wątpliwości, że podczas powstawania ośrodków syntezy substancji wzrostowych oraz ich transportu do różnych części roślin powstają zależności wywierające wpływ na całość zjawisk rozwojowych. Różna wrażliwość komórek oraz zawiązków organów na substancje wzrostowe jest traktowana jako wynik różnicowania się komórek. Obecność substancji wzrostowych nie musi jednak mieć bezpośredniego morfogenetycznego działania, lecz wystarczy, że pobudza lub hamuje wzrost komórek i ich podziały [7].

Bezpośredni wpływ auksyny na różnicowanie się komórek zaobserwowano u sosny [77]. Badania te dotyczyły wpływu stężenia endogennej auksyny IAA na podziały komórkowe oraz różnicowanie się komórek kambium. Uzyskane wyniki sugerują, że IAA może działać jak pozycyjny morfogen, który reguluje różnicowanie się oraz wzrost kambium. Jednak brak jest innych bezpośrednich dowodów na udział hormonów w specyfikacji komórek w roślinie [77].

Uważa się jednak, że istotniejszą rolę w różnicowaniu się komórek odgrywają miejscowe interakcje sąsiadujących ze sobą komórek oraz tzw. substancje krótkodystansowe [35]. Zidentyfikowano wiele substancji, które mogą być potencjalnymi czynnikami wpływającymi na rozwój oraz różnicowanie się komórek roślinnych. Przykładem takiej substancji, która wpływa na rozwój zarodków somatycznych marchwi, jest endochitynaza EP3. To zewnątrzkomórkowe białko zidentyfikowano w kulturze zawieszinowej marchwi u linii termowrażliwej *ts11*. Rozwój zarodków tej linii był hamowany w podwyższonej temperaturze w stadium globularnym, jednak po dodaniu białka EP3 do hodowli mutanta zarodki były zdolne do dalszego rozwoju [14, 15, 32]. Mechanizm działania EP3 w kulturze zawieszinowej marchwi nie jest jednak do końca wyjaśniony. Jedną z proponowanych hipotez zakłada, że obecność EP3 w kulturze może stymulować syntezę specyficznych substancji, które bezpośrednio wpływają na rozwój zarodków somatycznych [13, 14]. Okazało się jednak, że endochitynaza EP3 nie jest substancją specyficzną dla embriogenezy somatycznej.



Białko to zlokalizowano również w kulturze nieembriogenicznej marchwi, endospermie oraz integumentach zalążka. Wyniki te sugerują, że EP3 może odgrywać szerszą rolę w procesach rozwojowych [80].

Inne substancje, które mogą być związane z kontrolą wzrostu oraz różnicowaniem się komórek w trakcie embriogenezy u roślin wyższych, to zewnątrzkomórkowe białka arabinogalaktany (AGPs). Ustalono, że w kulturze zawieszinowej marchwi odgrywają one zasadniczą rolę w procesie somatycznej embriogenezy, potrafią przywracać oraz zwiększać potencjał embriogeniczny kultur zawieszinowych [48, 54, 83]. Obecność AGPs na membranach, w ścianach i w przestrzeniach międzykomórkowych wskazuje, że białka te odgrywają ważną rolę w komunikacji między komórkami [45]. Jeden z proponowanych mechanizmów działania AGPs dotyczy zmian zachodzących w ścianach komórkowych. Zmiany te polegają na modyfikacji składu chemicznego oraz struktury przestrzennej ścian komórkowych i są spowodowane transportem białek arabinogalaktanowych między sąsiednimi komórkami. Różny skład chemiczny oraz zróżnicowanie struktury ścian komórkowych mogą mieć zasadnicze znaczenie w różnicowaniu się komórek [33]. Inny proponowany mechanizm działania AGPs zakłada wykorzystanie białek arabinogalaktanowych jako źródeł uwalniania oligosacharydów, które mogą pełnić funkcję molekularnych sygnałów. Typ przekazywanego sygnału uzależniony nie tylko od rodzaju białek arabinogalaktanowych, ale również od enzymów znajdujących się w ścianach komórkowych uczestniczących w syntezie oligosacharydów oraz receptorów znajdujących się w błonach komórkowych odbierających sygnały [33].

## KOMPETENCJA DO PODJĘCIA EMBRIOGENEZY

Embriogeneza jest to proces, w którym zarodek rozwija się zazwyczaj z jednej komórki, która dzieli się i różnicuje według ściśle określonego planu. W roślinie rozwijającej się *in vivo* generalnie tylko zygota jest kompetentna do tego, żeby w wyniku podziałów utworzyć zarodek. W warunkach kultur *in vitro* embriogeniczność wyzwalana jest w komórkach innych niż zygota i to dzięki temu są one „prekursorami” zarodka. Wiadomo, że istnieją różnice w kompetencji do embriogenezy zygoty i komórek somatycznych oraz mikrospor. Ostatnie badania przynoszą wiele informacji na temat genetycznych czynników decydujących o zdolności zygot i komórek somatycznych do podjęcia realizacji programu rozwoju zarodkowego.

Techniki kultur tkankowych umożliwiły aseksualne rozmnażanie roślin drogą somatycznej embriogenezy oraz embriogenezy z mikrospor. Wymienione procesy wymagają jednak istotnej zmiany programu rozwojowego komórek w celu nabycia kompetencji czy też potencjału embriogenicznego. Identyfikacja czynników genetycznych warunkujących ten etap rozwoju jest bardzo trudna. W zawieszinach komórkowych marchwi udało się jednak wykryć marker molekularny kompetencji komórek do przekształcenia się z masy proembriogenicznej w zarodki somatyczne.

Markerem tym jest produkt genu *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*), który ulega ekspresji już w komórkach proembriogennych zawieszony, natomiast brak go w wyselekcjonowanych liniach niezdolnych do embriogenezy. Ekspresja *SERK* zanika w stadium globularnym zarodka. Wagi temu odkryciu dodaje fakt, że białko *SERK* jest kinazą receptorową mogącą brać udział w przekazywaniu sygnałów i uruchamianiu całej kaskady procesów prowadzących do embriogenezy [65].

Kluczowego dla poznania inicjalnej fazy embriogenezy odkrycia dokonano dość niespodziewanie, badając u rzodkiewnika mutację *leafy cotyledon 1* (*lec1*). Gen *LEC1* ma działanie plejotropowe i wpływa na morfologię liścieni u siewki, rozwój wieszadelka i fazę dojrzewania zarodka. Nadekspresja genu *LEC1* powodowała sporadyczne pojawianie się zarodków somatycznych na liściach roślin. Produkt genu *LEC1* jest regulatorem transkrypcji wiążącym się z CCAAT-box i prawdopodobnie bierze udział w indukowaniu zarodkowego szlaku rozwojowego. Wskazuje na to częściowa utrata zarodkowego charakteru przez liścienie i wieszadelko u mutantu *lec1* [40]. Zmiany w potencjale embriogennym, niezależne od hormonów, zaobserwowano również u mutantu rzodkiewnika *pickle* (*pkl*). Gen *PKL* koduje białko CHD3, które wpływa na strukturalną organizację chromatyny, a tym samym reguluje transkrypcję. Funkcja genu *PKL* polega przypuszczalnie na supresji potencjału embriogennego poprzez represję transkrypcji genu *LEC1* [52, 53].

Zarodki niezgotyczne mogą powstać również w wyniku apomiksji. Apomiksja jest procesem, w którym uruchomienie programu embriogenezy następuje przedwcześnie, co prowadzi do rozwoju diploidalnego zarodka z niezredukowanej komórki macierzystej lub z diploidalnej komórki ośrodka. Zjawisko to z powodzeniem wykorzystano jako system modelowy identyfikując mutanty rzodkiewnika *fertilization independent endosperm* (*fie*) oraz *fertilization independent seed 1* i *2* (*fis1* i *2* i *3*). Geny *FIS* i *FIE* należą do grupy genów *Polycomb*, które związane są z rozwojem zarodka między innymi u *Drosophila* [71]. Białka *FIS1* i *FIE* zawierają domenę SET (*Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, Trithorax*) i mogą odgrywać rolę w kontroli dostępu regulatorów transkrypcji do genów poprzez przebudowę chromatyny. *FIS2* zawiera również motyw palców cynkowych, domenę charakterystyczną dla wielu regulatorów transkrypcji [43]. Wymienione geny biorą prawdopodobnie udział w mechanizmie represji genów związanych z rozwojem zarodka w podobny sposób, jak ma to miejsce u *Drosophila*. Badania mutantów *fie* i *fis1*, *2*, *3* oraz izolacja genów *FIE* i *FIS* wykazały funkcjonowanie mechanizmu represji genów decydujących o rozwoju zarodka, zanim dojdzie do zapłodnienia [24]. Czynniki warunkujące uruchomienie bądź zahamowanie programu embriogenicznego wydają się być raczej związane z organizmem matczym. Regulatorową rolę komponentu ojcowskiego we wczesnej embriogenezie umniejszają dowody na wyciszenie wielu alleli ojcowskich w okresie pierwszych kilkudziesięciu godzin po



zapłodnieniu [81]. Autorzy przypuszczają, że zjawisko to może dotyczyć nawet całego genomu ojcowskiego, przynajmniej w początkowej fazie embriogenezy.

## PODSUMOWANIE

Źródłem wielu informacji na temat podstawowych mechanizmów regulujących rozwój zarodka oraz genów związanych z procesem embriogenezy są badania prowadzone na mutantach zarodkowych. Porównywanie zmutowanych form z ich formami „dzikimi” stało się dogodnym narzędziem do identyfikacji genów zaangażowanych w proces embriogenezy. Wspomniane w niniejszej pracy geny decydujące o kluczowych etapach rozwoju zarodka można podzielić na różne klasy w zależności od ich działania. Wiele z nich to geny związane z regulacją transkrypcji (*ATML1*, *STM*, *ANT*), przekazywaniem sygnałów (*SERK*, *UFO*), transportem auksyn (*PIN*), syntezą oraz sekrecją glikoprotein (*GN*). Należy pamiętać, że często dopiero współdziałanie produktów wielu genów daje właściwy efekt, a nie tylko specyficzne działanie jednego białka.

W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp, jeżeli chodzi o identyfikację oraz charakterystykę genów związanych z kontrolą wczesnych etapów rozwoju zarodka. Jednak do chwili obecnej brak jest całościowego obrazu genetycznej regulacji przebiegu embriogenezy na poziomie molekularnym. Zsekwencjonowanie genomu *Arabidopsis thaliana* umożliwi uzupełnienie brakującej wiedzy na temat organizacji oraz funkcji poszczególnych genów. Z kolei analiza porównawcza genów wykazujących podobne funkcje u różnych organizmów umożliwi szczegółowe poznanie mechanizmów regulujących przebieg embriogenezy nie tylko u organizmów modelowych.

## LITERATURA

- [1] AIDA M, ISHIDA T, TASAKA M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 1999; **126**: 1563–1570.
- [2] BARTON MK, POETHING RS. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* 1993; **119**: 823–831.
- [3] BELANGER KD, QUATRANO RS. Polarity: the role of localized secretion. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 67–72.
- [4] BENFEY PN, LINSTED PJ, ROBERTS K, SCHIEFELBEIN JW, HAUSER MT, AESCHBACHER RA. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 1993; **119**: 57–70.
- [5] BERLETH T, JÜRGENS G. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 1993; **118**: 575–587.
- [6] BERLETH T, HARDTKE CS, PRZEMECK GKH, MÜLLER J. Mutational analysis of root initiation in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Soil* 1996; **187**: 1–9.

- [7] BERLETH T, SACHS T. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 57–62.
- [8] BOWMAN JL, ESHED II. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* 2000; **5**: 110–115.
- [9] BRAND U, FLETCHER J, HOBE M, MEYEROWITZ EM. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 2000; **289**: 617–619.
- [10] BRUCK DK, WALKER DB. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. *Bot Gaz* 1985; **146**: 188–195.
- [11] BUSCH M., MAYER U, JÜRGENS G. Molecular analysis of the *Arabidopsis* pattern formation gene *GNOM*: gene structure and intragenic complementation. *Mol Gen Genet* 1996; **250**: 681–691.
- [12] CHENG JC, SEELEY KA, SUNG ZR. *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 1995; **107**: 365–376.
- [13] DE JONG AJ, CORDEWENER J, LO SCHIAVO F, TERZI M, VANDEKERCKHOVE J, VAN KAMMEN A, DE VRIES S.C. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 1992; **4**: 425–433.
- [14] DE JONG AJ, HEIDSTARA R, SPAINK HP, HARTOG MV, MEIJER EA, HENDRIKS T, SCHAIVOF L, TERZI M, BISSELING T, VAN KAMMEN A, DE VRIES SC. *Rhizobium* lipopolisaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* 1993; **5**: 615–620.
- [15] DI LAURENZIO L, WYSOCKA-DILLER J, MALAMY JE, PYSH L, HELARIUTTA Y, FRESHOUR G, HAHN MG, FELDMANN KA, BENFEY PN. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 1996; **86**: 423–433.
- [16] DOERNER P. Plant stem cells: The only constant thing is change. *Curr Biol* 2000; **10**: R826–R829.
- [17] DOLAN L, JANMAAT K, WILLEMSSEN V, LINSTREAD P, POETHING S, ROBERTS K, SCHERES B. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 1993; **119**: 71–84.
- [18] ELLIOTT RC, BETZNER AS, HUTTNER E, OAKES MP, TUCKER WQ, GERENTES D, PEREZ P, SMYTH DR. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell* 1996; **8**: 155–168.
- [19] ENDRIZZI K, MOUSSIAN B, HAECKER A, LEVIN J, LAUX T. The *SHOOT MERISTEM-LESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cell in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J* 1996; **10**: 967–979.
- [20] FLETCHER JC, MEYEROWITZ EM. Cell signalling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 23–30.
- [21] GÄLWEILER L, GUAN C, MÜLER A, WISMAN E, MENDGEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; **282**: 2226–2230.
- [22] GOLDBERG RB, DE PAIVA G, YADEGRI R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 1994; **266**: 605–614.
- [23] GREEN JB, SMITH JC. Graded changes in dose of a *Xenopus* activin A homologue elicit stepwise transition in embryonic cell fate. *Nature* 1990; **347**: 391–394.
- [24] GROSSNIKLAUS U, SPILLANE CH, PAGE DR, KÖHLER C. Genomic imprinting and seed development: endosperm with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 21–27.
- [25] HABLE WE, KROPF DL. Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes. *Development* 2000; **127**: 493–501.
- [26] HARDTKE CS, BERLETH T. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J* 1998; **17**: 1405–1411.



- [27] HELARIUTTA Y, FUKAKI H, WYSOCKA-DILLER J, NAKAJIMA K, JUNG J, SENA G, HAUSER, BENFEY PN. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signalling. *Cell* 2000; **101**: 555–567.
- [28] JANG JC, FUJIOKA S, TASAKA M, SETO H, TAKATSUTO S, ISHII A, AIDA M, YOSHIDA S, SHEEN J. A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 2000; **14**: 1485–1497.
- [29] JEONG S, TROTOCHAUD A, CLARK S. The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* 1999; **11**: 1925–1934.
- [30] JÜRGENS G. Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* 1995; **81**: 467–470.
- [31] KAYA H, SHIBAHARA KI, TAOKA KI, IWABUCHI M, STILLMAN B, ARAKI T. *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 2001; **104**: 131–142.
- [32] KRAGH KM, DE JONG AJ, HENDRIKS T, BUCHERNA N HØJRUP P, MIKKELSEN JD, DE VRIES SC. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant ts11. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 631–645.
- [33] KREUGER M, VAN HOLST GJ. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1077–1086.
- [34] KROPF DL. Induction of polarity in fucoid zygotes. *Plant Cell* 1997; **9**: 1011–1020.
- [35] LAUX T, JÜRGENS G. Embryogenesis: A new start in life. *Plant Cell* 1997; **9**: 989–1000.
- [36] LEVIN JZ, FLETCHER JC, CHEN X, MEYEROWITZ EM. A genetic screen for modifiers of *UFO* meristem activity identifies three novel *FUSED FLORAL ORGANS* genes required for early flower development in *Arabidopsis*. *Genetics* 1998; **149**: 579–595.
- [37] LIM J, HELARIUTTA Y, SPECHT CD, JUNG J, SIMS L, BRUCE WB, DIEHN S, BENFEY PN. Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *Plant Cell* 2000; **12**: 1307–1318.
- [38] LONG JA, MOAN EI, MEDFORD JI, BARTON MK. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1996; **379**: 66–69.
- [39] LONG JA, BARTON MK. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 1998; **125**: 3027–3035.
- [40] LOTAN T, OHTO M, YEE KM, WEST MA, LO R, KWONG RW, YAMAGISHI K, FISCHER RL, GOLDBERG RB, HARADA JJ. *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 1998; **93**: 1195–1205.
- [41] LU P, PORAT R, NADEAU JA, O'NEILL SD. Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* 1996; **9**: 2155–2168.
- [42] LUO Y, KOOP HU. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta* 1997; **202**: 387–396.
- [43] LUO M, BILODEAU P, KOLTUNOW A, DENNIS ES, PEACOCK WJ, CHAUDHURY AM. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 1999; **5**: 296–301.
- [44] MAHÖNEN AP, BONKE M, KAUPPINEN L, RIIKONEN M, BENFEY PN, HELARIUTTA Y. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 2000; **14**: 2938–2943.
- [45] MAJEWSKA-SAWKA A, NOTHNAGEL EA. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol* 2000; **122**: 3–9.
- [46] MALAMY JE, BENFEY PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1997; **124**: 33–44.
- [47] MANSFIELD SG, BRIARTY LG. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can J Bot* 1991; **69**: 461–476.

- [48] MARCEL A, TOONEN E, SCHMIDT A, DE VRIES A. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 1997; **203**: 188–195.
- [49] MAYER U, TORESS RUIZ RA, BERLETH T, MISERA S, JÜRGENS G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 1991; **353**: 402–407.
- [50] MAYER U, BÜTTNER G, JÜRGENS G. Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 1993; **117**: 149–162.
- [51] MAYER KFX, SCHOOF H, HAECKER A, LENHARD M, JÜRGENS G, LAUX T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 1998; **95**: 805–815.
- [52] OGAS J, CHENG JC, SUNG ZR, SOMERVILLE C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* *pickle* mutant. *Science* 1997; **277**: 91–94.
- [53] OGAS J, KAUFMANN S, HENDERSON J, SOMERVILLE CH. *PICKLE* is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **94**: 13839–13844.
- [54] OXLEY D, BACIC A. Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14246–14251.
- [55] PEYROCHE A, PARIS S, JACKSON CL. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast *Gea1* protein. *Nature* 1996; **384**: 479–484.
- [56] PRZEMECK GK, MATTSSON J, HARADTKE CS, SUNG ZR, BERLETH T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 1996; **200**: 229–237.
- [57] PYSH LD, WYSOCKA-DILLER JW, CAMILLERI C, BOUCHEZ D, BENFEY PN. The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J* 1999; **18**: 111–119.
- [58] QUATRANO RS, SHAW SL. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Science* 1997; **2**: 15–21.
- [59] REISER L, SANCHEZ-BARACALDO P, HAKE S. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol Biol* 2000; **42**: 151–166.
- [60] SAMACH A, KLENZ JE, KOHALMI SE, RISSEEUW E, HAUGHN GW, CROSBY WL. The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* in an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J*. 1999; **20**: 433–445.
- [61] SCHERES B, DI LAURENZIO L, WILLEMSSEN V, HAUSER MT, JANMAAT K, WEISBEEK P, BENFEY PN. Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 1995; **121**: 53–62.
- [62] SCHERES B, MCKHANN HI, VAN DEN BERG C. Roots redefined: Anatomical and genetical analysis of root development. *Plant Physiol* 1996a; **111**: 959–964.
- [63] SCHERES B, MCKANN H, VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, WOLKENFELTH, DE VRIEZEG, WEISBEEK P. Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 1996; **187**: 97–105.
- [64] SCHERES B, WOLKENFELT H. The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol Biochem* 1998; **36**: 21–32.
- [65] SCHMIDT EDL, GUZZO F, TOONEN MAJ, DE VRIES SC. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 1997; **124**: 2049–2062.
- [66] SCHOOF H, LENHARD M, HAECKER A, MAYER KF, JÜRGENS G, LAUX T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 2000; **100**: 635–644.



- [67] SCHRICK K, MAYER U, HORRICH A, KUHN T, BELLINI C, DANGEL J, SCHMIDT J, JÜRGENS G. *FAKEL* is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 2000; **14**: 1471–1484.
- [68] SESSIONS A, WEIGEL D, YANOFSKY MF. The *Arabidopsis thaliana* *Meristem Layer 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* 1999; **20**: 259–263.
- [69] SHEVELL DE, LEU WM, GILLMOR CS, XIA G, FELDMANN KA, CHUA NH. *EMB30* is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to *Sec7*. *Cell* 1994; **77**: 1051–1062.
- [70] SHEVELL DE, KUNKEL T, CHUA NH. Cell wall alterations in the *Arabidopsis emb30* mutant. *Plant Cell* 2000; **12**: 2047–2059.
- [71] SORESENSEN MB, CHAUDHURY AM, ROBERT H, BANCHAREL E, BERGER F. *Polycamb* group genes control pattern formation in plant seed. *Curr Biol* 2001; **4**: 277–281.
- [72] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GÄLWEILER L, PALME K, JÜRGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; **286**: 316–318.
- [73] TAKADA S, HIBARA K, ISHIDA T, TASAKA M. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 2001; **128**: 1127–1135.
- [74] TORRES-RUIZ RA, JÜRGENS G. Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* 1994; **120**: 2967–2978.
- [75] TORRES-RUIZ RA, LOHNER A, JÜRGENS G. The *GURKE* gene is required for normal organisation of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J* 1996; **10**: 1005–1016.
- [76] TROTOCHAUD A, JEONG S, CLARK S. *CLAVATA3*, multimeric ligand for the *CLAVATA1* receptor-kinase. *Science* 2000; **289**: 613–617.
- [77] UGGLA C, MELLEROWICZ E, SUNDBERG B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signalling. *Plant Physiol* 1998; **117**: 113–121.
- [78] VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, HAGE W, WEISBEEK P, SCHERES B. Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 1995; **378**: 62–65.
- [79] VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, HENDRIKS G, WEISBEEK P, SCHERES B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 1997; **390**: 287–289.
- [80] VAN HENGEL AJ, GUZZO F, VAN KAMMEN A, DE VRIES S.C. Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol* 1998; **117**: 43–53.
- [81] VIELLE-CALZADA JP, BASKAR R, GROSSNIKLAUS U. Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 2000; **404**: 91–94.
- [82] WILLEMSSEN V, WOLKENFELT H, DE VRIEZE G, WEISBEEK P, SCHERES B. The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 1998; **125**: 521–531.
- [83] YOUL JJ, BACIC A, OXLEY D. Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7921–7926.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 26.01.2001 r.

Przyjęto: 18.07.2001 r.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa  
kwasniak@alpha.sggw.waw.pl





# KOMÓRKI SATELITARNE MIĘŚNI SZKIELETOWYCH

## SATELLITE CELLS OF THE SKELETAL MUSCLE

Danuta CIEŚLAK

Zakład Immunogenetyki Zwierząt, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN,  
Jastrzębiec k/Warszawy

**Streszczenie:** Komórki satelitarne stanowią potencjalnie aktywną mitotycznie populację, przylegającą do włókien mięśni poprzecznie prążkowanych. Potomkowie aktywowanych komórek satelitarnych – mioblasty – po szeregu podziałów mitotycznych ulegają fuzjom z włóknami mięśniowymi, przyczyniając się do ich przyrostu lub regeneracji. Regeneracja mięśni szkieletowych wspomagana jest też w skrajnych przypadkach przez komórki nie mięśniowe, podejmujące miogenezę, jak np. komórki szpiku kostnego. Z drugiej zaś strony, ze względu na swój stosunkowo prymitywny charakter, komórki satelitarne stanowią pulę rezerwową wykorzystywaną przez organizm w procesie hematopoezy. Po genetycznej modyfikacji mioblasty mogą być nośnikami zrekombinowanych genów. Rekombinowane genetycznie mioblasty przenoszą geny czynników wzrostowych i zapewniając ich ekspresję w mięśniach biorcy mogą służyć poprawie produktywności zwierząt. Ponadto podejmowane są próby wykorzystania ich w leczeniu dystrofii mięśniowych u ludzi. Te procedury napotykają jednak ciągle jeszcze wiele problemów, takich jak: niemożność wyizolowania czystej populacji komórek satelitarnych, niedopracowanie warunków ich hodowli *in vitro*, stosunkowo niska efektywność transformacji tych komórek czy wreszcie ich słaba przeżywalność po reimplantacji do mięśni szkieletowych. Dokładne poznanie biologii komórek satelitarnych powinno w przyszłości dopomóc w rozwiązaniu tych problemów.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 529–542)

**Słowa kluczowe:** mięśnie szkieletowe, komórki satelitarne, regeneracja mięśni, dystrofia mięśniowa.

**Summary:** Satellite cells are potentially mitotically active population of mononucleate myoblasts, located in the vicinity of skeletal muscle fibers. The descendants of satellite cells, called myoblasts, after multiple rounds of divisions undergo fusions with existing muscle fibers resulting in their growth or regeneration. In cases of extreme muscle injury, this population is supported by other nonmuscle cells, like bone marrow cells, recruited to myogenic fate. On the other hand, primitive nature of satellite cells allows them to be committed to differentiation into hematopoietic precursors, due to environmental cues. Genetically modified myoblasts are good candidates for cell-mediated gene transfer. Myoblasts injected into muscle fuse to existing fibers resulting in local expression of the transgene. This way genetically modified growth factors could improve meat animal production. Attempts to use genetically modified myoblasts in treatment of muscle dystrophies has been also made. However, the procedures meet many obstacles like

problems with isolation of pure population of muscle satellite cells, limited survival of modified cells after *in vitro* culture, low rate of successful transfections. Precise studies to understand biological nature of satellite cells will help in future to solve these problems.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 529–542)

*Key words:* skeletal muscle, satellite cells, muscle regeneration, muscular dystrophy.

Jedną ze szczególnych właściwości mięśni szkieletowych jest zdeterminowana w trakcie rozwoju płodowego liczba budujących je włókien mięśniowych. W okresie postnatalnym nie ulega ona już zwiększeniu, a intensywny przyrost masy mięśni, obserwowany szczególnie u młodych zwierząt, jest wynikiem powiększania się średnicy już istniejących włókien mięśniowych (hipertrofii). Zjawisko to jest możliwe dzięki przylegającym do włókien mięśniowych komórkom satelitarnym. Te same komórki są także odpowiedzialne za regenerację uszkodzonej tkanki mięśniowej [14]. Jednakże niektóre badania wykonane na mięśniach ptaków wykazały, że hipertrofia nie zawsze wiąże się ze zwiększoną aktywnością komórek satelitarnych [10].

## 1. POCHODZENIE KOMÓREK SATELITARNYCH

Mięśnie szkieletowe wywodzą się z mezodermy zarodkowej. Początkowo niezróżnicowane komórki tworzące somity wczesnego zarodka zaczynają się dzielić na grupy dające początek tkance szkieletowej, mięśniowej i łącznej. Same mięśnie szkieletowe pod względem pochodzenia dzielą się na mięśnie miotomalne (mięśnie szkieletu osiowego) oraz mięśnie niemiotomalne (mięśnie kończyn, języka i przepony). Powstają one z dwóch oddzielnych linii mioblastów, komórek zasiedlających odrębne części somitu [5, 20, 24]. Po licznych podziałach mitotycznych, jednojądrowe mioblasty ulegają fuzjom, ostatecznie tworząc pierwotne włókna mięśniowe [16]. W zarodku myszy pojawiają się one po upływie około 8,5 dnia rozwoju. Dopiero po 16 dniu dołącza do nich jeszcze inna grupa mioblastów, zwanych komórkami satelitarnymi [21]. Posiadają pojedyncze jądro komórkowe i są pozbawione miofibryli [33]. Pochodzenie komórek satelitarnych nie do końca jest jasne. Przypuszczalnie jest to odrębna linia mioblastów, zwanych dojrzałymi (*adult myoblasts*) [14]. Najnowsze badania wskazują, że linia tych komórek pochodzi nie tyle z somitów, co z aorty grzbietowej zarodka [9].

W dojrzałym mięśniu komórki satelitarne zlokalizowane są pomiędzy sarkolemmą a błoną podstawną włókien mięśniowych. Od 2 do 7% jąder komórkowych związanych z konkretnym włóknem mięśniowym należy do komórek satelitarnych. Ten udział zmienia się wraz z wiekiem i typem włókna mięśniowego [3, 26]. Same w sobie komórki satelitarne stanowią niejednorodną grupę. Ich subpopulacje opisano u ludzi, indyków, kur, owiec i świń. Okazuje się, że wyizolowane komórki satelitarne mają heterogenną naturę. Ze względu na ich funkcję wyróżniono wśród nich komórki odpowiedzialne za wzrost i komórki odpowiedzialne za regenerację mięśni. Komórki



satelitarne odpowiedzialne za wzrost mięśni charakteryzują się wolniejszym tempem podziałów w hodowli *in vitro* [3]. Ponadto pewne różnice mogą wynikać ze stanu ich aktywności. Można zatem wyodrębnić nieaktywne mitotycznie, właściwe komórki satelitarne (*stem-cell-like*) oraz aktywne mioblasty, ulegające różnicowaniu we włókna mięśniowe. Ponadto populacje komórek satelitarnych różnią się odmiennym profilem ekspresji poszczególnych izoform łańcucha ciężkiego miozyny, zależnie od rodzaju włókna mięśniowego, z którym są związane [14, 26].

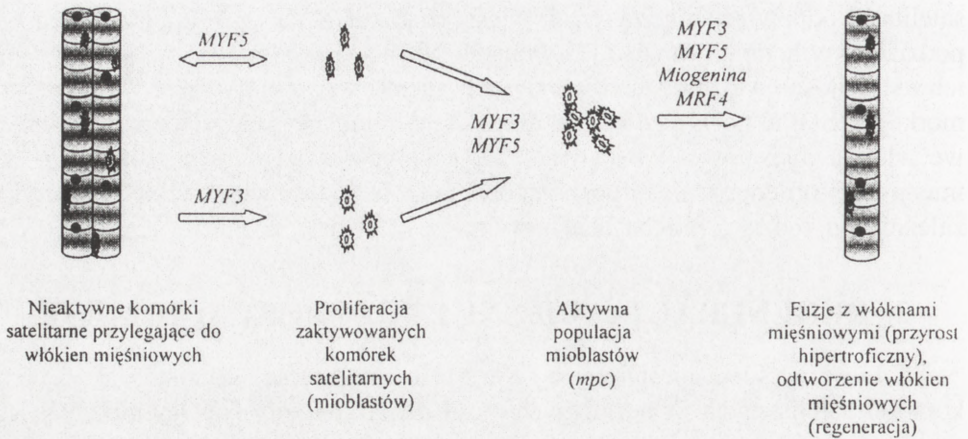
## 2. REGENERACJA MIĘŚNI I PRZYROST ICH MASY

Zdolność włókien mięśniowych do wzrostu i regeneracji wynika z aktywności komórek satelitarnych. W normalnych warunkach fizjologicznych komórki te dzielą się stosunkowo wolno i ulegają fuzjom z włóknami mięśniowymi, zapewniając ich przyrost na grubość. Jednocześnie część puli nowo powstałych komórek odtwarza populację własną. Natomiast mechaniczne uszkodzenia mięśni, jak i chroniczne degeneracje obserwowane w przypadku miopatii pobudzają je do bardziej intensywnych podziałów [13].

### Regeneracja mięśni szkieletowych

Proces regeneracji uszkodzonych mięśni obejmuje aktywację komórek satelitarnych, ich podziały, migracje do ogniska zapalnego, fuzje i różnicowanie. Badania *in vitro* wykazały, że intensywność migracji komórek satelitarnych uzależniona jest od mięśnia, z którego pochodzą [4].

Włókna mięśniowe zaczynają ulegać nekrozie 24 godziny po uszkodzeniu mięśnia myszy [21]. Okolica zranienia penetrowana jest przez makrofagi, eozynofile i neutrofile, usuwające resztki nekrotycznej tkanki, jednak komórki satelitarne i warstwa błony podstawnej pozostają nietknięte [19]. Następuje aktywacja komórek satelitarnych i ich podziały, dzięki czemu powstają nowe mioblasty. Część z nich nie podejmuje dalszych przemian powracając w stan spoczynku i odnawiając tym samym pulę komórek satelitarnych. Reszta – aktywna populacja mioblastów (*mpc – muscle progenitor cells*) zasiedla miejsce obrażenia tkanki i po serii podziałów mitotycznych, osiągających u myszy swoje apogeum w 4 dniu po uszkodzeniu mięśnia, ulega fuzjom, dzięki czemu zostaje odtworzona jego struktura (ryc. 1) [2, 21, 29]. W aspekcie biologicznym i biochemicznym *mpc* różnią się od nieaktywnych komórek satelitarnych i wykazują bardzo wysoki potencjał mitotyczny (każda z tych komórek prawdopodobnie zdolna jest do ponad 80 podziałów) [21, 28]. Możliwości samoodtworzenia populacji komórek satelitarnych mogą jednakże ulec wyczerpaniu w stanie chronicznej regeneracji. Jest to przyczyna, dla której u pacjentów chorych na dystrofię mięśniową Duchenne’a obserwuje się stopniowe zanikanie tkanki mięśniowej i zastępowanie jej tkanką łączną [13].



RYCINA 1. Schemat regeneracji hipertroficznego wzrostu mięśni szkieletowych oraz jego kontrola genetyczna (wg [28])

Liczba komórek satelitarnych stale rezydujących w danym obszarze mięśnia jest mniejsza niż liczba aktywnych mioblastów w mięśniu wkrótce po jego uszkodzeniu. Jest to możliwe dzięki zdolnościom migracji komórek satelitarnych z przyległych włókien lub nawet z sąsiednich mięśni. Przypuszcza się ponadto, że pewna pula mioblastów powstaje wskutek pobudzenia miogenezy w niemięśniowych komórkach rezydujących w mięśniu (np. fibroblastach). Także w warunkach hodowli *in vitro* komórki satelitarne wykazują skłonności migracyjne. W takim przypadku obserwuje się ich gromadzenie w jednych miejscach, przy jednoczesnym spadku zagęszczenia w innych [4].

Proces regeneracji mięśni szkieletowych może być ponadto wspomagany ze strony komórek niemięśniowych, które przywędrowały wraz z krwiobiegiem z innych tkanek. Ostatnie badania na myszach wykazały, że część takich komórek pochodzi ze szpiku kostnego (*BM* – *bone marrow*). Wydaje się, że jest to odrębna populacja komórek istniejących obok komórek macierzystych dla kości i chrząstki. Mogą one migrować ze szpiku do degenerującego mięśnia, przeistaczać się w komórki mięśniowe i brać czynny udział w jego regeneracji. Przypuszczalnie te komórki są rekrutowane przez długotrwałe sygnały związane ze stanami zapalnymi w uszkodzonym mięśniu. Kinetyka różnicowania miogennej komórek pochodzących z *BM* jest spowolniona w stosunku do komórek satelitarnych mięśnia. Pobudzone komórki satelitarne potrafią bowiem odtworzyć włókna mięśniowe już po 5 dniach, podczas gdy komórki *BM* – nie wcześniej jak po 2 tygodniach od momentu uszkodzenia mięśnia myszy. Komórki *BM* mogą zatem wzbogacać pulę mioblastów w warunkach rozległego uszkodzenia mięśnia [13, 25].



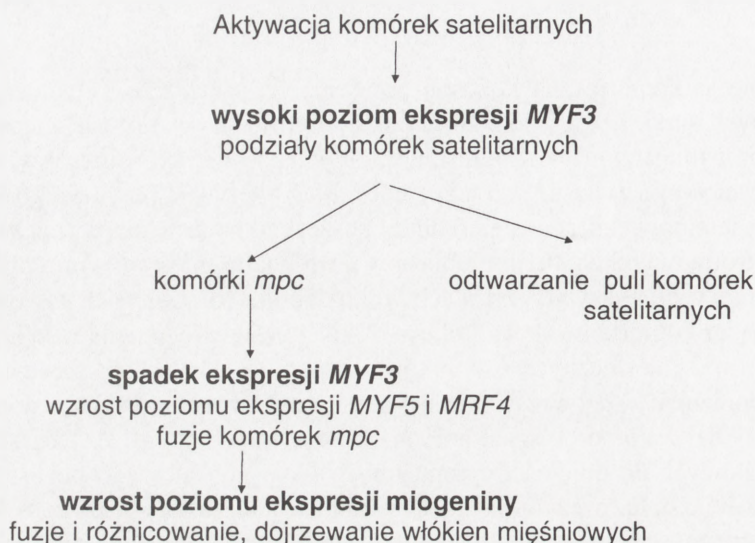
### Postnatalny wzrost masy mięśni

Dodawanie sarkomerów na końcach przyścięgowych mięśni, wydłużanie się poszczególnych sarkomerów, podział podłużny miofibryli i wreszcie – fuzja mioblastów z już istniejącymi włóknami mięśniowymi to procesy, które przyczyniają się do przyżyciowego zwiększenia masy mięśni [14]. Główną przyczyną przyrostu masy mięśni jest powiększanie się średnicy poszczególnych włókien. Zjawisko to, zwane hipertrofią, wynika z fuzji mioblastów z włóknami mięśniowymi i przebiega najintensywniej w pierwszych tygodniach życia osobnika [6]. U mysich noworodków około 30% jąder komórkowych w okolicy włókna mięśniowego należy do komórek satelitarnych, u 2-miesięcznych osobników ich populacja, wskutek postępujących fuzji spada poniżej 5% [29]. Przyjmuje się, że 95% jąder komórkowych w dojrzałym mięśniu pochodzi z komórek satelitarnych, które uległy fuzjom [3]. Udział liczby jąder komórkowych do objętości cytoplazmy włókna mięśniowego pozostaje jednakże wielkością stałą, a czynniki go kontrolujące nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Z pewnością zależą one od typu włókna mięśniowego, gdyż objętość cytoplazmy przypadającej na jedno jądro komórkowe jest większa we włóknach typu szybko- niż wolnokurczliwego [17].

### 3. KONTROLA GENETYCZNA ROZWOJU I REGENERACJI MIĘŚNI

Komórki satelitarne stanowią o możliwości hipertroficznego wzrostu mięśni, toteż poznanie czynników regulujących procesy ich pobudzenia miogenego, podziałów mitotycznych, różnicowania i fuzji może mieć niebagatelne znaczenie w hodowli zwierząt rzeźnych [14].

Rozwój, dojrzewanie i funkcjonowanie tkanki mięśniowej znajduje się pod kontrolą czterech genów, zaliczanych do tzw. rodziny MyoD: *MYF3*, *MYF5*, *miogeniny* i *MRF4*. W nieaktywnych komórkach satelitarnych nie wykrywa się ekspresji tych genów. Zapoczątkowanie ekspresji *MYF3* i *MYF5* aktywuje komórki satelitarne [32]. Kolejność pojawiania się transkryptów tych dwóch genów jest niezależna od rodzaju włókna mięśniowego, z którym związane są komórki satelitarne. Na etapie wzmózonej aktywności mitotycznej mioblastów, gen *MYF3* aktywny jest już we wszystkich komórkach, zastępując *MYF5*. Późniejsze etapy wymagają udziału *MRF4* i *miogeniny*, których ekspresja przypada na moment fuzji i różnicowania nowych komórek mięśniowych [7, 8, 21]. Schemat aktywacji poszczególnych genów MyoD w trakcie regeneracji tkanki mięśniowej przedstawiono na załączonym schemacie.



W nowo powstałych włóknach mięśniowych wykrywane są pewne ilości białka MYF3, a w niektórych także MYF5 [7, 21]. W procesie regeneracji/wzrostu mięśni decydującą rolę odgrywa gen *MYF3*. Zaobserwowano mało efektywną regenerację mięśni myszy z inaktywowanym *MYF3*. Ich komórki satelitarne podejmowały intensywne podziały mitotyczne, jednakże nie ulegały różnicowaniu. Wynika stąd, że gen *MYF3* decyduje o możliwości podziałów i fuzji mioblastów, nie jest natomiast niezbędny dla procesów odtwarzania puli komórek satelitarnych. Ten ostatni proces z kolei zależny jest od aktywności genu *MYF5* [7, 28].

Większa masa mięśni samców niż samic u większości ssaków wynika z większej średnicy włókien mięśniowych u tych pierwszych. Ponieważ poziom ekspresji genów *MYF3*, *MYF5* i *miogeniny* ma związek z aktywnością komórek satelitarnych zdawać by się mogło, że będzie on wyższy u samców. Badania na szczurach zaprzeczają jednak takiej hipotezie, co wskazuje, że przyrosty hipertroficzne mięśni pozostają także pod kontrolą hormonów płciowych [32]. Podobnie u kastrowanych świń stwierdza się obniżenie zawartości DNA w mięśniach szkieletowych, wynikające z obniżenia aktywności mitotycznej komórek satelitarnych. Masa mięśni wieprzy jest o 8–15% mniejsza niż knurów [30]. Badania potwierdziły istotność wpływu hormonów płciowych (androgenów) na procesy regulacji aktywności komórek satelitarnych [23]. Aktywacja komórek satelitarnych i wzrost mięśnia regulowane są ponadto przez poziom czynników wzrostowych, takich jak: FGF (*Fibroblast Growth Factor* – czynnik wzrostu fibroblastów), IGF (*Insulin-like Growth Factor* – insulinopodobny czynnik wzrostu) stymulacja wzrostu) oraz TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*  $\beta$  – transformujący czynnik wzrostowy typu  $\beta$ ) [17].



#### 4. KOMÓRKI SATELITARNE JAKO NARZĘDZIE WYKORZYSTYWANE W TRANSGENEZIE

Genetycznej modyfikacji organizmu dokonuje się drogą transferu odpowiednich konstruktów genowych za pośrednictwem wektorów retrowirusowych, jak i bezwektorowo wykorzystując nośniki DNA, takie jak: liposomy, precypitacja DNA w fosforanie wapnia i elektroporacja [34]. Ta ostatnia metoda wywołuje jednak stosunkowo najwięcej uszkodzeń komórek (około 50%) [1], natomiast najbardziej wydajna jest metoda transdukcji retrowirusowej, aczkolwiek bardziej pracochłonna i wywołuje więcej reakcji typu immunologicznego [14]. Efektywność transdukcji wirusowej jest jednak dość wysoka, gdyż już po 48-godzinnej inkubacji z wektorem retrowirusowym ponad 80% komórek jest zainfekowanych [1]. W przypadku genetycznych modyfikacji tkanki mięśniowej, komórki satelitarne wydają się być odpowiednimi kandydatami umożliwiającymi przenoszenie konstruktów genowych do włókien mięśniowych.

##### Strategie modyfikacji rozwoju mięśni

Tkanka mięśniowa jest kompleksem różnych typów komórek, z których największy udział przypada na włókna mięśniowe. Te ostatnie stanowią niejednorodną grupę i różnią się wielkością, kurczliwością, właściwościami metabolicznymi oraz zawartością białek. Udział każdego typu włókien w mięśniu decyduje o ilości i jakości uzyskanego mięsa. W związku z tym opracowuje się strategie, pozwalające na regulację procesów rozwoju i wzrostu mięśni. Należą do nich odpowiednia selekcja i żywienie zwierząt oraz transgeneza.

Próby genetycznych modyfikacji mięśni zwierząt przeprowadzane są trzema podstawowymi metodami:

1. Mikroiniekcja konstruktów genowych do zapłodnionych komórek jajowych (metoda droga, o małej efektywności i nie zawsze przewidywalnych skutkach);
2. Transfer bezpośredni *in vivo* (iniekcja zmodyfikowanego fragmentu DNA bezpośrednio do tkanki docelowej). Dzięki takim zabiegom uzyskano wzrost poziomu hormonu wzrostu (*GH – growth hormone*) w krwiobiegu i w efekcie zwiększenie przyrostów masy mięśni myszy po iniekcji konstruktu genu *GHRH (Growth-hormone Releasing Hormone – czynnik uwalniający hormon wzrostu)*. Ponadto uzyskano lokalną ekspresję genów kodujących białka, takie jak: dystrofina i *IGF1 (Insulin-like Growth Factor I – insulinopodobny czynnik wzrostu I)*. Wydajność omawianej metody jest jednak niezadowalająca [14]. Na przykład po iniekcji zmodyfikowanych genetycznie konstruktów DNA do mięśnia czworogłowego uda myszy obserwowano ich ekspresję jedynie w 1,5% włókien tego mięśnia, przy czym 10–30% z nich zlokalizowanych było w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca

iniekcji. Poziom ekspresji konstruktu jest ponadto zależny od wielkości jego dawki [34].

3. Transfer pośredni komórek *ex vivo* (iniekcja zmodyfikowanego fragmentu DNA do uprzednio izolowanych i hodowanych *in vitro* komórek, a następnie przeszczepianie ich z powrotem do tkanki docelowej). W przypadku tkanki mięśniowej nośnikami konstruktów genowych są mioblasty. Metoda transferu pośredniego wykorzystuje ich naturalne zdolności do fuzji z włóknami mięśniowymi, dzięki czemu mioblasty mogą „przekazywać” włóknom mięśniowym niesiony przez siebie, zrekombinowany gen [14]. Wykorzystanie mioblastów do transferu genetycznego sprawia jednak wiele problemów. Podstawowe z nich to:

- a) brak odpowiedniej metody pozwalającej na wyizolowanie czystej populacji mioblastów; aby ten cel osiągnąć, podejmuje się próby fluorescencyjnej izolacji komórek satelitarnych; metoda ta polega na stosowaniu specyficznych mięśniowo przeciwciał, znakujących komórki satelitarne, dzięki tym zabiegom można uzyskać kolonie złożone w 90% z tych komórek [14];
- b) stosunkowo mała liczba komórek ulega transformacji genetycznej;
- c) konieczność przeprowadzenia analizy klonalnej komórek po transfekcji, a następnie hodowla *in vitro* w celu namnożenia populacji mioblastów transfekowanych osłabia ich zdolność proliferacji i żywotność;
- d) mioblasty zmodyfikowane genetycznie i przeszczepione do mięśni ulegają fuzjom z włóknami mięśniowymi jedynie w pobliżu miejsca implantacji, ponadto ich przeżywalność jest bardzo niska (1–3%) [1, 14].

Populacje komórek satelitarnych różnią się co do kodowanych przez nie izoform łańcucha ciężkiego miozyny, przez co prawdopodobnie mają one znaczny wpływ na charakter włókna mięśniowego, z którym łączą się w okresie postnatalnym [3]. Z drugiej strony jednak istnieją przesłanki pozwalające stwierdzić, że tak w rozwoju płodowym, jak i postnatalnym, fuzje komórek satelitarnych następują niezależnie od tego, czy włókna mięśniowe są szybko- czy wolnokurczliwe [12]. Być może w przyszłości uda się wyodrębnić populacje komórek satelitarnych zdolnych powodować zmianę typu włókien mięśniowych, do których zostały implantowane [14].

### Aplikacje genetycznie modyfikowanych mioblastów w terapii genowej dystrofii mięśniowych

Dystrofia mięśniowa Duchenne’a (DMD) wywołana jest mutacją w genie dystrofiny. DMD dziedziczy się jako cecha recesywna, a ponieważ gen dystrofiny zlokalizowany jest w chromosomie X, choroba dotyczy tylko chłopców [16]. Dystrofia mięśniowa objawia się postępującym zanikiem mięśni przy równoczesnym przeroście tkanki łącznej i tłuszczowej [22]. Obserwuje się co prawda także liczne włókna regenerujące, które jednak nie są w stanie zrównoważyć degeneracji [19].



Badania przeprowadzone *in vitro* potwierdziły, że zanik masy mięśniowej u chorych na DMD wynika z ograniczenia zdolności proliferacyjnych komórek satelitarnych [22]. Poznanie udziału komórek satelitarnych w procesach regeneracji mięśniowej stworzyło perspektywy dla leczenia tej choroby drogą inżynierii genetycznej. Jednak już na samym początku badań wyłania się pierwsza przeszkoda – brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Jak się okazało, mięśnie dystroficznych myszy (*mdx*), najłatwiej dostępnego modelu zwierzęcego tej choroby, w odróżnieniu od człowieka wykazują tylko łagodną patologię, a to ze względu na wysoki potencjał mitotyczny mysich komórek satelitarnych [8, 15, 21, 27]. Degeneracja mięśni myszy *mdx* staje się zauważalna dopiero po ok. 30 dniach życia. Wówczas notuje się pierwsze ogniska degeneracji i nekrozy mięśni oraz początek regeneracji. Procesy te nie są jednak zbyt intensywne i przebiegają podobnie w przeponie, jak i kończynach. W późniejszym okresie regeneracja mięśni w kończynach przebiega w miarę szybko, dzięki czemu struktura mięśni zostaje utrzymana. Jedynie mięśnie przepony ulegają stopniowej degeneracji. U 16-miesięcznych myszy *mdx* są one już w znacznym stopniu zdegenerowane i zastąpione tkanką łączną [31]. Pozostałe mięśnie poza przeponą nie wykazują degeneracji, a liczba włókien mięśniowych wręcz zaczyna przewyższać nawet o 25% stan normalny. Ostatecznie u myszy *mdx* notuje się 1,7-krotne zwiększenie masy mięśniowej. Brak białka dystrofiny u ludzi, w przeciwieństwie do myszy, prowadzi do silnej redukcji populacji komórek satelitarnych i obniżenia potencjału mitotycznego *mpc* we wszystkich mięśniach. Dopiero po inaktywacji u myszy *mdx* genu *MYF3*, koniecznego dla prawidłowego przebiegu podziałów i fuzji mioblastów, obserwuje się podobne jak u ludzi objawy dystrofii mięśniowej. Komórki satelitarne bez funkcjonalnego genu *MYF3* wykazują nie-normalną morfologię, a ekspresja pozostałych genów z rodziny MyoD jest w nich zakłócona (m.in. obniżony jest poziom ekspresji *MRF4* oraz *miogeniny*) [8]. Niemniej, pomimo wyraźnie obniżonego potencjału mitotycznego komórek satelitarnych u omawianych myszy, nadal następuje regeneracja mięśni [21]. Mimo tych trudności myszy *mdx* są wykorzystywane jako model zwierzęcy ludzkiej dystrofii mięśniowej Duchenne’a i Beckera i służą za podstawę w opracowywaniu metod terapii. Strategie terapii dystrofii mięśniowych polegają na:

- 1) podniesieniu w mięśniach poziomu białka urotropiny, która zastępuje dystrofinę – wiąże się to z koniecznością poszukiwania wektorów zapewniających dobrą wydajność transdukcji, a mieszczących geny tak duże, jak urotropina czy też dystrofina.
- 2) transplantacji mioblastów – metodzie mającej już swoją dziesięcioletnią historię – stosowane są tu dwie strategie, oparte na wykorzystaniu mioblastów heterologicznych i autologicznych:
  - a) wykorzystanie mioblastów heterologicznych (pochodzących od obcego dawcy): W 1989 roku do mięśni dystroficznych myszy wprowadzono komórki C2C12, będące linią komórek miogennych o zdolności do nieogra-

niczonoj liczby podziałów. Zaobserwowano poprawę regeneracji dystroficznych mięśni. Niestety, podobne próby przeprowadzone na ludziach cierpiących na dystrofię mięśniową nie powiodły się. Przyczyną niepowodzeń było zjawisko odpowiedzi immunologicznej organizmu biorcy, skierowanej przeciw zarówno obcym mioblastom, jak i hybrydowym włóknom mięśniowym, powstałym wskutek fuzji z heterologicznymi mioblastami [16]. W skutek odpowiedzi immunologicznej 99% przeszczepionych mioblastów ulegało niemal natychmiastowej eliminacji. Komórki, które uniknęły kontaktu z przeciwciałami, pozostawały w pobliżu miejsca iniekcji, nie wykazując potencjału migracyjnego i nie zasiedlając innych obszarów dystroficznego mięśnia [9].

- b) wykorzystanie mioblastów autologicznych (pochodzących od pacjenta): W celu przezwyciężenia trudności związanych z przeszczepami heterologicznymi zaczęto opracowywać inne strategie. Jedną z nich polegała na izolacji mioblastów z biopsji mięśni pacjenta chorego na dystrofię. Mioblasty hodowano *in vitro*, poddawano transformacji genetycznej konstruktem zawierającym gen terapeutyczny (dystrofinę) i reimplantowano do mięśni tego samego pacjenta. Problem, jaki powstał przy tej okazji, dotyczył konstrukcji wektora zdolnego pomieścić tak duży gen jak dystrofina (długość mRNA dystrofiny obejmuje 2 800 000 par zasad [11]). Transplantacja autologiczna limitowana jest dodatkowo faktem, że mioblasty chłopców powyżej 4 roku życia wykazują już słabą zdolność do podziałów [16]. Wynika to stąd, że zakończenia telomerowe chromosomów tych komórek ulegają silnemu skróceniu już podczas pierwszych 20 dni życia chorego [9]. Najnowsze badania wykazały ponadto obecność w mioblastach DMD czynników hamujących ich podziały, takich jak: TGF- $\beta$  [22]. Czynniki należące do rodziny TGF- $\beta$  – miostatyna – ulega ekspresji w nieaktywnych komórkach satelitarnych zdrowych osobników ograniczając tym samym nadmierny wzrost ich mięśni. Wykazano, że ekspresja miostatyny jest właściwa także aktywowanym komórkom satelitarnym dystroficznych myszy (z inaktywowanym genem *myf3*), co tłumaczy ich słaby potencjał regeneracyjny [8].

Niepowodzenie takich prób znajduje swoje potwierdzenie w doświadczeniach przeprowadzonych na dystroficznych myszach. Wykryto u nich różne populacje komórek satelitarnych. Jedną z nich stanowiła łatwo dostępną pulę komórek miogennych, wykorzystywaną na potrzeby szybkiej regeneracji uszkodzonego mięśnia. Drugą grupą to bardziej pierwotne komórki rezerwowe. Pozostają one w fazie  $G_0$  w czasie wzrostu osobnika i aktywowane są dopiero w warunkach ekstremalnych (np. nekroza mięśnia, chroniczna regeneracja mięśni dystroficznych), aby wspomóc pierwszą populację komórek. Tej właśnie grupy komórek nie znajduje się w mięśniach myszy *mdx*. Potencjał mitotyczny komórek satelitarnych myszy jest jednak sam w sobie na tyle duży, że dodatkowe wsparcie ze strony tej rezerwy nie jest konieczne. Jeśli jednak u ludzi populacje komórek satelitarnych zachowują się podobnie, może



mieć to poważne implikacje w opracowywaniu metod leczenia dystrofii w drodze rekombinacji autologicznych komórek miogennych. Niedobór zdolnych do podziałów mioblastów stwarza bowiem konieczność poszukiwania komórek pnia w innych tkankach, np. w szpiku kostnym czy skórze [15].

- 3) wykorzystanie komórek niemięśniowych: Ponieważ hodowla mioblastów nadal jest bardzo kłopotliwa, pewne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem odpowiednio zmodyfikowanych komórek niemięśniowych jako nośników zrekombinowanego DNA do tkanki mięśniowej. Fibroblasty i komórki szpiku kostnego, jako łatwiejsze do utrzymania w hodowli *in vitro*, są dobrymi kandydatami w tego typu eksperymentach. Transformacji miogennej komórek niemięśniowych dokonuje się w drodze transformacji genetycznej odpowiednio zmodyfikowanym konstruktem genu *MYF3* [16]. Ważne jest, aby komórki przeznaczone do tego typu eksperymentów były pluripotenne, tj. posiadały duże możliwości proliferacyjne i mogły dać początek różnym tkankom, zależnie od potrzeb dyktowanych przez czynniki środowiska. Istnieją przesłanki świadczące, iż takie komórki zlokalizowane są w ścianach naczyń krwionośnych. Trudno je jednak zidentyfikować, gdyż jak dotąd nie wykryto dla nich specyficznych markerów fenotypowych. Poza tym nie wiadomo, czy mają one swoje odpowiedniki u ludzi [9].

Stosunkowo najmniej problemów stwarza hodowla fibroblastów, pierwotnych komórek izolowanych ze skóry. Wysoki potencjał mitotyczny fibroblastów, także u chorych na DMD, stwarza nadzieje na ich wykorzystanie zamiast komórek satelitarnych w leczeniu dystrofii. Genetycznie modyfikowane fibroblasty po infekcji retrowirusem zawierającym genetycznie zmodyfikowany gen *MYF3* ulegają konwersji w mioblasty i następnie mogą być przeszczepione do mięśni, odnawiając pulę komórek mięśniowych. Pierwsze badania na myszach nie przyniosły jednak pożądanych rezultatów. Tylko niewiele włókien mięśniowych uległo odtworzeniu, a przyczyny tego są różnorodne. Po pierwsze, wskutek infekcji retrowirusem niosącym aktywny gen *MYF3*, tylko ok. 30% fibroblastów ulega przeprogramowaniu w kierunku miogenezy. Część fibroblastów jeszcze przed infekcją jest na tyle zróżnicowana, że mimo ekspresji *MYF3* nie ulega przeprogramowaniu. Poza tym takie komórki stosunkowo szybko kończą podziały mitotyczne, co dodatkowo ogranicza liczbę uzyskanych z nich mioblastów. Ponadto w puli komórek zmodyfikowanych genetycznie poziom ekspresji genu dystrofiny jest zbyt niski. Iniekcja domięśniowa rekombinowanych fibroblastów, z których tylko część podejmuje procesy miogenne, sprawia, że poza nielicznymi włóknami mięśniowymi rozrasta się tkanka łączna (nietransformowane fibroblasty mają lepszy potencjał rozwojowy). Opisywana metoda wymaga więc dalszych udoskonaleń i wykorzystanie do transfekcji pozostałych genów z rodziny MyoD może okazać się konieczne [16].

Sporo nadziei budzą pewne właściwości komórek stromy szpiku kostnego, które w naturze biorą udział w regeneracji mięśni. Również w pewnych warunkach *in vitro* mogą różnicować się w kurczliwe włókna mięśniowe. Trudności, w odróżnieniu od pozostałych komórek szpiku, ograniczają wykorzystanie komórek stromy. Badania przeprowadzone na myszach dowiodły, że komórki te miały swój udział w regeneracji nie więcej jak 0,5% włókien mięśniowych. W przypadku ludzi chorych na DMD, u których zdolności regeneracyjne komórek satelitarnych są wyczerpane już w pierwszych latach życia, komórki stromy mogą się okazać dużo bardziej przydatne [9].

Mała populacja komórek satelitarnych w mięśniach szkieletowych budzi coraz większe zainteresowanie. To właśnie w tych komórkach drzemie potencjał rozwojowy mięśni i to one stanowią ratunek podczas uszkodzenia tkanki mięśniowej. Komórki satelitarne izolowane z mięśni dorosłych osobników wykazują pewien stopień plastyczności, pozwalający im brać udział w regeneracji nie tylko mięśni, ale i całego systemu hematopoetycznego. Mogą się zatem okazać przydatne w przeszczepach autologicznych szpiku kostnego. Możliwe zatem, że przyszłość komórek satelitarnych w organizmie zależy bardziej od sygnałów środowiskowych niż tkanki, z której pochodzą [18]. Jednak na wzór każdej komórki żywego organizmu, ich zdolność do samoodnawiania maleje wraz z wiekiem. W miarę starzenia się organizmu obserwuje się proces odwrotny – redukcję masy mięśniowej (sarkopenia). Sarkopenia związana jest ze zmianami unerwienia mięśnia i profilu hormonalnego, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia liczby jąder komórkowych w poszczególnych włóknach mięśniowych. Przypuszcza się ponadto, że wskutek starzenia organizmu następuje osłabienie regeneracyjnych funkcji komórek satelitarnych, co ostatecznie przyczynia się do stopniowego zanikania mięśni [8, 15].

## LITERATURA

- [1] BLANTON JR, BIDWELL CA, SANDERS DA, SHARKEY CM, MCFARLAND DC, GERRARD DE, GRANT AL. Plasmid transfection and retroviral transduction of porcine muscle cells for cell-mediated gene transfer. *J Anim Sci* 2000; **78**: 909–918.
- [2] BUONANNO A, APONE L, MORASSO MI, BEERS R, BRENNER H, EFTIMIE R. The MyoD family of myogenic factors is regulated by electrical activity: isolation and characterization of a mouse Myf-5 cDNA. *Nucl Acids Res* 1992; **20** (3): 539–544.
- [3] CARPENTER CHE, RODRIGUEZ BT, COCKETT NE. Growth and differentiation of cultured satellite cells from callipyge and normal lambs. *Can J Anim Sci* 2000; **80** (2): 297–302.
- [4] CHAZAUD B, CHRISTOV CH, GHERARDI RK, BARLOVATZ-MEIMON G. *In vitro* evaluation of human muscle satellite cell migration prior to fusion into myotubes. *J Muscle Res Cell Mot* 1998; **19**: 931–936.
- [5] CHEN JCY, GOLDBAMMER DJ. Transcriptional mechanisms regulating *MyoD* expression in the mouse. *Cell Tissue Res* 1999; **296**: 213–219.



- [6] CHRISTENSEN M, OKSBJERG N, HENCKEL P, JØRGENSEN PF. Immunohistochemical examination of myogenesis and expression pattern of myogenic regulatory proteins (myogenin and myf-3) in pigs. *Livest Prod Sci* 2000; **6**: 189–195.
- [7] COOPER RN, TAJBAKSH S, MOULY V, COSSU G, BUCKINGHAM M, BUTLER-BROWNE GS. *In vivo* satellite cell activation via Myf-5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci* 1999; **112**: 2895–2901.
- [8] CORNELISON DDW, OLWIN BB, RUDNICKI MA, WOLD BJ. MyoD *-/-* satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* 2000; **224**: 122–137.
- [9] COSSU G, MAVILIO F. Myogenic stem cells for the terapt of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Cell Investigation* 2000; **105**: 1669–1674.
- [10] DUPONT-VERSTEEG DEN EE, MURPHY RJL, HOULE JD, GURLEY CM, PETERSON CHA. Mechanisms leading to restoration of muscle size with exercise and transplantation after spinal cord injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C1677–C1684.
- [11] EPSTEIN HF, BERNSTEIN SI. Genetic approaches to understanding muscle development. *Dev Biol* 1992; **154**: 231–244.
- [12] EVANS D, BAILLIE H, CASWELL A, WIGMORE P. During fetal muscle development, clones of cells contribute to both primary and secondary fibers. *Dev Biol* 1994; **162**: 348–353.
- [13] FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G, MAVILIO F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; **279**: 1528–1530.
- [14] GRANT AL, GERRARD DE. Cellular and molecular approaches for altering muscle growth and development. *Canad J Anim Sci* 1998; **78**: 493–502.
- [15] HESLOP L, MORGAN JE, PARTRIDGE TA. Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J Cell Sci* 2000; **113**: 2299–2308.
- [16] HUARD CH, MOISSET PA, DICAIRE A, MERLY F, TARDIF F, ASSELIN I, TREMBLAY JP. Transplantation of dermal fibroblasts expressing MyoD1 in mouse muscles. *Bioch Bioph Res Comm* 1998; **248**: 648–654.
- [17] HUGHES SM, SCHIAFFINO S. Control of muscle fibre size: a crucial factor in ageing. *Acta Physiol Scand* 1999; **167**: 307–312.
- [18] JACKSON KA, TIEJUAN M, GOODELL MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999; **96**(25): 14482–14486.
- [19] JIN Y, MURAKAMI N, SAITO Y, GOTO Y, KOISHI K, NONAKA I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. *Acta Neuropathol* 2000; **99**: 619–627.
- [20] KUCHARCZUK KL, LOVE CHM, DOUGHERTY NM, GOLDHAMER DJ. Fine-scale transgenic mapping of the *MyoD* core enhancer: *MyoD* is regulated by distinct but overlapping mechanisms in myotomal and non-myotomal muscle lineages. *Development* 1999; **126**, 1957–1965.
- [21] MEGENEY LA, KABLAR B, GARRETT K, ANDERSON JE, RUDNICKI MA. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Gen Dev* 1996; **10**: 1173–1183.
- [22] MELONE MAB, PELUSO G, PETILLO O, GALDERISI U, COTRUFO R. Defective growth *in vitro* of Duchenne Muscular Dystrophy myoblasts: the molecular and biochemical basis. *J Cell Biochem* 1999; **76**: 118–132.
- [23] MULVANEY DR, MARPLE DN, MERKEL RA. Proliferation of skeletal muscle satellite cells after castration and administration of testosterone propionate. *Proc of the Society for Exp Biol Med* 1988; **188**: 40–45.
- [24] ORDAHL CHP, LE DOUARIN NM. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 1992; **114**: 339–353.
- [25] PENNISI E. Bone marrow cells may provide muscle power. *Science* 1998; **279**: 1456.

- [26] PUTMAN CHT, DUSTERHOFT S, PETTE K. Satellite cell proliferation in low frequency-stimulated fast muscle of hypothyroid rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C682–690.
- [27] REIMANN J, IRINTCHEV A, WERNIG A. Satellite cells in normal and regenerated soleus muscles of MDX and control mice. *Eur J Neurosci* 1998; **10**: 366.
- [28] SABOURIN LA, GIRGIS-GABARDO A, SEALE P, ASAKURA A, RUDNICKI MA. Reduced differentiation potential of primary *MyoD*<sup>-/-</sup> myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 1999; **144**: 631–643.
- [29] SEALE P, SABOURIN LA, GIRGIS-GABARDO A, MANSOURI A, GRUSS P, RUDNICKI MA. Pax3 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 2000; **102**: 777–788.
- [30] SKJAERLUND DM, MULVANEY DR, BERGEN WG, MERKEL RA. Skeletal muscle growth and protein turnover in neonatal boars and barrows. *J Anim Sci* 1994; **72**: 315–321.
- [31] STEDMEN HH, SWEENEY HL, SHRAGER JB, MAGUIRE HC, PANETTIERI RA, PETROFB, NARUSAWA M, LEFEROVICH JM, SLADKY JT, KELLY AM. The *mdx* mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 1991; **352**: 536–539.
- [32] TE PAS MFW, DE JONG PR, VERBURG FJ, DUIN M, HENNING RH. Gender related and dexamethasone induced differences in the mRNA levels of the MRF genes in rat anterior skeletal muscle. *Mol Biol Rep.* 1999; **26**: 277–284.
- [33] WEIS J. Jun, Fos, MyoD, and Myogenin proteins are increased in skeletal muscle fiber nuclei after denervation. *Acta Neuropathol* 1994; **87**: 63–70.
- [34] WOLFF JA, MALONE RW, WILLIAMS P, CHONG W, ASCADI G, JANI A, FELGNER PL. Direct gene transfer into mouse muscle. *Science* 1990; **247**: 1465–1468.

Redaktor prowadzący – W. Kilariski

Otrzymano: 12.02.2001 r.

Pryjęto: 17.07.2001 r.

Adres autora: Jastrzębiec koło Warszawy

05-552 Wólka Kosowska



## ETANOL I ALDEHYD OCTOWY: UDZIAŁ W PROCESACH MUTAGENEZY I KARCYNogenezy

### ETHANOL AND ACETALDEHYDE: PARTICIPATION IN MUTAGENESIS AND CARCINOGENESIS

<sup>1</sup>Andrzej TRZECIAK, <sup>2</sup>Ewa MAŁECKA-PANAS,  
<sup>3</sup>Hanna ROMANOWICZ-MAKOWSKA, <sup>4</sup>Andrzej KULIG

<sup>1, 3</sup>Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej,  
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, <sup>2</sup>Klinika Chorób Przewodu Pokarmowego  
i Przemiany Materii, Akademia Medyczna w Łodzi,  
<sup>4</sup>Zakład Patomorfologii Klinicznej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki

*Streszczenie:* Przewlekłe, nadmierne spożycie alkoholu niesie za sobą zmiany strukturalne wątroby, mózgu i innych narządów oraz jest związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na pewne rodzaje nowotworów. Metabolizm etanolu prowadzi do powstania aldehydu octowego i kwasu octowego. Aldehyd octowy tworzy addukty z DNA i białkami, zmniejsza wydajność systemów naprawy DNA, a także zmniejsza poziom glutationu, peptydu biorącego udział w detoksyfikacji. Podczas metabolizmu etanolu przez cytochromy oraz przez dehydrogenazę alkoholową i oksydazę ksantynową powstają także wolne rodniki. Właściwości kokarcynogenne etanolu związane są również z niedoborami witamin i mikroelementów, takich jak: witamina A, folian, cynk, selen oraz z możliwością indukcji cytochromu P-450 2E1, związanej z szybszą aktywacją różnych prokarcynogenów. Powstawanie nowotworów może również zależeć od swoistych mechanizmów, jakimi się charakteryzują różne narządy układu pokarmowego. W przypadku wątroby mechanizmy te mogą prowadzić do przewlekłego zapalenia oraz marskości, na podłożu której często dochodzi do raka wątrobowo-komórkowego.  
(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 543–559)

*Słowa kluczowe:* etanol, aldehyd octowy, komutageny, cytochromy, ksenobiotyki, dehydrogenaza alkoholowa, oksydaza ksantynowa, wolne rodniki, addukty, naprawa DNA

*Summary:* Chronic alcohol abuse results in a variety of pathological effects, including damage to the liver and brain, as well as other organs, and is associated with an increased risk of certain types of cancers. The metabolism of ethanol leads to the generation of acetaldehyde and acetic acid. Acetaldehyde causes DNA and protein adducts and decreases DNA repair mechanisms, and traps glutathione, an important

peptide in detoxification. During metabolism of ethanol by cytochromes, and alcohol dehydrogenase and xanthine oxidase free radicals can be also generated. Other mechanisms by which alcohol stimulates carcinogenesis include the induction of cytochrome P-450 2E1, associated with an enhanced activation of various procarcinogens, and nutritional deficiencies such as vitamin A, folate, zinc and selenium deficiency. In addition, local mechanisms in the upper gastrointestinal tract and in the rectum may be of particular importance. Such mechanisms lead to tissue injury such as cirrhosis of the liver, a major prerequisite for hepatocellular carcinoma.

(*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 543–559)

**Key words:** ethanol, acetaldehyde, comutagens, cytochromes, xenobiotics, alcohol dehydrogenase, xanthine oxidase, free radicals, adducts, DNA repair

**Wykaz stosowanych skrótów:** **ADH** – dehydrogenaza alkoholowa; **ALDH** – dehydrogenaza aldehydowa; **AOX** – oksydaza aldehydowa; **CYP 2E1** – cytochrom P-450 2E1; **HBV** – wirus zapalenia wątroby typu B; **MGMT** – metylotransferaza O<sup>6</sup>-metyloguanina-DNA; **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – anionorodnik ponadtlenkowy; **XOR** – oksydaza ksantynowa

Przewlekłe spożywanie alkoholu w dużych ilościach pociąga za sobą szereg następstw, których wykładnikami są zmiany strukturalne. U osób nadużywających alkohol stwierdza się je zwłaszcza w wątrobie, sercu, mózgu oraz innych narządach. Ważne miejsce stanowi podwyższona o około 1,5 raza zapadalność na nowotwory. Największe względne ryzyko zachorowania na nowotwór odnotowano w błonie śluzowej jamy ustnej, gardła, przełyku i krtani (większe 4–12 razy). Jest ono nieco niższe w odniesieniu do wątroby, płuc, żeńskich narządów rozrodczych, a także dla gruczołu piersiowego, prostaty, trzustki, żołądka i jelita grubego [18, 43, 44]. Szczególnie wysokie ryzyko wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła, przełyku i krtani może być związane z obecnością na ich błonie śluzowej flory bakteryjnej metabolizującej alkohol etylowy do aldehydu octowego oraz ze stymulacją proliferacji nabłonka przez alkohol w warunkach niedostatecznego zaopatrzenia w tlen w następstwie skurczu naczyń krwionośnych [20].

Dane doświadczalne uzyskane w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wskazują na to, że etanol nie jest mutagenem i karcynogenem, ale w pewnych warunkach może wykazywać działanie komutagenne i kokarcynogenne oraz może być promotorem nowotworzenia [37, 40]. Etanol jest zatem czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia nowotworów indukowanych przez czynniki karcynogenne. Na przykład, alkohol spożywany w ilościach większych niż 80 g dziennie zwiększa ryzyko zachorowania na raka przełyku 18-krotnie, palenie papierosów 5-krotnie, podczas gdy obydwa czynniki łącznie zwiększają ryzyko 44-krotnie [40]. Wzrost ryzyka zachorowania na raka przełyku i inne rodzaje nowotworów u osób niepalących jest spowodowany obecnością w diecie związków o działaniu karcynogennym. Również napoje alkoholowe, takie jak: whisky, wermut, sherry, piwo i wino, mogą zawierać karcynogeny: węglowodory policykliczne, nitrozoaminy, włókna azbestu [41]; w skład niektórych napojów (whisky) mogą wchodzić także fuzle podestylacyjne zawierające ketony, estry, aldehydy, etery itp.

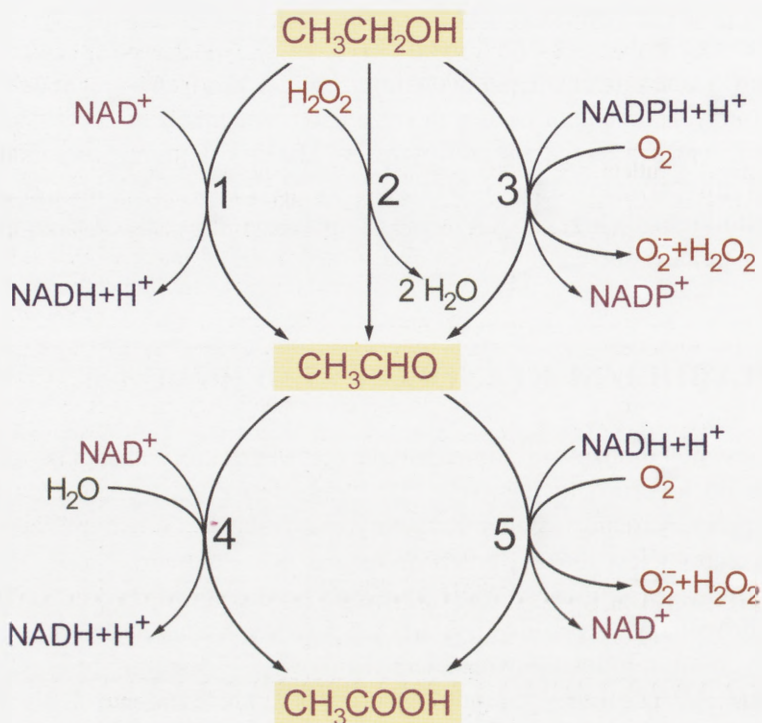


Toksyczne oddziaływanie etanolu jest spowodowane aktywnością produktów powstających podczas jego przemian w organizmie człowieka oraz jego wpływem na szybkość metabolizmu ksenobiotyków (ryc. 1 i 2). Nadmierne spożycie alkoholu jest także związane z mechanizmami obejmującymi uszkodzenie i regenerację tkanek po ich ekspozycji na etanol o dużych stężeniach, zmianami w odpowiedzi immunologicznej, większą liczbą zakażeń wirusem HBV, kolejnymi czynnikami wpływającymi na powstawanie i wzrost nowotworów. Ponadto etanol jest rozpuszczalnikiem dla karcynogenów i jest odpowiedzialny za niedobory niektórych składników pokarmowych.

## 1. METABOLIZM ETANOLU I ALDEHYDU OCTOWEGO

Etanol jest metabolizowany do aldehydu octowego, który następnie ulega przekształceniu do kwasu octowego (ryc. 1). Etanol jest przekształcany do aldehydu octowego przez 3 różne systemy enzymatyczne (tab. 1). Głównym szlakiem metabolizmu etanolu jest reakcja przeprowadzana przez dehydrogenazę alkoholową (ADH). Największą aktywność ADH stwierdza się w wątrobie i żołądku. Na aktywność dehydrogenazy alkoholowej składa się 5 różnych klas dehydrogenaz, charakteryzujących się odmienną swoistością tkankową. Wykazano, że klasa I genów ADH (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*) jest indukowana na poziomie transkrypcji w następstwie przewlekłego spożywania etanolu [45]. W wyniku reakcji przeprowadzanej przez ten enzym powstają znaczące ilości NADH, szczególnie w wątrobie, co w konsekwencji prowadzi do zwiększonej produkcji tłuszczów, zahamowania cyklu Krebsa i glukoneogenezy oraz hipoglikemii. W przypadku alkoholików etanol pokrywa przeciętnie połowę zapotrzebowania energetycznego organizmu. Zmniejszone spożycie pokarmu pełnowartościowego pod względem odżywczym, powoduje niewystarczające pokrycie na niektóre składniki pokarmowe, takie jak: folian, tiaminę i inne witaminy.

Za metabolizm etanolu, poza dehydrogenazą alkoholową, odpowiedzialne są również cytochromy i katalaza. Cytochromem, który przekształca najwięcej etanolu, jest cytochrom P-450 2E1 (CYP 2E1), chociaż w metabolizm etanolu zaangażowane są także CYP 2A6, CYP 3A4 i CYP 3A5 [35]. Największą aktywność CYP 2E1 stwierdzono w wątrobie. Poza cytochromem, w skład systemu utleniającego etanol wchodzi również reduktaza cytochromu P-450. Przewlekłe narażenie organizmu na etanol powoduje zwiększenie aktywności CYP 2E1 w wątrobie nawet o 4–10 razy [51]. Konsekwencją indukcji tego cytochromu jest tworzenie wolnych rodników poprzez jednoelektronową redukcję  $O_2$  oraz przyspieszona aktywacja szeregu ksenobiotyków. Do związków metabolizowanych przez CYP 2E1 należą nitrozoaminy, 1-butanol, 1-pentanol, anilina [32]. Katalaza *in vitro* przeprowadza utlenianie etanolu



RYCINA 1. Metabolizm etanolu i aldehydu octowego w komórkach człowieka. Reakcje przeprowadzane przez dehydrogenazę alkoholową (1), katalazę (2), układ złożony z cytochromu P-450 2E1 i reduktazy cytochromu P-450 (3), dehydrogenazę aldehydową (4) i oksydazy ksantynową lub aldehydową (5). W przypadku reakcji przeprowadzanych przez oksydazy substratami pojedynczej reakcji są tlen i aldehyd octowy lub tlen i NADH. Aldehyd octowy może być również sprzężony z GSH.

w obecności systemu tworzącego  $\text{H}_2\text{O}_2$  [7]. *In vivo* utlenianie etanolu przez katalazę zachodzi w peroksosomach; źródłem  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych przebiegająca w tych organellach komórkowych. Znaczenie katalazy w katabolizmie etanolu jest niewielkie.

Aldehyd octowy przekształcany jest do kwasu octowego podczas reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę aldehydową oraz oksydazy: ksantynową i aldehydową; może on również być sprzężony z GSH. Dehydrogenaza aldehydowa (ALDH) jest enzymem mitochondrialnym charakteryzującym się małą wartością stałej Michaelisa  $K_m$ . Aktywność tego enzymu ulega zmniejszeniu pod wpływem przewlekłego spożycia etanolu [17]. Aldehyd octowy może być także metabolizowany przez oksydazy ksantynową (XOR) i aldehydową (AOX) (tab. 1) – enzymy, których największą aktywność stwierdza się w gruczole piersiowym, wątrobie i



TABELA 1. Enzymy uczestniczące w metabolizmie etanolu i aldehydu octowego

Enzym	Przeprowadzana reakcja	Występowanie/ znaczenie	Zmiany aktywności pod wpływem różnych czynników	Konsekwencje wynikające z metabolizmu etanolu lub aldehydu octowego
Dehydrogenaza alkoholowa (ADH)	utlenianie etanolu w obecności $\text{NAD}^+$	cytoplazma; największą aktywność stwierdza się w wątrobie i żołądku	podlega indukcji; aktywność enzymu w żołądku maleje pod wpływem nadmiernego spożycia alkoholu	nadmiar NADH względem $\text{NAD}^+$ ; niedobór niektórych składników pokarmowych (np. witamin)
Cytochrom P-450 2E1 (CYP 2E1) i reduktaza cytochromu P-450	utlenianie etanolu w obecności NADPH i $\text{O}_2$	retikulum endoplazmatyczne; największą aktywność stwierdza się w wątrobie	w wątrobie możliwa 4–10-krotna indukcja aktywności enzymu	aktywacja CYP 2E1 i związana z nią produkcja wolnych rodników i przyspieszony metabolizm ksenobiotyków
Katalaza	utlenianie etanolu w obecności $\text{H}_2\text{O}_2$	peroksosomy; odgrywa stosunkowo niewielkie znaczenie w katabolizmie etanolu		
Dehydrogenaza aldehydowa	utlenianie aldehydu octowego w obecności $\text{NAD}^+$	mitochondria	aktywność enzymu maleje w przypadku nadmiernego spożywania etanolu	
Oksydaza ksantynowa (XOR), oksydaza aldehydowa (AOX)	redukcja $\text{O}_2$ w obecności aldehydu octowego lub nadmiaru NADH	XOR występuje w wątrobie, trzustce, gruczole piersiowym; AOX ma mniejsze znaczenie w metabolizmie aldehydu octowego	podlega indukcji pod wpływem spożycia etanolu; największa aktywność XOR w gruczole piersiowym występuje podczas okresu laktacji	jednoelektronowa i dwuelektronowa redukcja $\text{O}_2$ dające w rezultacie $\text{O}_2^-$ i $\text{H}_2\text{O}_2$

trzustce. W gruczole piersiowym największa ekspresja genu kodującego XOR zachodzi podczas laktacji w związku z faktem, że XOR znajduje się w znacznych ilościach w mleku. Podczas okresu laktacji XOR stanowi 1–2% całkowitej masy białka gruczołu piersiowego [31].

## **2. TKANKI I NARZĄDY NARAŻONE NA DZIAŁANIE ETANOLU I ALDEHYDU OCTOWEGO**

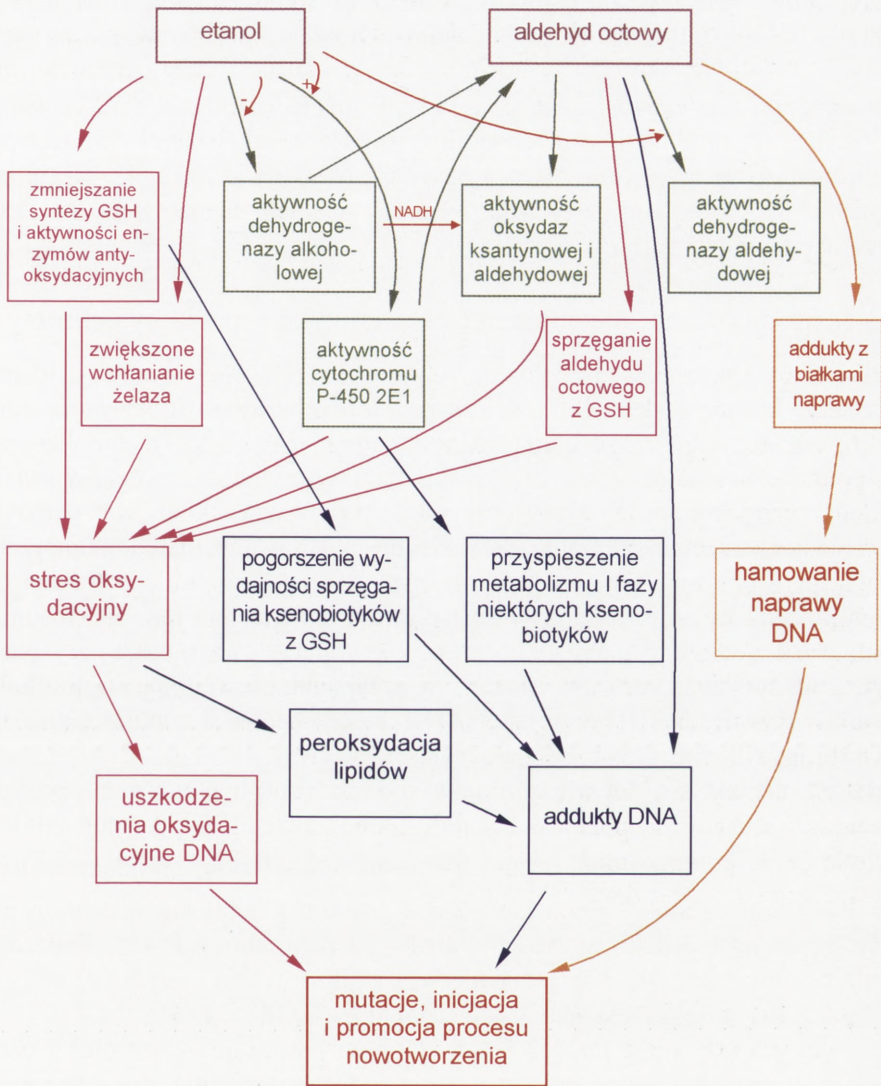
Na działanie etanolu o dużych stężeniach mogą być w szczególności narażone komórki błony śluzowej jamy ustnej, gardła, krtani, przełyku i żołądka. Warstwa śluzu obecna w żołądku stanowi barierę ochronną przed kwasem solnym i pepsyną, jednakże nie zabezpiecza komórek błony śluzowej przed etanolem obecnym w treści pokarmowej [30].

Aldehyd octowy powstaje w wątrobie oraz w komórkach błony śluzowej żołądka i jelita grubego ssaków podczas metabolizmu etanolu [4, 16, 38]. Aldehyd ten może również powstawać w wyniku utleniania etanolu przeprowadzanego przez mikroflorę jamy ustnej, gardła, przełyku i jelita grubego oraz procesów gnilnych zachodzących z udziałem bakterii w jelicie grubym [36]. Aldehyd octowy znajduje się także w dymie papierosowym, spalinach samochodowych, wielu owocach i warzywach (jabłka, kawa, cytryny, cebula) oraz w mięsie i serach żółtych. Zatem komórki błony śluzowej układu oddechowego i jelita grubego mogą być ekspozowane na aldehyd octowy również u osób nie spożywających alkoholu etylowego [20]. U szczurów, którym nie podawano alkoholu, stwierdzono, że stężenie aldehydu w świetle jelita grubego może sięgać 135  $\mu\text{M}$ , natomiast u osobników, którym podawano etanol nawet do 3000  $\mu\text{M}$  [54].

## **3. ROLA ETANOLU I ALDEHYDU OCTOWEGO W MUTAGENEZIE I KARCYNOGENEZIE**

Uważa się, że etanol nie jest bezpośrednio odpowiedzialny za uszkodzenia DNA, indukcję mutacji i proces karcynogenezy. Może on oddziaływać genotoksycznie za pośrednictwem uszkodzeń DNA powstających jako wynik stresu oksydacyjnego oraz obecności w komórce jego metabolitu: aldehydu octowego. Alkohol może także być rozważany jako komutagen i kokarcynogen ze względu na możliwość wpływania na aktywność cytochromu P-450 2E1 (oraz innych cytochromów), a także zmniejszania aktywności enzymów antyoksydacyjnych, enzymów uczestniczących w syntezie i metabolizmie glutationu, białek naprawy i zwiększonego wchła-





RYCINA 2. Znaczenie etanolu i produktów jego metabolizmu w procesach mutagenyzy i karcynogenyzy. Na zielono oznaczono szlak metabolizmu etanolu i aldehydu octowego; produktem reakcji utleniania aldehydu octowego przeprowadzanej przez dehydrogenazę aldehydową i oksydazy jest kwas octowy. Kolorem różowym oznaczono procesy prowadzące do powstania uszkodzeń oksydacyjnych DNA, niebieskim – wytworzenia adduktów DNA, pomarańczowym – hamowania naprawy DNA

niania jonów żelaza przez komórki. Znaczenie etanolu i produktów jego metabolizmu w indukcji mutacji i procesie nowotworzenia przedstawiono na rycinie 2.

Na szczególną uwagę zasługuje modulowanie metabolizmu ksenobiotyków przez cytochromy [23], produkcja wolnych rodników podczas reakcji katalizowanych przez cytochromy, ADH oraz XOR, AOX i oksydazę NADPH [21, 22, 42, 58], a także oddziaływanie produktów peroksydacji lipidów i aldehydu octowego na DNA i system naprawy DNA [56].

### 3.1. Modulowanie metabolizmu ksenobiotyków przez cytochromy

Alkohol etylowy może modulować zdolność cytochromów wątroby do metabolizowania ksenobiotyków [23]. W przypadku przewlekłego spożywania etanolu zachodzi indukcja CYP 2E1 oraz innych mikrosomalnych układów metabolizujących leki, w wyniku czego następuje przyspieszenie aktywacji ksenobiotyków swoiście metabolizowanych przez te układy. Przeciwnie w przypadku, kiedy w hepatocytach pojawi się nagle duża ilość etanolu, dochodzi do zahamowania metabolizmu szeregu ksenobiotyków z uwagi na współzawodnictwo etanolu z innymi substratami CYP 2E1 oraz na uwalnianie hormonów sterydowych hamujących inne mikrosomalne enzymy detoksykacyjne. Niekiedy obecność alkoholu etylowego może przyspieszać reakcje katalizowane przez cytochromy; w przypadku niewielkiej ilości alkoholu w wyniku aktywności ADH powstaje NADH, który wpływa stymulująco na aktywność mikrosomalnych systemów detoksykacyjnych [9].

Zwiększenie aktywności cytochromów spowodowane nadmiernym spożyciem etanolu może mieć także inne konsekwencje. Jedną z nich jest zwiększenie produkcji wolnych rodników. Anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) i  $H_2O_2$  są produktami jedno- i dwuelektronowej redukcji tlenu zachodzącej podczas przepływu elektronów przez układy zawierające reduktazę cytochromu P-450 i cytochrom P-450. Podczas utleniania etanolu może się również tworzyć rodnik 1-hydroksyetylowy, który jest odpowiedzialny za alkilacje białek i DNA [14, 34, 60].

Przewlekłe spożywanie dużych ilości alkoholu powoduje w wątrobie i osoczu zmniejszenie poziomu kwasu retinowego, pochodnej witaminy A charakteryzującej się największą aktywnością. Obniżenie poziomu kwasu retinowego jest wywołane nie tylko zmniejszeniem przyswajania pełnowartościowego pokarmu w związku z częściowym pokryciem zapotrzebowania energetycznego organizmu przez etanol, ale również może być związane z utlenianiem przez cytochromy tego kwasu do kwasów: 18-hydroksyretinowego i 4-oksoretinowego; u alkoholików największe znaczenie w utlenianiu kwasu retinowego może mieć CYP 2E1 [26].



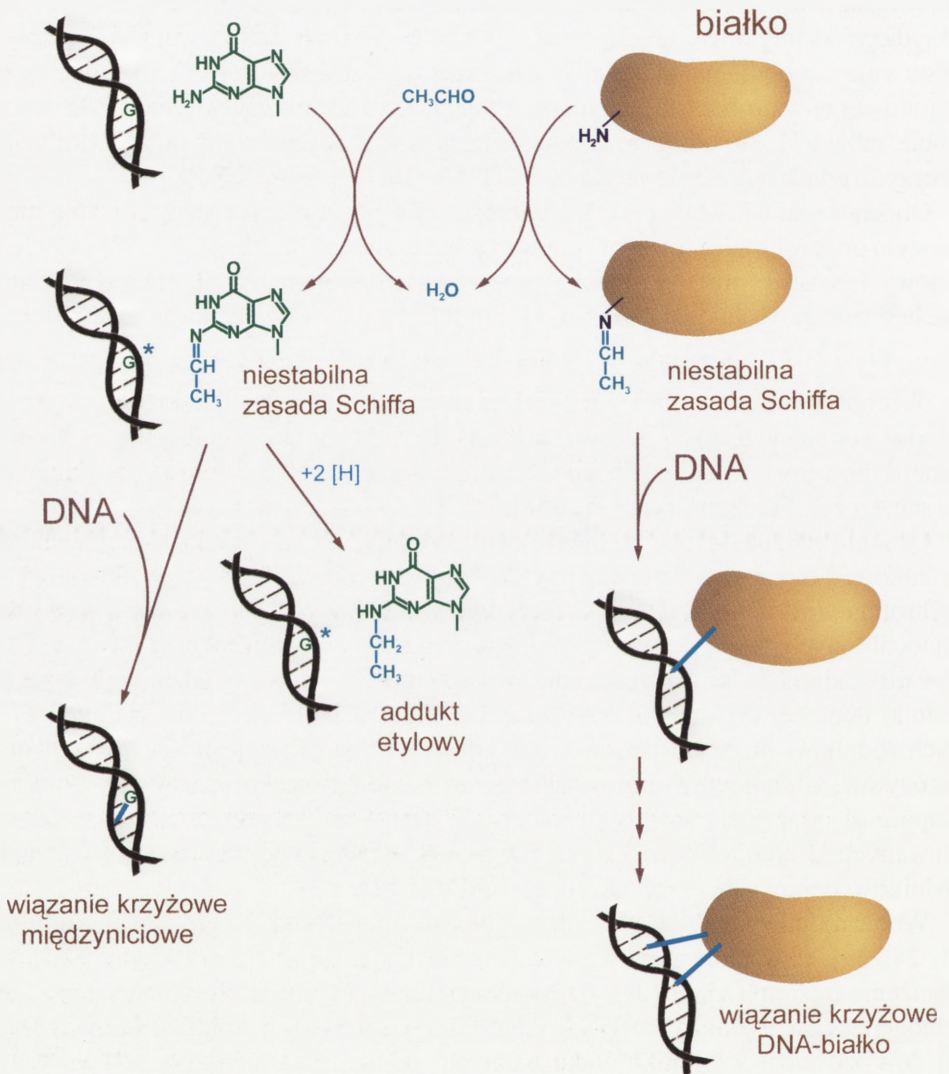
### 3.2. Udział wolnych rodników w genotoksyczności etanolu

Źródłem reaktywnych form tlenu poza reakcjami katalizowanymi przez cytochromy są również reakcje przeprowadzane przez dehydrogenazę alkoholową oraz oksydazy: ksantynową, aldehydową i NADPH. U osób nadużywających alkohol obserwuje się obniżoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej w wątrobie [60], zmniejszony poziom zredukowanego glutationu w wątrobie, mózgu [1, 39]. Podczas utleniania etanolu przez cytochromy może się również tworzyć rodnik 1-hydroksyetylowy [14].

Obecność ADH, XOR i AOX stwierdza się w wątrobie, trzustce, gruczole piersiowym oraz w błonie śluzowej żołądka i jelita grubego [12, 23, 28, 33, 58]. Aldehyd octowy i NADH, produkty reakcji przeprowadzanej przez ADH, stanowią jednocześnie substraty dla oksydaz (ryc. 1). Produkty jedno- i dwuelektronowej redukcji tlenu,  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ , powstałe w wyniku aktywności XOR i AOX są przekształcane w obecności żelaza w  $\cdot OH$ . Przewlekła ekspozycja na etanol indukuje ekspresję genów kodujących ADH klasy I oraz XOR. Geny te są regulowane w sposób skoordynowany z uwagi na obecność w promotorach miejsc rozpoznawanych przez te same czynniki transkrypcyjne [58].

Ostatnio zwraca się również uwagę na rolę oksydazy NADPH w produkcji wolnych rodników. Enzym ten jest związany z błoną komórkową fagocytów: tkankowych makrofagów (komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego) i granulocytów obojętnochłonnych. Komórki te po wchłonięciu bakterii w wyniku endocytozy uwalniają zawartość ziarnistości do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz wydzielają toksyczne rodniki tlenowe wytwarzane przez oksydazę NADPH. Zwiększenie produkcji wolnych rodników przez tą oksydazę jest konsekwencją przyspieszenia metabolizmu fagocytów. Granulocyty obojętnochłonne i makrofagi tkankowe wątroby (komórki Kupffera) odgrywają rolę w powstawaniu zmian strukturalnych wątroby obserwowanych u alkoholików: etanol przyczynia się do zwiększonego wytwarzania rodników tlenowych przez oksydazę NADPH [21, 22].

Wolne rodniki powodują uszkodzenia oksydacyjne DNA [2], peroksydację lipidów [1, 28, 39], powstanie produktów utlenienia białek [3] oraz przyczyniają się do obniżenia poziomu GSH [39]. Szczególnie istotne w procesach mutagenyzy i karcynogenyzy są uszkodzenia DNA i produkty peroksydacji lipidów. Peroksydacja lipidów zachodzi w wyniku ataku wolnych rodników na nienasycone kwasy tłuszczowe. Głównym produktem peroksydacji lipidów jest aldehyd dimalonowy. Może on oddziaływać z grupami aminowymi zasad azotowych DNA, w wyniku czego powstają addukty cykliczne [59]. Nagromadzenie się w komórce utlenionych białek powoduje zmniejszenie aktywności proteasomów 26S i 20S uczestniczących w proteolizie ubikwitynozależnej białek. Hamowania aktywności proteasomów nie zaobserwowano u myszy pozbawionych CYP 2E1 [3].



RYCINA 3. Hipotetyczny mechanizm tworzenia wiązań krzyżowych przez aldehyd octowy



### 3.3. Genotoksyczność aldehydu octowego

Toksyczność aldehydu octowego jest spowodowana tworzeniem się adduktów z grupami aminowymi białek i DNA [35, 53] oraz zmniejszaniem poziomu zredukowanego glutationu [15]. Konsekwencją powstawania adduktów aldehydu z białkami jest zmniejszenie wydajności naprawy DNA [13], hamowanie aktywności szeregu enzymów komórkowych, zmniejszenie zdolności wątroby do wykorzystania tlenu [25].

Aldehyd octowy powoduje powstanie monoadduktów i międzyniciowych wiązań krzyżowych w DNA [5, 6, 15]. Hipotetyczny mechanizm tworzenia się monoadduktów i międzyniciowych wiązań krzyżowych przedstawiono na rycinie 3. Aldehyd octowy początkowo oddziałuje z grupami aminowymi guaniny, adeniny lub cytozyny, w wyniku czego powstają zasady Schiffa. Podwójne wiązanie zasad Schiffa może zostać zredukowane przez askorbinian lub zredukowany glutation z wytworzeniem adduktów zawierających grupę etylową [53]. W przeciwnym wypadku możliwa jest reakcja atomów tworzących nienasycone wiązanie z inną pozycją w DNA z wytworzeniem wiązania krzyżowego. W tworzeniu wiązań krzyżowych mogą uczestniczyć również białka (ryc. 3). Costa i wsp. [11] donieśli o zdolności aldehydu do tworzenia adduktów DNA-białko. Niewykluczone, że białka poza tworzeniem monoadduktów uczestniczą także przy udziale aldehydu octowego w tworzeniu wiązań krzyżowych w DNA.

Wiązania krzyżowe indukowane przez aldehyd octowy mogą tworzyć się także w obrębie jednej nici. Dowodów potwierdzających tę hipotezę dostarczyła analiza mutacji indukowanych przez aldehyd octowy. Mutacją, która występuje w największej ilości, jest podstawienie GG→TT; powstaje ona w wyniku błędnego wstawienia do nici syntetyzowanej przez polimerazę DNA nukleotydów adeninowych w miejscach, naprzeciw których na matrycy znajdują się dwie guaniny sprzężone za pośrednictwem międzyniciowego wiązania krzyżowego [29].

W naprawę monoadduktów i wiązań krzyżowych wewnątrznicowych wywołanych przez aldehyd octowy zaangażowany jest system naprawy przez wycinanie nukleotydów z uwagi na to, że uszkodzenia te są rozpoznawane przez XPA, białko inicjujące działanie tego systemu naprawczego. U chorych na *xeroderma pigmentosum* stwierdza się zaburzenie usuwania adduktów utworzonych przez aldehyd octowy [29]. Do naprawy wiązań krzyżowych międzyniciowych niezbędny jest system naprawy DNA przez rekombinację homologiczną [49, 50].

Aldehyd octowy może tworzyć addukty z grupami aminowymi białek. W wątrobie addukty takie tworzą się głównie w tych regionach cytoplazmy, w których stwierdza się aktywność CYP 2E1 [19, 35]. Jednym z ważniejszych skutków wynikających z tworzenia się adduktów aldehydu z białkami jest obniżenie wydajności usuwania z DNA alkilowanych zasad spowodowane hamowaniem systemów naprawy DNA przez wycinanie [48] oraz metylotransferazy *O*<sup>6</sup>-metyloguanina-DNA (MGMT) [8,

15, 56]. Białko MGMT jest monomerem katalizującym reakcję przeniesienia grupy alkilowej z atomu O<sup>6</sup> guaniny DNA na cysteinę wchodzącą w skład tego białka, w wyniku czego ulega ono nieodwracalnej dezaktywacji.

### 3.4. Niedobory składników pokarmowych a procesy karcynogenezy

U alkoholików występują często niedobory witamin i mikroelementów w związku z jedzeniem mniejszych ilości pełnowartościowego pokarmu. Ponadto u osób nadużywających alkoholu następuje zmniejszenie stężenia witamin charakteryzujących się właściwościami antyoksydacyjnymi, a także witaminy A i B<sub>6</sub> również za pośrednictwem innych mechanizmów. Przyspieszony rozkład witaminy A związany jest z utlenianiem jej pochodnej kwasu retinowego do kwasów 18-hydroksyretinowego i 4-oksoretinowego przez CYP 2E1 [26]. Z kolei rozkład witaminy B<sub>6</sub> spowodowany jest stymulowaniem hydrolizy fosforanu pirydoksalu i pirydoksaminy przez aldehyd octowy.

Niedobór cynku, selenu oraz witamin A, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> i E powoduje zwiększone ryzyko choroby nowotworowej [10]. Zwiększona częstość nowotworów u alkoholików może być spowodowana osłabieniem mechanizmów antyoksydacyjnych (niedobór witaminy E, cynku, selenu), zmniejszonym współzawodnictwem retinolu z ksenobiotykami, np. nitrozoaminami, o centrum aktywne CYP 2E1 (niedobór β-karotenu i witaminy A), ale również zmniejszonym wytwarzaniem przeciwciał (niedobór witaminy B<sub>6</sub>). Ostatnia z konsekwencji niedoboru składników pokarmowych może wpływać np. na częstość nowotworów wątroby związanych z zakażeniami HBV i HCV.

### 3.5. Indukcja nowotworów przez etanol w narządach układu pokarmowego

Etanol w dużych stężeniach powoduje uszkodzenie błony śluzowej żołądka i jelita. Pojawienie się takiego uszkodzenia może stymulować komórki nabłonka do podziałów. Etanol może także przyczyniać się do zwiększonej proliferacji komórek rozrodczych nabłonka przełyku szczurów przy braku widocznych uszkodzeń błony śluzowej [27]. Stymulacja proliferacji komórek powoduje zwiększenie ich wrażliwości na działanie aldehydu octowego oraz innych karcynogenów chemicznych.

W Europie i Ameryce Północnej występowanie raków pierwotnych wątroby u osób nadużywających alkoholu związane jest przyczynowo z marskością wątroby. Niektórymi z przyczyn marskości wątroby może być stres oksydacyjny oraz spowodowane przez etanol zmiany w metabolizmie kolagenu i niedobory składników pokarmowych. Dużą rolę przypisuje się komórkom Kupffera i granulocytom obojętnochłonnym, które pod wpływem etanolu wytwarzają nie tylko wolne rodniki, ale także czynnik martwicy nowotworów TNF-α, który jest silnym mediatorem stanów zapalnych [21, 22, 24, 47, 52]. Ponadto wskazuje się na to, że w przypadku



osób uzależnionych od alkoholu i jednocześnie cierpiących z powodu niektórych chorób wirusowych wątroby następuje szybszy rozwój marskości i nowotworów wątroby [46].

#### 4. UWAGI KOŃCOWE

Alkohol etylowy jest komutagenem i kokarcynogenem ze względu na zdolność do indukcji układów mikrosomalnych uczestniczących w I fazie metabolizmu ksenobiotyków oraz na toksyczne produkty, wolne rodniki i aldehyd octowy, powstające podczas jego metabolizmu i powodujące uszkodzenia DNA. W związku z tym, że enzymy związane z metabolizmem etanolu odgrywają tak dużą rolę w genotoksyczności alkoholu etylowego, należy ustalić, od jakich czynników genetycznych i środowiskowych zależy ich aktywność oraz określić zależność pomiędzy aktywnością tych enzymów, spożyciem alkoholu i ryzykiem choroby nowotworowej.

ADH i XOR przekształcają etanol do kwasu octowego w wyniku dwuetapowej reakcji (ryc. 1). Klasa I genów ADH (*ADH1*, *ADH2*, *ADH3*) jest indukowana na poziomie transkrypcji przez przewlekłe spożywanie etanolu. Stwierdzono, że promotory genów kodujących dehydrogenazę alkoholową należącą do klasy I oraz oksydazę ksantynową zawierają sekwencje rozpoznawane przez takie czynniki transkrypcyjne, jak: C/EBP, USF, Sp1, NF1 i HNF [58]. Niewykluczone jest zatem, że ekspresja tych genów może być regulowana za pomocą tych samych mechanizmów i że aktywność XOR może być również indukowana przez etanol.

Obecność miejsc polimorficznych w genach kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie etanolu może odgrywać dużą rolę w zróżnicowanej podatności na choroby nowotworowe w populacji ludzkiej. W genie *CYP2E1* występuje co najmniej 6 miejsc polimorficznych: <sup>-1259</sup>*CYP2E1* G/C, <sup>-1019</sup>*CYP2E1* C/T, <sup>1017</sup>*CYP2E1* A/G, <sup>1113</sup>*CYP2E1* A/C, <sup>1168</sup>*CYP2E1* G/A, <sup>10059</sup>*CYP2E1* G/A [57]. Dla polimorfizmu <sup>-1259</sup>*CYP2E1* G/C stwierdzono, że allel <sup>-1259</sup>*CYP2E1* G jest szybciej transkrybowany *in vitro* w porównaniu z allelem <sup>-1259</sup>*CYP2E1* C. Podobny efekt został zaobserwowany u ludzi również *in vivo*: u heterozygot stwierdzono w limfocytach krwi obwodowej około 2 razy większy poziom mRNA w porównaniu z homozygotami zawierającymi 2 allele <sup>-1259</sup>*CYP2E1* G [55]. Wydaje się, że najważniejszym ze względu na znaczenie w genotoksyczności etanolu jest aldehyd octowy. Uważa się, że szczególnie wysokie ryzyko wystąpienia nowotworów jamy ustnej, gardła, przełyku i krtani może być związane z obecnością aldehydu octowego. Niewykluczone, że znaczącą rolę w produkcji aldehydu poza mikroflorą zasiedlającą błonę śluzową tych narządów mają również ADH i cytochromy komórek błony śluzowej. Zagadnieniem do tej pory nierozstrzygniętym jest zależność pomiędzy rodzajem polimorfizmu genów kodujących te enzymy i częstością nowotworów wspomnianych narządów. Zagadnienia związane z regulacją ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie etanolu nie wyczerpują złożoności

problemu. Aldehyd octowy poza zdolnością do tworzenia monoadduktów oraz wiązań krzyżowych może również hamować usuwanie niektórych uszkodzeń DNA. Aldehyd ten hamuje aktywność MGMT. Wiadomo również, że może on wpływać na inne systemy naprawy DNA, brak jednak szczegółowych danych na ten temat.

### Podziękowania

Praca wykonana przy wsparciu Komitetu Badań Naukowych granty nr 0592/P05/99/17 i 4 P05B 079 17.

## LITERATURA

- [1] AGAR E, DEMIR S, AMANVERMEZ R, BOSNAK M, AYYILDIZ M, CELIK C. The chances in lipid peroxidation and GSH levels in the cerebellum of rats induced by ethanol consumption are prevented by vitamin E. *Neurosci Res Commun* 2000; **27**: 191–197.
- [2] ASAMI S, HIRANO T, YAMAGUCHI R, TSURUDOME Y, ITOH H, KASAI H. Increase in 8-hydroxyguanine and its repair activity in the esophagi of rats given long-term ethanol and nutrition-deficient diet. *Jpn J Cancer Res* 2000; **91**: 973–978.
- [3] BARDAGGORCE F, YUAN QX, LI J, FRENCH BA, FANG C, INGELMANSUNDBERG M, FRENCH SW. The effect of ethanol-induced cytochrome p4502E1 on the inhibition of proteasome activity by alcohol. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 23–29.
- [4] BATTISTON L, MORETTI M, TULISSI P, MICHELI L, MARCHI P, MOZZORAN L, LUNAZZI G, POZZATO G. Hepatic glutathione determination after chronic administration in rat: evidence of the first-pass metabolism of ethanol. *Life Sci* 1995; **56**: 241–248.
- [5] BŁASIAK J, GŁOC-FUDAŁA E, TRZECIAK A. DNA crosslinks formation by acetaldehyde. *Neoplasma* 1999; **46 Suppl**: 59–60.
- [6] BŁASIAK J, TRZECIAK A, MAŁECKA-PANAS E, DRZEWOŚKI J, WOJEWÓDZKA M. *In vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol in Vitro* 2000; **14**: 287–295.
- [7] BRADFORD BU, ENOMOTO N, IKEJIMA K, ROSE ML, BOJES HK, FORMAN DT, THURMAN RG. Peroxisomes are involved in the swift increase in alcohol metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **288**: 254–259.
- [8] CHHABRA SK, SOULIOTIS VL, KYRTOPOULOS SA, ANDERSON LM. Nitrosamines, alcohol, and gastrointestinal tract cancer: recent epidemiology and experimentation. *In Vivo* 1996; **10**: 265–284.
- [9] CINTI DL, GRUNDIN R, ORRENIUS S. The effect of ethanol on drug oxidations *in vitro* and the significance of ethanol-cytochrome P-450 interaction. *Biochem J* 1973; **134**: 367–375.
- [10] CLS (Commission on Life Sciences). Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk. Washington, DC, USA: National Academy Press 1989: 431–464 (Alcohol).
- [11] COSTA M, ZHITKOVICH A, HARRIS M, PAUSTENBACH D, GARGAS M. DNA-protein cross-links produced by various chemicals in cultured human lymphoma cells. *J Toxicol Environ Health* 1997; **50**: 433–449.
- [12] ENGELHAND K, MARET W. Extrahepatic, differential expression of four classes of human alcohol dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **193**: 47–53.
- [13] ESPINA N, LIMA V, LIEBER CS, GARO AJ. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O<sup>6</sup>-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* 1988; **9**: 761–766.



- [14] GOMEZ MID, CASTRO GD, DELAYNO AMAD, COSTANTINI MH, CASTRO JA. Cytochrome P450 reductase-mediated anaerobic biotransformation of ethanol to 1-hydroxyethyl-free radicals and acetaldehyde. *Toxicol* 2000 **154**: 113–122.
- [15] GRAFSTROM RC, DYPBUKT JM, SUNDQVIST K, ATZORI L, NIELSEN I, CURREN RD, HARRIS CC. Pathobiological effects of acetaldehyde in cultured human epithelial cells and fibroblasts. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 985–990.
- [16] HAKKAK R, KOROURIOAN S, RONIS MJJ, INGELMAN-SUNDBERGM, BAGDER TM. Effect of diet and ethanol on the expression and localization of cytochromes P4502E1 and P4502C7. *Biochem Pharmac* 1996; **51**: 61–69.
- [17] HASUMURA Y, TESCHKE R, LIEBER CS. Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): dissociation from reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase and possible role of form 1 of cytochrome P-450. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; **194**: 469–474.
- [18] HOLMBERG L, BARON JA, BYERS T, WOLK A, OHLANDER EM, ZACK M, ADAMI HO. Alcohol intake and breast cancer risk: effect of exposure from 15 years of age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 843–847.
- [19] JEONG KS, SOH Y, JENG J, FELDER MR, HARDWICK JP, SONG BJ. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)-dependent production of a 37-kDa acetaldehyde-protein adduct in the rat liver. *Arch Biochem Biophys* 2000; **384**: 81–87.
- [20] KOIVISTO T, SALASPURO M. Acetaldehyde alters proliferation, differentiation and adhesion properties of human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 2031–2036.
- [21] KONO H, BRADFORD BU, RUSYN I, FUJII H, MATSUMOTO Y, YIN M, THURMAN RG. Development of an intragastric enteral model in the mouse: studies of alcohol-induced liver disease using knockout technology. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; **7**: 395–400.
- [22] KONO H, RUSYN I, UESUGI T, YAMASHINA S, CONNOR HD, DIKALOVA A, MASON RP, THURMAN RG. Diphenyleneiodonium sulfate, an NADPH oxidase inhibitor, prevents early alcohol-induced liver injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; **280**: G1005–G1012.
- [23] LIEBER CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 1997; **257**: 59–84.
- [24] LIEBER CS. Liver diseases by alcohol and hepatitis C: early detection and new insights in pathogenesis lead to improved treatment. *Am J Addict* 2001; **10 Suppl**: 29–50.
- [25] LIEBER CS, BARAONA E, HERNANDEZ-MUNOZ R, KUBOTA S, SATO N, KAWANO S, MATSUMURA T, INATOMI N. Impaired oxygen utilization: a new mechanism for the hepatotoxicity of ethanol in sub-human primates. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1682–1690.
- [26] LIU C, RUSSELL RM, SEITZ HK, WANG XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology* 2001; **120**: 179–189.
- [27] MAK KM, LEO MA, LIEBER CS. Effect of ethanol and vitamin A deficiency on epithelial cell proliferation and structure in the rat esophagus. *Gastroenterology* 1987; **93**: 362–370.
- [28] MAROTTA F, TAJIRI H, SAFRAN P, FESCE E, IDEO G. Ethanol-related gastric mucosal damage: evidence of a free radical-mediated mechanism and beneficial effect of oral supplementation with bionormalizer, a novel natural antioxidant. *Digestion* 1999; **60**: 538–543.
- [29] MATSUDA T, KAWANISHI M, YAGI T, MATSUI S, TAKEBE H. Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to intra-strand crosslinks between adjacent guanine bases. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 1769–1774.
- [30] MATUZ J. Role of mucus in mucosal protection through ethanol and pepsin damage models. *Acta Physiol Hung* 1992; **80**: 189–194.
- [31] McMANAMAN JL, NEVILLE MC, WRIGHT RM. Mouse mammary gland xanthine oxidoreductase: purification, characterization, and regulation. *Arch Biochem Biophys* 1999; **371**: 308–316.

- [32] MIWA GT, LEVIN W, THOMAS PE, LU AYH. The direct oxidation of ethanol by catalase- and alcohol dehydrogenase-free reconstituted system containing cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* 1978; **163**: 464–475.
- [33] MURTHY S, HUI-QI Q, SAKAI T, DEPACE DE, FONDACARO JD. Ischemia/reperfusion injury in the rat colon. *Inflammation* 1997; **21**: 173–190.
- [34] NAVASURMUT P, WARD TH, DODD NJF, OCONNOR PJ. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effect of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 93–99.
- [35] NIEMELA O, PARKKILA S, JUVONEN RO, VIITALA K, GELBOIN HV, PASANEN M. Cytochromes P450 2A6 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000; **33**: 893–901.
- [36] NOSOVA T, JOUSIMIESSOMER H, JOKELAINEN K, HEINE R, SALASPURO M. Acetaldehyde production and metabolism by human indigenous and probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Alcohol. Alcoholism* 2000; **35**: 561–568.
- [37] PHILLIPS BJ, JENKINSON P. Is ethanol genotoxic? A review of the published data. *Mutagenesis* 2001; **16**: 91–101.
- [38] RAUCY JL, SCHULTZ ED, WESTER MR, ARORA S, JOHNSTON DE, OMDAHL JL, CARPENTER SP. Human lymphocyte P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity. *Drug Metab Dispos* 1997; **25**: 1429–1435.
- [39] ROIG R, CASCON E, AROLA L, BLADE C, SALVADO MJ. Effects of chronic wine and alcohol intake on glutathione and malondialdehyde levels in rats. *Nutr Res* 2000; **20**: 1547–1555.
- [40] SEITZ HK, PÖSCHL G, SIMANOWSKI UA. Alcohol and cancer. [w] Galanter [red.] Recent Development in Alcoholism, **14**: The Consequences of Alcoholism. New York, USA: Plenum Press 1998: 67–95.
- [41] SEITZ HK, SIMANOWSKI UA. Alcohol and carcinogenesis. *Annu Rev Nutr* 1988; **8**: 99–119.
- [42] SHAW S, JAYATILLEKE E. The role of cellular oxidases and catalytic iron in the pathogenesis of ethanol induced liver injury. *Life Sci* 1992; **50**: 2045–2052.
- [43] SIGVARDSSON S, HARDELL L, PRZYBECK TR, CLONINGER R. Increased cancer risk among Swedish female alcoholics. *Epidemiology* 1996; **7**: 140–143.
- [44] SMITH-WARNER SA, SPIEGELMANN D, YAUN SS, BRANDT PA, FOLSOM AR, GOLDBOHM RA, GRAHAM S, HOLMBERG L, HOWE GR, MARSHALL JR, MILLER AB, POTTER JD, SPEIZER FE, WILLETT WC, WOLK A, HUNTER DJ. Alcohol and breast cancer in women. *J Amer Med Assoc* 1998; **279**: 535–540.
- [45] SZE PY. The permissive effect of glucocorticoids in the induction of liver alcohol dehydrogenase by ethanol. *Biochem Med* 1975; **14**: 156–161.
- [46] TANAKA T, YABUSAKO T, YAMASHITA T, KONDO K, NISHIGUCHI S, KUROKI T, MONNA T. Contribution of hepatitis C virus to the progression of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; **24**: 112S–116S.
- [47] THURMAN RG. Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Can J Gastroenterol* 2000; **14 Suppl D**: 129D–135D.
- [48] TOPINKA J, BINKOVA B, SRAM RJ, FOJTIKOVA I. DNA-repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics. *Mutat Res* 1991 **263**: 133–136.
- [49] TRZECIAK A, BŁASIAK J. Naprawa DNA w komórkach ssaków. *Post Biol Komórki* 1999; **26**: 707–729.
- [50] TRZECIAK A, BŁASIAK J. Naprawa DNA w komórkach ssaków: mechanizm rekombinacji homologicznej. *Post Bioch* 2001, **47**: 37–50.
- [51] TSUTSUMI M, LASKER JM, SHIMIZU M, ROSMAN AS, LIEBER CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatol* 1989; **10**: 437–446.
- [52] TUYNS AJ. Alcohol. [w] Schottenfeld D, Fraumeni JF, Jr [red.] Cancer Epidemiology and Prevention. Philadelphia, USA: WB Saunders 1982: 293–303.



- [53] VACA CE, FANG JL, SCHWEDA EKH. Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chem Biol Interact* 1995; **98**: 51–67.
- [54] VISAPÄÄ J-P, JOKELAINEN K, NOSOVA T, SALASPURO M. Inhibition of intracolonic acetaldehyde production and alcohol fermentation in rats by ciprofloxacin. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; **22**: 1161–1164.
- [55] WATANABE J, HAYASHI S-I, KAWAJIRI K. Different regulation and expression of the human *CYP2E1* gene due to the *Rsa* I polymorphism in the 5-flanking region. *J Biochem* 1994; **116**: 321.
- [56] WILSON DM 3rd, TENTLER JJ, CARNEY JP, WILSON TM, KELLEY MR. Acute ethanol exposure suppresses the repair of *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA lesions in castrated adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; **18**: 1267–1271.
- [57] WORMHOUDT LW, COMMANDEUR JNM, NICO PE. Genetic polymorphisms of human *N*-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-*S*-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critic Rev Toxicol* 1999; **29**: 59–124.
- [58] WRIGHT RM, McMANAMAN JL, REPINE JE. Alcohol-induced breast cancer: a proposed mechanism. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**: 348–354.
- [59] YI P, SUN X, DOERGE DR, FU PP. An improved <sup>32</sup>P-Postlabeling/High-performance liquid chromatography method for the analysis of the malondialdehyde-derived 1,*N*<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine DNA adduct in animal and human tissues. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**: 1032–1041.
- [60] ZIMA T, FIALOVA L, MESTEK O, JANEBOVA M, CRKOVSKA J, MALBOHAN I, STIPEK S, MIKULIKOVA L, POPOV P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci* 2001; **8**: 59–70.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.06.2001 r.

Przyjęto: 24.08.2001 r.

Adres autorów: Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki,

ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź;

e-mail: antrzeciak@wp.pl





## WYMIAR FRAKTALNY W MORFOLOGII NOWOTWORÓW

### FRACTAL DIMENSION IN MORPHOLOGY OF NEOPLASMAS

Wojciech KUŹNIAK\*, Jacek Rafał JABŁOŃSKI\*, Edward OCZERETKO\*,  
Irena KASACKA\*\*

Instytut Informatyki Uniwersytetu w Białymstoku\* ;  
Zakład Klinicznej Biologii Molekularnej i Zakład Histologii i Embriologii  
Akademii Medycznej w Białymstoku\*\*

*Streszczenie:* W niniejszej pracy przedstawiliśmy wybrane aspekty dotychczasowych badań nad możliwością zastosowania w badaniu nowotworów nowej rozwiniętej w ostatnich latach gałęzi nauki – geometrii fraktalnej. Powstało wiele definicji fraktala. Twórca geometrii fraktalnej B. Mandelbrot terminem tym określał figury geometryczne występujące w naturze (różne od figur geometrii euklidesowej). Wyróżnia się dwa rodzaje fraktali – niestochastyczne (nie spotykane w naturze) i stochastyczne występujące powszechnie w przyrodzie. Figury fraktalne w skutek ich dużej złożoności wypełniają przestrzeń w stopniu innym niż figury geometrii euklidesowej. Stopień, w jakim dana figura wypełnia przestrzeń, jest określany przez wymiar fraktalny, który jest najważniejszym parametrem charakteryzującym fraktalność figury. Wymiar fraktalny ocenia się za pomocą różnych metod. Najczęściej używanymi są cyrklowa i pudełkowa. Używa się też metod: probabilistycznej, pole-obwód, skalowania masy i innych. Wymiar fraktalny określa się za pomocą programów komputerowych, które dokonują pomiaru na odpowiednio przetworzonych (zdigitalizowanych) obrazach badanych struktur. Z punktu widzenia teorii chaosu deterministycznego fraktale powstają w wyniku procesów chaodynamicznych. Jednym z procesów zdających poddawać się prawom chaosu deterministycznego jest karcynogeneza. Pojawia się więc pytanie, czy opisane matematyczne metody mogą być wykorzystane do oceny obrazów mikroskopowych nowotworów. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki różnorodnych badań dotyczących zarówno tworzenia matematycznych modeli wzrostu nowotworów, materiału pobranego z tkanek nowotworowych, eksperymentalnych badań nad komórkami nowotworowymi, jak i badań nad rozwojem nowotworów przeprowadzonych *in vivo*\* prowadzą do wniosku, iż określanie wymiaru fraktalnego może stać się wartościową metodą wspomagającą diagnostykę nowotworów. Wymiar fraktalny charakteryzuje badany obiekt, nie zawsze jednak wystarczy do jednoznacznej identyfikacji. Być może znajdzie zastosowanie w ocenie stopnia zaawansowania nowotworów.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 561–570)

*Słowa kluczowe:* fraktal, wymiar fraktalny, nowotwór.

*Summary:* In this work we presented selected aspects of existing results of investigations on possibility of use of new, developed in last years, branch of science – fractal-geometry, in investigation of neoplasms. Many definitions of fractal came into being. Discoverer of fractal geometry – Mandelbrot with this term characterized geometrical figures occurring out in nature (different from figures of Euclidean geometry). Two kinds fractal are distinguished – nonstochastic (not existing in nature) and stochastic appearing universally in nature. Fractal figures, due to their large complexity, fill space in greater degree than figures of Euclidean geometry. Degree in which figure given fills space, is qualified by fractal dimension, which is most important parameter characterizing fractality of figures. Fractal dimension is estimated by means of variable methods. The most often used are yard-stick method and box-counting method. Following methods: probabilistic, circumference-area, mass scaling and others, are also in use. Fractal dimension measurement is realized by computer programs, which perform measurement on properly converted (digitalized) images of examined structures. From the theory of deterministic chaos point of view, fractals are generated as result of chaotic processes. One of processes, that seem to obey laws of deterministic chaos, is carcinogenesis. The question, whether described mathematical methods can be used to estimate microscopic images of neoplasms, appears. Presented in this work results of variable researches concerning creations of mathematical models of neoplasms, investigations of material received from neoplasm tissues as well as of neoplasia growth *in vivo* or of experiments on neoplasm cells, lead to conclusion, that quantifying of fractal dimension, can perhaps become valuable method helpful in diagnostics of neoplasms. Fractal dimension characterizes examined object, however not always will suffice to its unambiguous identification. Possibly it can serve in tumor grading assessment. (*Advances in Cell Biology* 2001; 28: 561–570)

*Keywords:* fractal, fractal dimension, neoplasma.

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień o potencjalnych zastosowaniach teorii chaosu i geometrii fraktalnej w naukach przyrodniczych, w tym także w medycynie [1,7,8,13].

W niniejszej pracy pragniemy przedstawić wybrane aspekty dotychczasowych badań nad możliwością zastosowania geometrii fraktalnej w badaniu nowotworów.

Do momentu rozwinięcia się, po publikacjach Benoita Mandelbrota [9] w latach siedemdziesiątych XX wieku, nowej dziedziny matematyki – geometrii fraktalnej, złożone figury geometryczne występujące w przyrodzie opisywano wyłącznie w odniesieniu do wyidealizowanych wzorców geometrii euklidesowej, takich jak: prosta, kwadrat czy kula [16,17, 24]. Uzyskiwane w ten sposób wyniki były niewystarczające, nie oddawały bowiem adekwatnie rzeczywistej złożoności form badanych obiektów. Obecnie wydaje się, że geometria fraktalna jest lepszym narzędziem matematycznego opisu wysoce skomplikowanych i nieregularnych kształtów przyrody. Powstało wiele definicji fraktala. Twórca geometrii fraktalnej B. Mandelbrot wprowadził ten termin dla określenia figur geometrycznych przypominających kształty znajdujące w naturze [9]. Rozróżnia się dwa rodzaje fraktali: niestochastyczne (nieprzypadkowe) i stochastyczne (przypadkowe) [23]. Fraktale niestochastyczne to abstrakcyjne figury o nieskończonej złożonej budowie. Powstają one w przebiegu nieustannego powtarzania określonego z góry algorytmu (gdzie każdorazowo uzyskiwany wynik staje się wartością początkową dla ponownego



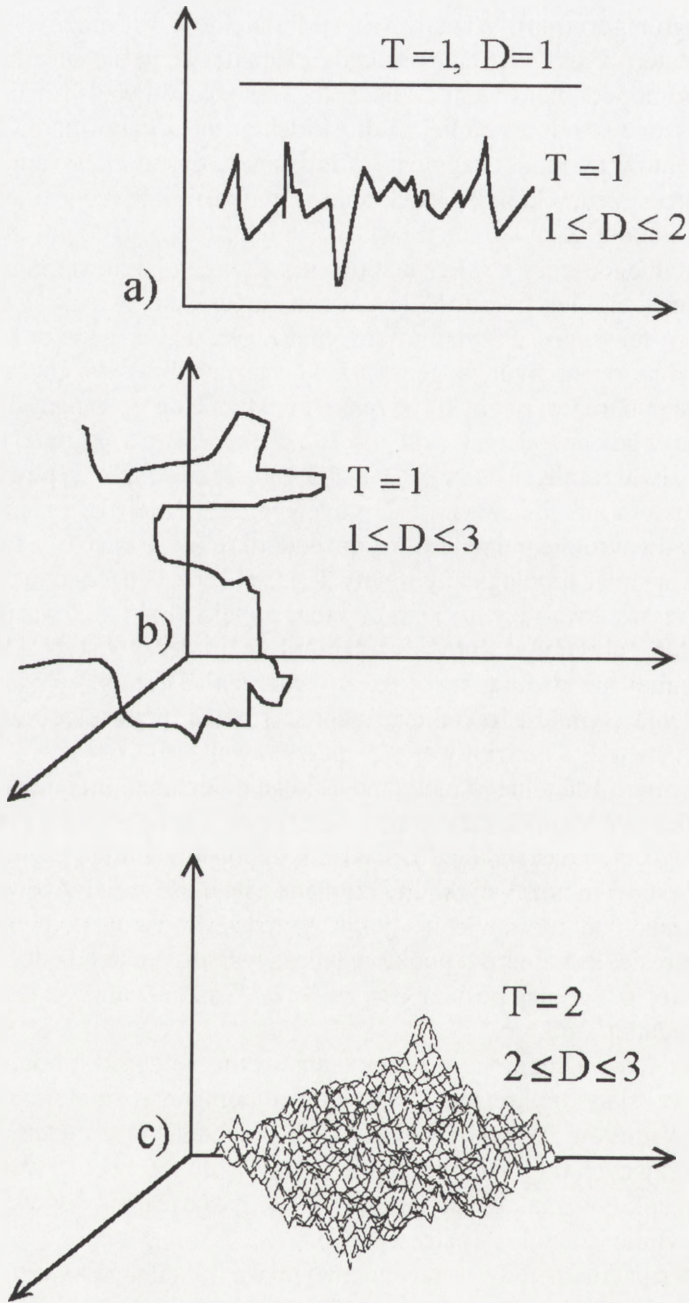
wykonania tego algorytmu). Wizualizacja tych obiektów jest możliwa przy użyciu technik komputerowych [9,16,17]. Fraktale charakteryzują się niezmienniczością wobec skali i samopodobieństwem. Oznacza to, że można w nich wyróżnić fragmenty, które powiększone w odpowiedniej skali są identyczne z całą figurą, a w każdym z tych fragmentów następne fragmenty o tej samej własności. W ten sposób wypełniają one przestrzeń, w której są zanurzone, w innym niż klasyczne figury geometrii euklidesowej stopniu. Zauważenie tej własności doprowadziło do powstania pojęcia wymiaru fraktalnego, który jest liczbą mówiącą o tym, w jakim stopniu dana figura wypełnia przestrzeń. Jego wartość jest różna (najczęściej większa) od wymiaru topologicznego tej figury. Przypomnijmy (patrz ryc. 1), że wymiar topologiczny [16] to narzędzie opisu figur w geometrii klasycznej. Stanowi go zawsze liczba całkowita. Dla punktu jest równy 0 (wymiar punktu nie da się zmienić), dla struktur liniowych 1 (gdyż gdy np. odcinek o długości  $a$  zwiększymy dwukrotnie, jego długość wzrośnie też dwukrotnie, a więc o  $2^1$ ), dla figur zawartych w powierzchni nie będących punktem ani linią wynosi 2 (gdy wymiary takiej figury, np. kwadratu, powiększymy dwukrotnie, jej pole wzrośnie czterokrotnie, a więc  $2^2$ ), figury mające grubość mają wymiar topologiczny równy 3 (jeżeli bok będącego taką figurą sześciangu zwiększymy dwa razy, to jego objętość zwiększy się o  $2^3$  raza). Natomiast wymiar fraktalny przyjmuje wartości ze zbioru liczb rzeczywistych [16]. Pozwala więc precyzyjniej niż wymiar topologiczny rozróżniać figury.

Dla określenia wymiaru fraktalnego danego fraktala używa się między innymi następujących metod: 1) cyrklowej i 2) pudełkowej [16].

Pomiar wymiaru fraktalnego metodą cyrklową polega na pomiarze długości fraktala przez zliczenie tego, ile razy można odłożyć na nim za pomocą cyrkla odcinek określonej długości, a następnie na kilkakrotnym powtarzaniu tej czynności z coraz mniejszym rozstawem nóżek cyrkla. Otrzymana zależność zmierzonej w ten sposób długości fraktala od rozstawienia cyrkla, przedstawiona na podwójnie logarytmicznym wykresie, jest zbiorem punktów należących do prostej, będącej wykresem funkcji liniowej o ogólnej postaci  $y = ax + b$ . Współczynnik  $a$  jest wymiarem fraktalnym badanej struktury.

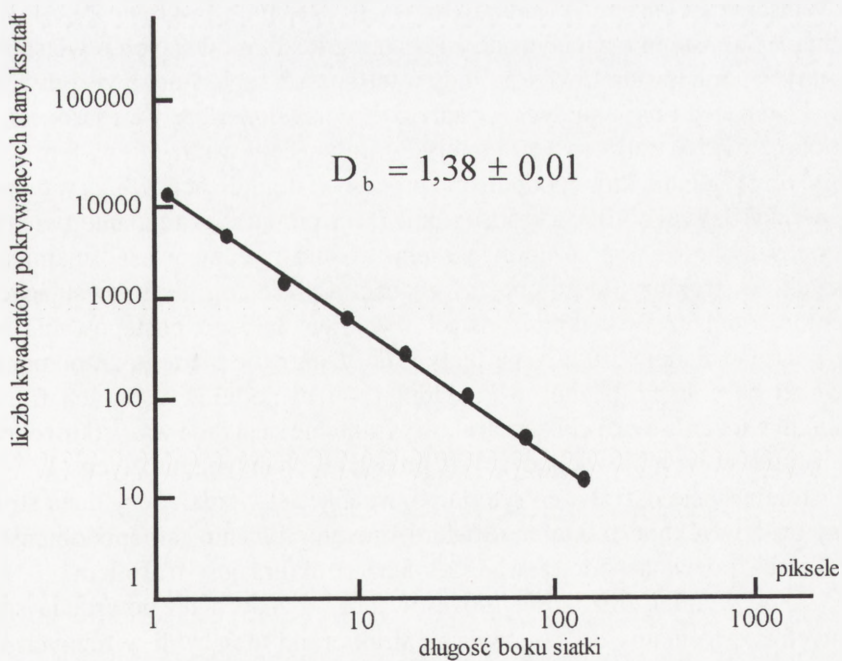
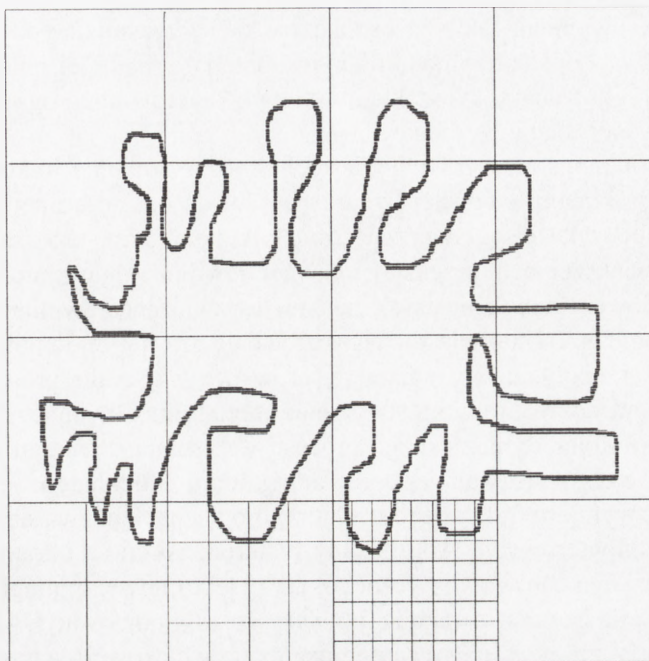
Metoda pudełkowa różni się od poprzedniej tym, że zamiast odcinków używa się kwadratowej siatki o określonej, w kolejnych pomiarach zmniejszającej się długości boku kwadratów. W tym przypadku bada się zależność między liczbą kwadratów, zawierających fragment badanej struktury, a długością boku kwadratu siatki. I w tym przypadku, w analogiczny sposób możemy sporządzić odpowiedni wykres i odczytać wymiar fraktalny (patrz ryc. 2).

Nie są to wszystkie metody szacowania wymiaru fraktalnego kształtów komórek. Używa się także metod: pole – obwód, probabilistycznej, metody skalowania masy i innych [22]. Mnogość algorytmów służących do szacowania wymiaru fraktalnego wynika stąd, że matematycznie ścisła definicja tego wymiaru, definicja Hausdorffa nie nadaje się do praktycznych zastosowań [12].



RYCINA 1. Wymiary topologiczny  $T$  i fraktalny  $D$  wybranych figur geometrycznych: a, b – nie ma znaczenia jak bardzo złożona jest linia, jej wymiar topologiczny wynosi 1, c – wymiar topologiczny powierzchni zawsze wynosi 2; stopień złożoności danego kształtu najlepiej opisuje wymiar fraktalny, który może przybierać wartości niecałkowite mieszczące się w pewnym przedziale





RYCINA 2. Ilustracja obliczania wymiaru fraktalnego za pomocą metody pudełkowej

Podkreślenia wymaga fakt, że niezależnie od używanej metody mierzymy tę samą wielkość i wyniki otrzymane różnymi metodami będą jej mniej lub bardziej dokładnymi przybliżeniami. Niedokładności wynikają również z ograniczonych możliwości używanej aparatury badawczej.

W przyrodzie nie istnieją fraktale niestochastyczne. Obiekty fraktalne spotykane w naturze są fraktalami stochastycznymi [24]. Mają one tę cechę, iż średnia statystyczna jakiejś własności, mierzonej dla kilku obiektów tego samego rodzaju w różnych powiększeniach, przedstawiona na podwójnie logarytmicznym wykresie zmienia się liniowo. Nachylenie uzyskanej linii jest związane z wymiarem fraktalnym.

Przez analogię do fraktali niestochastycznych uważa się, że do powstania fraktali stochastycznych, spotykanych w naturze, prowadzą względnie proste reguły. Wykrycie tych reguł pozwoliłoby na stworzenie metod umożliwiających ingerowanie w przebieg i kierunek dynamicznego procesu wzrastania. Punktem wyjścia w badaniach reguł wzrostu fraktali jest pomiar wymiaru fraktalnego.

Do pomiaru wymiaru fraktalnego struktur biologicznych używa się odpowiednich programów komputerowych. Aby badany materiał, jakim są obrazy uzyskane za pomocą mikroskopu zarówno optycznego, jak i elektronowego, mógł być oceniony z punktu widzenia geometrii fraktalnej, należy go zdigitalizować [16] (zeskanować lub zapisać obraz mikroskopowy za pomocą kamery cyfrowej), a następnie poddać obróbce cyfrowej, która ma na celu uwydatnienie elementów, które chcemy zbadać. Digitalizacja obrazu polega na podzieleniu go na małe kwadratowe fragmenty (piksele). Właściwości każdego kwadratu (barwa, jej natężenie, jaskrawość) są mierzone i uśredniane, a następnie zapisywane jako szereg liczb, mówiących o własnościach przypisanych temu kwadratowi. Powstały w ten sposób zapis umożliwia odtworzenie obrazu składającego się z małych kwadratów o określonej barwie i jasności, które tworzą obraz bardzo zbliżony (im mniejsze i im więcej kwadracików, tym bardziej podobny) do oryginału, który poddaliśmy procesowi digitalizacji. Obraz w tej postaci można poddać dalszej obróbce, która ogólnie rzecz biorąc ma za zadanie zwiększenie przejrzystości obrazu poprzez powiększenie różnic między własnościami pikseli należących do struktury, którą chcemy zbadać, a pikselami nie interesujących nas fragmentów obrazu. W skrajnej postaci wynikiem takiego postępowania będzie czarny kontur badanej struktury na białym tle. Dokonuje się tego za pomocą programów do obróbki graficznej, a dokładniej – ich modułów zwanych filtrami.

Z punktu widzenia teorii chaosu struktury fraktalne są przede wszystkim obrazami powstającymi w wyniku zachodzących procesów chaodynamicznych [17].

Nie istnieją ściśle określone kryteria pozwalające stwierdzić, czy daną strukturę możemy traktować jako fraktalną. Stwierdzone empirycznie samopodobieństwo w wielu skalach pozwala podejrzewać, że dana struktura jest fraktalem.

Ponadto w wyniku złożoności procesów prowadzących do powstania struktur fraktalnych często mamy do czynienia ze strukturami mającymi w różnych swych fragmentach cechy odmiennych fraktali (cechę tę niektórzy nazywają multifraktal-



nością). Ma to niekorzystny wpływ na dokładność pomiaru wymiaru fraktalnego. Należy wówczas wyróżnić fragmenty o różnych stopniach zaawansowania procesu prowadzącego do powstania obiektu fraktalnego i ocenić wymiar fraktalny dla każdej z nich osobno.

Jednym z procesów zdających poddawać się prawom chaosu deterministycznego zagadnień jest karcynogeneza [15]. Pojawia się więc pytanie, czy opisane powyżej matematyczne metody mogą być wykorzystane do obiektywnej morfo- i cytometrycznej oceny obrazów mikroskopowych nowotworów? Problem ten był rozpatrywany przez wielu badaczy. Badano zarówno granice całego guza, układu naczyń guza, grup, jak i pojedynczych komórek, a także wybranych struktur subkomórkowych [4,5,19]. Badania prowadzono zarówno na materiale pochodzącym z guzów [4,5,10,18,21,25], na hodowlach komórek nowotworowych [2,6,11], jak i na teoretycznych modelach symulujących rządzący się prostymi regułami wzrost nowotworów [23]. Modelowano również interakcje między wzrastającym nowotworem a układem immunologicznym, którego działanie również nosi cechy procesu chaodynamicznego [14].

Poniżej postaramy się przedstawić uzyskane rezultaty i opinie na temat przydatności analizy fraktalnej w badaniu nowotworów.

Zacznijemy od symulacji komputerowej matematycznego modelu wzrostu nowotworu przedstawionego przez Smolle'a [23]. W modelu tym wzięto pod uwagę następujące czynniki wpływające na wzrost, a tym samym na obraz mikroskopowy guza: zdolność komórek do zmiany położenia, proliferację guza i zrębu, kohezję oraz autokrynną i parakrynną symulację wzrostu guza. Wymienione cechy w omawianym modelu przedstawione zostały jako liczbowe parametry. Parametry te dają regułę, która iterowana (w opisanym eksperymencie – 5 000 razy) daje obraz bardzo przypominający mikroskopowe obrazy tkanek nowotworowych. Takie symulacje powtórzono dla 10 000 zestawów losowo wybranych parametrów. Zmierzono wymiar fraktalny uzyskanych obrazów, a następnie przeanalizowano statystycznie zależność wymiaru fraktalnego od wartości poszczególnych parametrów. Wyniki wskazują na to, iż istnieją powiązania pomiędzy parametrami, reprezentującymi biologiczne właściwości procesu nowotworowego, a wymiarem fraktalnym obrazów powstałych w wyniku tego procesu toczącego się wg prostych reguł.

Bardziej zaawansowany model matematyczny został stworzony przez S. A. Oprisan i wsp. [14]. Odwzorowuje on proces wzrostu nowotworu jako konkurencję o zasoby pomiędzy nowotworem a układem immunologicznym. Wyniki eksperymentów przeprowadzonych za pomocą tego modelu pozwalają mieć nadzieję, iż za pomocą pomiaru wymiaru fraktalnego (pomiarów multifraktalnych) stanie się możliwe wcześniejsze wychwycenie momentu zezłośliwienia nowotworu na wcześniejszych niż dotychczas stadiach karcynogenezy.

Inny, tym razem biologiczny eksperyment, w którym badano doświadczalnie związek między procesami mającymi wpływ na strukturę komórki a wymiarem

fraktalnym zaprezentowano w pracy Losa i wsp. [6]. W doświadczeniu tym wykazano, że zmiany w chromatynie związanej z błoną jądrową oraz w błonie jądrowej komórek raka piersi (human MCF 7), wywołane działaniem hormonów sterydowych, znajdują odzwierciedlenie w wartościach wymiaru fraktalnego tych struktur. Uzyskane wyniki są charakterystyczne dla danych hormonów.

Również związek wymiaru fraktalnego struktur cytoplazmatycznych z procesami zachodzącymi w komórkach został wykazany eksperymentalnie przez DeMetester i wsp. [2]. Porównali oni wymiar fraktalny obrazu filamentów komórek śródbłonna świńskich tętnic z wymiarem fraktalnym obrazu filamentów takich samych komórek, poddanych działaniu czynników powodujących apoptozę. Okazało się, że różnice wielkości wymiarów fraktalnych w obu grupach komórek są statystycznie znamienne, choć i w tym przypadku autorzy uważają, że samo stwierdzenie zmiany wymiaru fraktalnego nie wystarczy, aby w pełni scharakteryzować zachodzący proces.

W wielu badaniach porównywano wymiar fraktalny różnorodnych struktur tkanek czy też komórek prawidłowych i patologicznych.

Nonnenmacher i wsp. [11] wykazali znamienne statystycznie różnicę między wymiarem fraktalnym konturów prawidłowych limfocytów T a wymiarem fraktalnym konturów komórek białaczki włochatokomórkowej. Ponadto wykazali oni, iż rozkład wymiaru fraktalnego w populacji komórek jest normalny. Autorzy tej pracy uważają, że wymiar fraktalny jako jedyny wykładnik nie opisuje kompletnie kształtu komórki. Mimo to jest on ilościową, różnicującą charakterystyką, która w połączeniu z innymi pomiarami może przyczynić się do lepszego zrozumienia struktur komórkowych i powiązanych z nimi procesów dynamicznych.

Podobną opinię wyraża Sedivy i wsp. [21]. Autorzy ci porównali wymiar fraktalny granic jąder komórek pobranych z różnego stopnia dysplastycznych zmian szyjki macicy. Wykazano znamienne różnicę między wymiarem fraktalnym granic jąder komórek kontrolnych i badanych. Ponadto wykazano, iż wymiar fraktalny zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia dysplazji (ocenianej wg skali CIN). Wykazane różnice między komórkami w poszczególnych stadiach zaawansowania były znamienne statystycznie.

Zależność między wymiarem fraktalnym unaczynienia nowotworu i stopniem jego zaawansowania została zaobserwowana także *in vivo* przez Gazit i wsp. w przypadkach nowotworów u myszy [3]. Co ciekawe zauważyli oni również zmniejszanie się różnicy pomiędzy wymiarem fraktalnym struktur naczyniowych nowotworu i tkanek zdrowych w trakcie regresji guza.

Podobne wyniki uzyskano badając wymiar fraktalny drobnych naczyń raka nerki u ludzi. Okazało się, że wymiar fraktalny mikrokapilar ściśle koreluje z obecnością martwicy tkanek guza – jedynym znanym dotąd niezależnym prognostykiem pięcioletniego przeżycia w raku nerki [8].

Zupełnie inaczej przedstawiają się wyniki pomiaru wymiaru fraktalnego rozkładu komórek przerzutów nowotworu szpiku. Wykazano tu utratę cech fraktalności chara-



teryistycznych dla utkania zdrowego szpiku [10]. O możliwości wykorzystania utraty fraktalności w strukturach nowotworów jako markera złośliwości pisze również w jednym ze swoich artykułów R. Sedivy [20].

Podsumowując należy stwierdzić, że dotychczasowe próby wykorzystania geometrii fraktalnej w analizie morfologicznej nowotworów wykazały, że określanie wymiaru fraktalnego może stać się wartościową metodą wspomagającą diagnostykę nowotworów. Wymiar fraktalny charakteryzuje badany obiekt, nie zawsze jednak wystarczy do jego jednoznacznej identyfikacji. Duże nadzieje pokładane są w możliwości zastosowania geometrii fraktalnej jako metody wspomagającej określanie stopnia zaawansowania przemiany nowotworowej [25].

## LITERATURA

- [1] CROSS SS. Fractals in pathology. *J Pathol* 1997; **182**: 1–8.
- [2] DEMETESTER SL, COBB P, HOTCHKISS RS, OSBORNE DF, KARL IE, TINSLEY W, BUCHMANN TG. Stress-induced fractal rearrangement of the endothelial cell cytoskeleton causes apoptosis. *Surgery* 1998; **124**: 362–371.
- [3] GAZIT Y, BAISH JW, SAFABAKHSH N, LEUNING M, BAXTER LT, JAIN RK. Fractal characteristics of tumor vascular architecture during tumor growth and regression. *Microcirculation* 1997; **4**: 395–402.
- [4] LANDINI G, RIPPIN JW. How important is tumor shape? Quantification of the epithelial connective tissue interface in oral lesions using local connected fractal dimension analysis. *J Pathol* 1996; **179**: 210–217.
- [5] LANDINI G, RIPPIN JW. Quantification of nuclear pleomorphism using an asymptotic fractal model. *Analyt Quant Cytol Histol* 1996; **18**: 167–176.
- [6] LOSA GA, GRABER R, BAUMANN G. Effects of steroid hormones on nuclear membrane and membrane-bound heterochromatin from breast cancer cells evaluated by fractal morphology. *Analyt Quant Cytol Histol* 1999; **21**: 430–436.
- [7] LOSA GA. Fractals in pathology: are they really useful? *Pathologica* 1995; **87**: 310–317.
- [8] LOSA GA, NONNENMACHER TF. Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod Pathol* 1996; **9**: 174–182.
- [9] MANDELBROT B. The Fractal Geometry of Nature. New York: W. H. Freeman & Co., 1982.
- [10] MOATAMED F, SAHIMI M, NAEIM F. Fractal dimension of the bone marrow in metastatic lesions. *Hum Pathol* 1998; **29**(11): 1299–303.
- [11] NONNENMACHER TF, BAUMANN G, BARTH A, LOSA GA. Digital analysis of self-similar cell profiles. *Inter J Bio-Medic Computing* 1994; **37**: 131–138.
- [12] OCZERETKO E, TERESZKIEWICZ A, JURGILEWICZ D. Fractal analysis in medicine. *Polish J Med Phys & Eng* 1999; **5**(17): 109–115.
- [13] OCZERETKO E, ROGOWSKI F, JURGILEWICZ D. Fractal analysis of nuclear medicine scans. [w] LOSA GA, MERLINI D, WEIBEL ER, NONNENMACHER TF [red.] Fractals in Biology and Medicine vol. 2. Birkhäuser 1998: 326–334.
- [14] OPRISAN SA, ARDELEAN A, FRANGOPOL PT. Self-organization and competition in the immune response to cancer invasion: phase-oriented computational model of oncogenesis. *Bioinformatics* 2000 **16**(2): 96–100.
- [15] PANSERA F. Fractals and cancers. *Medical Hypotheses* 1994; **42**: 400.

- [16] PEITGEN H-O, JUERGENS H, SAUPE D. Granice Chaosu. Fraktale część 1. Warszawa: PWN, 1997.
- [17] PEITGEN H-O, JUERGENS H, SAUPE D. Granice Chaosu. Fraktale część 2. Warszawa: PWN, 1996.
- [18] SABOE, BOLTENKO A, SOVA Y, STEIN A, KLEINHAUS S, RESNICK MB. Microscopic analysis and significance of vascular architectural complexity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; **7**: 533–537.
- [19] SEDIVY R. Fractal tumours: their real and virtual images. *Wien Klin Wochenschr* 1996; **108**: 547–551.
- [20] SEDIVY R. Chaodynamic loss of complexity and self similarity in cancer. *Med Hyp* 1999; **52**: 271–274.
- [21] SEDIVY R, WINDISCHBERGER Ch, SVOZIL K, MOSER E, BREITENECKER G. Fractal analysis: an objective method for identifying atypical nuclei in dysplastic lesions of the cervix uteri. *Gyn Oncol* 1999; **75**: 78–83.
- [22] SMITH TG Jr, MARKS WB, LANGE GD, SHERIFF TG Jr, NEALE EA. A fractal analysis of cell images. *J Neurosci Methods* 1989; **27**: 173–180.
- [23] SMOLLE J. Fractal tumor stromal border in a nonequilibrium growth model. *Anal Quant Cytol Histol* 1998; **20**: 7–13.
- [24] STAUFFER D, STANLEY HE. Od Newtona do Mandelbrota. Warszawa: WNT, 1996.
- [25] WALISZEWSKI P. Distribution of gland-like structures in human gallbladder adenocarcinomas possesses fractal dimension. *J Surg Oncol* 1999; **71**: 189–195.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 06.06.2001 r.*

*Przyjęto: 27.08.2001 r.*

*Adres autorów: ul. Waszyngtona 23/203, 15-304 Białystok*



## ZMIANY EWOLUCYJNE UKŁADU FOTORECEPCYJNEGO SZYSZYNKI KRĘGOWCÓW\*

### EVOLUTIONARY CHANGES OF VERTEBRATE PINEAL PHOTORECEPTION SYSTEM

Agnieszka DEJDA<sup>1</sup>; Wojciech Andrzej GORCZYCA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Amin Biogennych, PAN, Łódź;

<sup>2</sup>Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, PAN, Wrocław

*Streszczenie:* Szyszynka – zlokalizowany w mózgu kręgowców gruczoł dokrewny – wykazuje szereg wspólnych cech z siatkówką oka. Obydwa narządy rozwinęły się jako wypuklenia międzymózgowia, pełnią funkcję fotorecepcyjną i wytwarzają melatoninę w sposób zależny od światła. W przeciwieństwie do siatkówki, szyszynka przeszła znaczne zmiany ewolucyjne i tworzące ją pinealocyty różnią się u kręgowców zarówno budową, jak i funkcją. Pomimo różnic morfologicznych i utraty w trakcie rozwoju filogenetycznej bezpośredniej zdolności fotorecepcyjnej, pinealocyty zachowały zdolność do ekspresji szeregu białek charakterystycznych dla procesu fototransdukcji. O ile ich funkcja w szyszynkach kręgowców niższych wydaje się być w sposób oczywisty związana ze zdolnością bezpośredniej recepcji sygnału świetlnego, o tyle w dalszym ciągu pozostaje ona niejasna u ssaków. Wyniki najnowszych badań sugerują, że mogą one być bezpośrednio zaangażowane w proces fototransdukcji we wczesnym okresie życia ssaków. W życiu dorosłym ssaków wykorzystywane są przypuszczalnie przez inne systemy przekazywania sygnału.

*(Postępy Biologii Komórki 2001; 28: 571–588)*

**Słowa kluczowe:** fotorecepcja, fototransdukcja, szyszynka, białka sygnałowe

*Summary:* The pineal – an endocrine gland localized in the vertebrate brain – shares several common features with the retina. Both organs have developed as evaginations from the diencephalon, perform photoreceptive functions, produce melatonin in a light-dependent manner. However, in contrast to the retina, the pineal has undergone considerable evolutionary changes and as a result, the pinealocytes differ in their structure and function among vertebrates. Despite the morphological differences and the loss of the direct photoreceptive capability during phylogeny, the pinealocytes preserve the capability of the expression of many proteins that are specific for phototransduction. As far as their role in the lower vertebrate pineal glands seems to be surely connected with the capability of direct light signal reception, it still remains unclear in mammals. The newest data suggest that they can be directly involved in

phototransduction in neonatal mammals. In adult mammals they likely take part in other transduction systems.

*(Advances in Cell Biology 2001; 28: 571–588)*

*Key words:* photoreception, phototransduction, pineal gland, signaling proteins

## WSTĘP

Szyszynka jest niewielkim, usytuowanym w międzymózgowiu, gruczołem dokrewnym wydzielającym melatoninę – hormon, który pełni u kręgowców rolę biochemicznego „zegara” (przekazuje informację o porze dnia) i biochemicznego „kalendarza” (przekazuje informację o porze roku). Jego synteza jest niska w dzień i wysoka w nocy. U zwierząt i ludzi żyjących na obszarach pozarównikowych latem obserwuje się obniżenie syntezy melatoniny, natomiast zimą, kiedy noce są długie, synteza hormonu wzrasta [59, 60, 89]. U niższych kręgowców szyszynka pełni rolę nadrzędnego zegara biologicznego generującego i regulującego behawioralne, fizjologiczne i biochemiczne rytmy okołodobowe [79]. Każda pojedyncza komórka tego organu jest sama w sobie okołodobowym systemem mającym zdolność do pochłaniania kwantów światła, rytmicznych zmian aktywności biologicznej i syntezy melatoniny. U ssaków nadrzędny zegar biologiczny znajduje się w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza [50], ale szyszynka nadal pozostaje u tych zwierząt istotnym ogniwem w systemie regulującym rytmy okołodobowe. Pomimo tego że szyszynka ssaków utraciła w toku ewolucji zdolność recepcji światła, to zachowała zdolność wytwarzania melatoniny i poprzez sygnał melatoninowy reguluje pracę nadrzędnego zegara biologicznego. U wszystkich kręgowców szyszynka wykazuje szereg wspólnych cech z siatkówką oka. Oba narządy rozwinęły się jako wpuklenia międzymózgowia, pełnią funkcję fotorecepcyjną i wytwarzają melatoninę w sposób zależny od światła. W przeciwieństwie do siatkówki, szyszynka przeszła znaczne zmiany ewolucyjne i wchodzące w jej skład pinealocyty różnią się wśród kręgowców zarówno budową, jak i funkcją. Pomimo różnic w budowie i utracie w trakcie rozwoju filogenetycznej bezpośredniej zdolności fotorecepcyjnej, pinealocyty zachowały zdolność ekspresji szeregu białek charakterystycznych dla procesu fototransdukcji, która stanowi pierwszy etap w rejestrowaniu obrazu przez siatkówkę. Rola tych białek w szyszynce wciąż pozostaje niejasna. Niniejsza praca jest opracowaniem zarówno podsumowującym stan wiedzy o zmianach, jakim w toku ewolucji podlegał układ fotorecepcyjny szyszynek kręgowców, jak i zbierającym dość rozproszone w piśmiennictwie dane dotyczące obecności w szyszynkach różnych kręgowców białek charakterystycznych dla procesu fototransdukcji.



## EWOLUCJA SZYSZYNKI

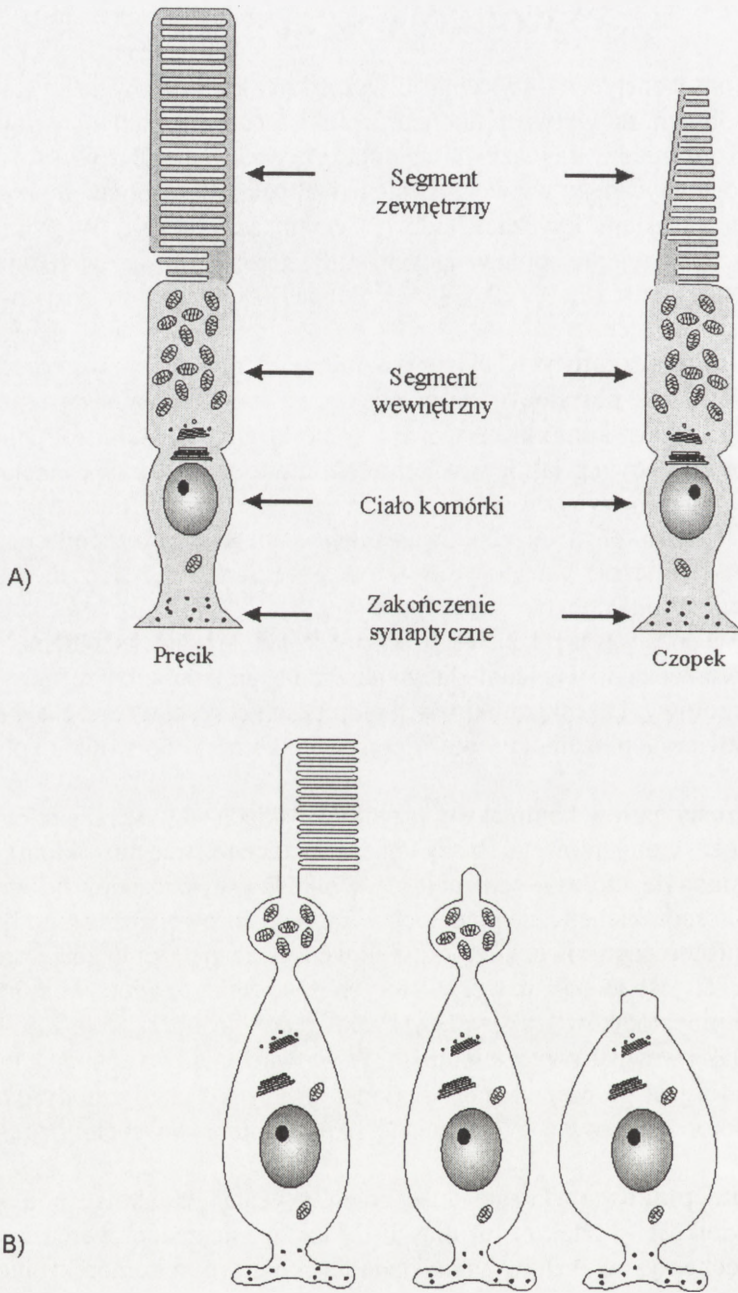
Rozwój ontogenetyczny szyszynki u wszystkich kręgowców zaczyna się w podobny sposób, tzn. od wytworzenia neuroepitelialnego uwypuklenia stropu trzeciej komory mózgu między zawiązkami spoidła uzdeczek i spoidła tylnego. W trakcie rozwoju filogenetycznego wytworzyły się jednak znaczne różnice między niższymi kręgowcami a ssakami dotyczące budowy i czynności gruczołu. W piśmiennictwie znaleźć można szereg prac omawiających bardziej szczegółowo ewolucyjne zmiany w budowie szyszynki [9, 11, 22, 37, 63]. Poniżej przedstawione zostaną skrótowo najistotniejsze różnice.

**Szyszynka smoczkoustych i ryb** przypomina swym kształtem woreczek. Zawiera trzy typy komórek: pinealocyty fotoreceptorowe (podobne w swej strukturze do czopków siatkówki), komórki nerwowe i komórki glijowe. Gruczoł pełni funkcję zarówno fotorecepcyjną, jak i wewnątrzwydzielniczą wytwarzając melatoninę. U niektórych gatunków ryb oprócz szyszynki występuje również narząd przyszyszynkowy o niejasnej do końca roli, zbudowany z tego samego typu komórek co szyszynka, o niższej jednak liczbie pinealocytów fotoreceptorowych. Część z nich są to tzw. zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe.

U **płazów** poza szyszynką charakteryzującą się różnym kształtem – od spłaszczonego woreczka do względnie litego narządu z jamkami lub bez nich – znajduje się narząd czołowy. Oba składniki tzw. kompleksu szyszynkowego mają taką samą budowę i zawierają pinealocyty fotoreceptorowe, komórki nerwowe i komórki glijowe.

U **większości gadów** kompleks szyszynkowy składa się z szyszynki w kształcie kanalika i oka ciemieniowego (nazywanego potocznie trzecim okiem). Wyjątek stanowią krokodyle, które nie posiadają szyszynki. Szyszynka gadów na ogół zawiera cztery typy komórek: nieliczne pinealocyty fotoreceptorowe, liczne zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe, komórki glijowe i w niewielkiej liczbie komórki nerwowe. Inaczej jest jednak u węży, których szyszynka zawiera komórki bardzo zbliżone do pinealocytów ssaków. Szyszynka gadów jest narządem zarówno światłoczułym, jak i wewnątrzwydzielniczym. W wytwarzanie i wydzielanie melatoniny zaangażowany jest główny element budowy szyszynki, czyli zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe. Wspomniane oko ciemieniowe spełnia funkcję fotorecepcyjną.

**Szyszynka ptaków** wykazuje duże zróżnicowanie gatunkowe pod względem struktury, wielkości, kształtu i lokalizacji. Może być narządem woreczkowym, kanalikowo-pęcherzykowym lub litym. Składa się z kilku typów komórek: pinealocytów fotoreceptorowych zawierających krótki segment zewnętrzny, zmodyfikowanych pinealocytów fotoreceptorowych pozbawionych dysków w segmencie zewnętrznym, pinealocytów nie mających kontaktu ze światłem narządu, komórek glijowych i bardzo nielicznych komórek nerwowych. Szyszynka ptaków jest narządem świa-



RYCINA 1. A – Typy komórek fotoreceptorowych siatkówki kręgowców, B – Typy pinealocytów szyszynki kręgowców: I – pinealocyty fotoreceptorowe obecne w szyszynkach smoczkoustych, ryb oraz płazów; II – zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe obecne w szyszynkach gadów i ptaków; III – pinealocyty wewnątrzwydzielnicze obecne w szyszynkach niektórych gadów i w szyszynkach ssaków



łoczującym i wewnątrzwydzielniczym. Światło bezpośrednio wpływa na wytwarzanie melatoniny przez ten narząd.

**U ssaków szyszynka** zmienia się w całości mięsisty i silnie unaczyniony narząd, wykazujący duże różnice gatunkowe dotyczące kształtu, masy i położenia względem trzeciej komory mózgu. Szyszynka jest otoczona torebką łącznotkankową i podzielona pasmami tkanki łącznej na zraziki. W obrębie zrazików występują różne typy komórek. Przeważają wśród nich pinealocyty (90%) pozbawione zarówno segmentu zewnętrznego, jak i wewnętrznego, komórki glijowe, pojedyncze komórki nerwowe, fibroblasty, makrofagi, komórki plazmatyczne, tuczne oraz barwnikowe. Szyszynka ssaków nie wykazuje bezpośredniej wrażliwości na światło, spełnia natomiast funkcję wewnątrzwydzielniczą.

W toku ewolucji budowa i funkcja szyszynki podlegała powolnym, aczkolwiek ciągłym zmianom. W odniesieniu do pinealocytów fotoreceptorowych (ryc. 1B) miały one charakter regresji segmentu zewnętrznego i połączeń synaptycznych z komórkami nerwowymi. Pinealocyty fotoreceptorowe szyszynki ryb i płazów zostały w większości zastąpione przez zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe u niektórych gadów i ptaków, a te z kolei dały początek pinealocytom wewnątrzwydzielniczym u kury domowej, niektórych gadów i wszystkich dorosłych ssaków. W rezultacie w szyszynce ssaków doszło do utraty bezpośredniej wrażliwości na światło i zdolności przekazywania impulsu nerwowego do mózgu [22], a informacja o warunkach oświetlenia dociera do gruczołu szlakiem wieloneuronalnym. Sygnał zainicjowany bodźcem świetlnym przekazywany jest najpierw z siatkówki do jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza (tzw. szlakiem siatkówkowo-podwzgórzowym), a następnie, odpowiednio przetworzony, przesyłany jest do jądra przykomorowego. Stamtąd wędruje przyśrodkową wiązką przodomózgowia do pokrywy międzymózgowia, dochodzi dalej do jądra pośrednio-bocznego rdzenia kręgowego i do zwoju górnego szyjnego, z którego odchodzą włókna zazwojowe unerwiające szyszynkę. Nocą z zakończeń tych włókien uwalniana jest noradrenalina, która pobudza postsynaptyczne receptory adrenergiczne znajdujące się w błonie komórkowej pinealocytów. Dla szyszynki ssaków „sygnałem” ciemności jest zatem noradrenalina [89].

Mimo że pinealocyty fotoreceptorowe przypominające budową czopki siatkówki, zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe i pinealocyty wewnątrzwydzielnicze różnią się pod względem morfologicznym, wykazują one nadal szereg wspólnych cech na poziomie molekularnym i funkcjonalnym. Taką cechą jest zdolność do syntezy melatoniny, a także ekspresja białek charakterystycznych dla procesu fototransdukcji zachodzącego w fotoreceptorowych komórkach siatkówki.

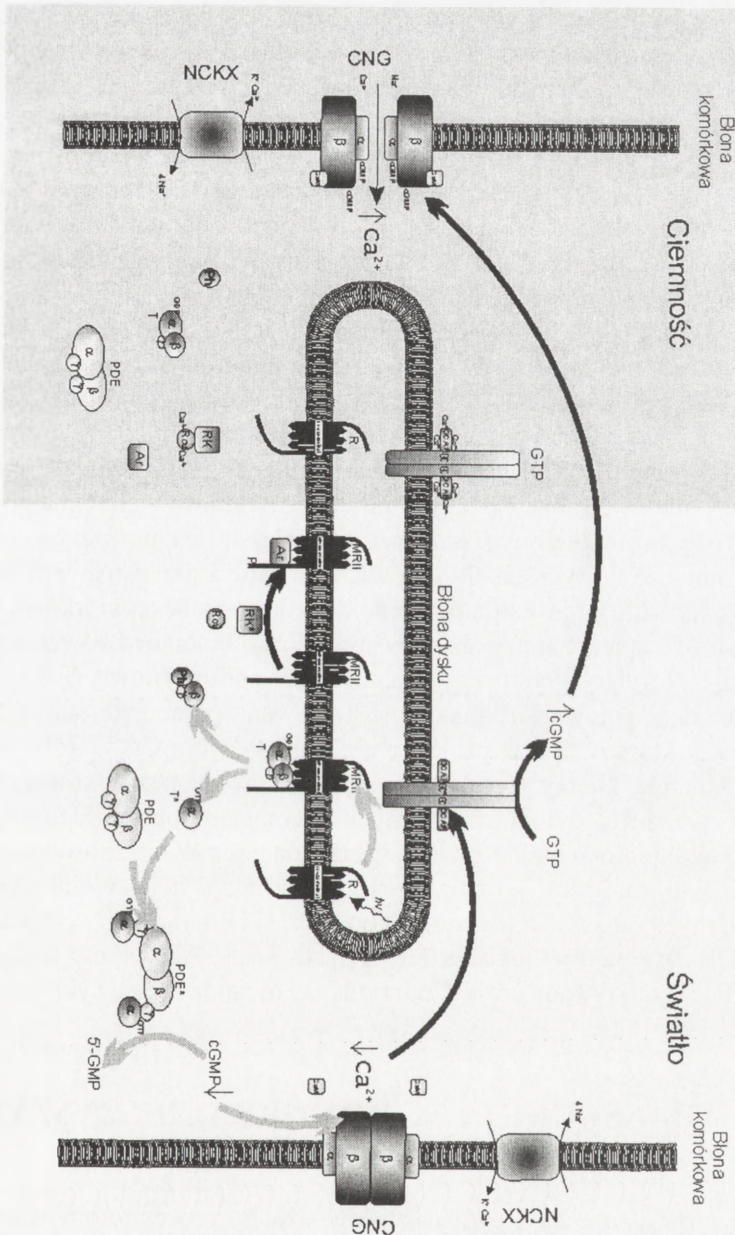
## KOMÓRKI FOTORECEPTOROWE SIATKÓWKI I PROCES FOTOTRANSDUKCJI

Początkowym etapem powstawania wrażenia wzrokowego jest pobudzenie przez światło komórek siatkówki, zbudowanej z kilku typów wyspecjalizowanych neuronów ułożonych warstwowo. W warstwie komórek fotoreceptorowych, na którą składają się czopki (odpowiedzialne za widzenie fotopowe i za widzenie barw) oraz pręciki (odpowiedzialne za widzenie skotopowe), w procesie zwanym fototransdukcją dochodzi do zamiany impulsu świetlnego w impuls nerwowy. Komórki nerwowe dwubiegunowe, poziome i amakrynowe, tworzące kolejne warstwy siatkówki uczestniczą w przetwarzaniu pierwotnych sygnałów nerwowych i przenoszeniu ich z komórek fotoreceptorowych do komórek zwojowych, których aksony tworzą nerw wzrokowy [42]. Komórki fotoreceptorowe siatkówki (ryc. 1A) składają się z segmentu zewnętrznego, segmentu wewnętrznego oraz ciała komórkowego posiadającego zakończenie synaptyczne. W segmencie wewnętrznym wytwarzana jest energia i zachodzi synteza białek. Segment zewnętrzny zaangażowany jest w przekształcanie i przesyłanie informacji świetlnej. Segmenty zewnętrzne pręcików zawierają ułożone warstwowo i zamknięte we wnętrzu segmentu charakterystyczne dyski utworzone z zaginającej się do wnętrza błony plazmatycznej. Segmenty zewnętrzne czopków zawierają zamiast dysków pofałdowania błony plazmatycznej zwane woreczkami [88].

Budowa pręcików (ryc. 1A) pozwala w prosty sposób oddzielić ich część funkcjonalną (segment zewnętrzny) od części odpowiedzialnej za życiowe funkcje komórki (segment wewnętrzny). Izolowane segmenty zewnętrzne zachowują zdolność do reagowania na światło i wobec tego stanowią bardzo dobry model do badań nad mechanizmami procesów wewnątrzkomórkowych inicjowanych przez fotony. Dzięki temu procesy molekularne leżące u podłoża fototransdukcji zostały względnie dobrze poznane. Omówiono je bardziej szczegółowo w innych pracach przeglądowych [24, 34, 69, 71]. Tu ograniczymy się jedynie do przedstawienia zasadniczych etapów procesu fototransdukcji (ryc. 2).

Absorpcja fotonu przez rodopsynę powoduje izomeryzację 11-*cis*-retinalu do *trans*-retinalu i w konsekwencji zmianę konformacji cząsteczki rodopsyny w formę nazywaną metarodopsyną II (MRII). W procesie fototransdukcji rozpoczyna się faza aktywacji (ryc. 2, jasne strzałki). Do cytoplazmatycznej części metarodopsyny II wiąże się specyficzne dla komórek fotoreceptorowych białko G, zwane **transducyną** ( $T\alpha\beta\gamma$ ). Dochodzi do aktywacji transducyny – następuje wymiana GDP na GTP w podjednostce  $\alpha$  transducyny i dysocjacja trimeru na podjednostki  $T\beta\gamma$  i  $T\alpha$ . Pochłonięcie jednego fotonu prowadzi do dysocjacji od kilku setek do kilku tysięcy cząsteczek transducyny. Rola podjednostek  $T\beta\gamma$  nie jest zbyt jasna, wiadomo jedynie, że mogą być wiązane przez białko o nazwie **fosducyna** (Phd). Podjednostki





RYCINA 2. Schemat procesu fototransdukcji w komórkach pręcikowych siatkówki kręgowców. Zaciemniona część rysunku przedstawia stan komórki pręcikowej przed zadziałaniem bodźca świetlnego, jasna część rysunku przedstawia kaskadę procesów biochemicznych zachodzących w komórce pręcikowej po zadziałaniu bodźca świetlnego: jasne strzałki – faza aktywacji; ciemne strzałki – faza powrotu; (\*) – białko w stanie aktywacji; R – rodopsyna; MR II – metarodopsyna II; T – transducyna; PDE – fosfodiesteraza cGMP; Ph – fosducyna; GC – cyklaza guanylanowa; GCAP – białko aktywujące cyklazę guanylanową; RK – kinaza rodopsynowa; Rcv – rekoweryna; Ar – arestyna; CaM – kalmodulina; CNG – kanał jonowy zależny od cGMP; NCKX – wymiennik jonowy

$\alpha$  aktywują **fosfodiesterazę cyklicznego GMP (PDE)** poprzez związanie inhibitorowych podjednostek enzymu. Aktywna PDE (PDE<sup>\*</sup>) gwałtownie hydrolizuje cGMP, którego stężenie spada i zamykają się otwierane przezeń **kanały jonowe (CNG)** transportujące jony Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oraz Mg<sup>2+</sup>. W wyniku przerwania strumienia kationów wpływającego do wnętrza komórki dochodzi do hiperpolaryzacji błony komórkowej i następuje zahamowanie uwalniania neuroprzekaźników w zakończeniu synaptycznym pręcika. Rozpoczyna się tym samym odpowiedź w kolejnych komórkach nerwowych siatkówki, w wyniku której sygnał ostatecznie zostaje przesłany do mózgu.

Równocześnie z wywołanym przez impuls świetlny zamknięciem kanałów jonowych, jony wapniowe są wydalane z komórki przez **wymienniki Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> (NCKX)**. Spadek stężenia Ca<sup>2+</sup> wewnątrz komórki fotoreceptorowej jest sygnałem do podjęcia syntezy cGMP przez **cyklazę guanylanową (GC<sup>\*</sup>)** regulowaną przez białka **GCAP (Guanylyl Cyclase Activating Proteins)**. Aktywacja GC przy niskim stężeniu Ca<sup>2+</sup> stanowi punkt zwrotny w procesie fototransdukcji. Od tego momentu rozpoczyna się faza powrotu (*recovery*) komórki do „stanu ciemnego” (ryc. 2, strzałki ciemne), w którym kanały jonowe są otwarte i przez segment zewnętrzny przepływa ponownie prąd kationów depolaryzujący błonę komórkową.

Uważa się, że spadek stężenia jonów wapniowych stanowi również sygnał do rozpoczęcia fosforylacji rodopsyny przez **kinazę rodopsynową (RK)**. W proponowanym modelu aktywność kinazy jest hamowana przez związane z nią białko wiążące wapń, które oddysocjowuje przy niskim stężeniu Ca<sup>2+</sup>. Rola wrażliwego na Ca<sup>2+</sup> regulatora kinazy rodopsynowej przypisywana jest **rekowerynie (Rcv)**. Fosforylacja przez RK<sup>\*</sup> cytoplazmatycznych reszt metarodopsyny II umożliwia wiązanie się do tego regionu białka zwanego **arestyną (Ar)**. W ten sposób zablokowane zostaje wiązanie transducyny i co za tym idzie jej aktywacja. Wolne podjednostki T $\alpha$  transducyny wykazują wewnętrzną aktywność GTP-azową. W wyniku hydrolizy GTP do GDP następuje reasocjacja T $\alpha$  i T $\beta$  do T $\alpha\beta$ . Aktywność fosfodiesterazy cGMP spada, faza aktywacji zostaje zatrzymana i rozpoczyna się cykl regeneracyjny rodopsyny.

## FOTOTRANSDUKCJA W KOMÓRKACH SZYSZYNKI KRĘGOWCÓW

Badania prowadzone na kręgowcach dowodzą, że proces fototransdukcji w pinealocytach fotoreceptorowych szyszynki przebiega podobnie jak w komórkach pręcikowych siatkówki. Mimo regresji segmentu zewnętrznego fotoreceptorów w rozwoju filogenetycznym szyszynki, u różnych gatunków zwierząt udało się wykazać obecność charakterystycznych dla absorpcji światła mechanizmów i niezbędnych do procesu fototransdukcji białek w różnych komórkach tego narządu [56].



Pinealocyty fotoreceptorowe szyszynki pstrąga są zdepolaryzowane w ciemności, a po absorpcji światła wykazują stan hiperpolaryzacji [11, 57]. Hiperpolaryzacja błony komórkowej fotoreceptora szyszynkowego żaby powoduje zahamowanie uwalniania neuroprzekaźnika – kwasu asparaginowego i/lub glutaminowego do szczeliny synaptycznej między pinealocytem fotoreceptorowym a komórką nerwową. Innym dowodem na podobieństwo procesów fototransdukcji w fotoreceptorach siatkówki i szyszynki jest doświadczenie J. Falcona, w którym pod wpływem działania światła w pinealocytach fotoreceptorowych szyszynki pstrąga uzyskano spadek poziomu cGMP o 30–40%. Efektu tego nie zaobserwowano w obecności toksyny krztuśca, która uniemożliwia oddziaływanie białek G, w tym transducyny, z ich receptorami, a także w obecności inhibitorów fosfodiesterazy cGMP. Obserwacja ta sugeruje, że w szyszynce pstrąga światło aktywuje fosfodiesterazę cGMP przez białko G, którym prawdopodobnie jest tutaj, tak jak i w siatkówce – transducyna [22]. Wykazanie w izolowanych komórkach szyszynki kurcząt obecności kanałów jonowych regulowanych przez cGMP przemawia za podobieństwem procesu fototransdukcji w siatkówce i w zmodyfikowanych pinealocytach fotoreceptorowych [19].

Nie jest jasne, czy proces fototransdukcji zachodzi w szyszynkach ssaków, mimo że również i tutaj dochodzi do ekspresji białek niezbędnych dla tego procesu. Wyniki najnowszych badań [80] przeprowadzonych na izolowanych szyszynkach szczura oraz otrzymanych z nich pinealocytach wykazały, że szyszynki (i pinealocyty) izolowane od 1-dniowych zwierząt są zdolne do reagowania zmianami syntezy melatoniny w wyniku bezpośredniej ekspozycji na światło. Światło powodowało w tych warunkach obniżenie poziomu wytwarzania hormonu, co sugeruje, że szyszynki nowonarodzonych szczurów są zdolne do bezpośredniego odbioru bodźców świetlnych. W szyszynkach izolowanych od zwierząt starszych (5-, 7- i 9-dniowych) światło nie wpłynęło na syntezę melatoniny, co wskazuje, że u ssaków w trakcie dojrzewania osobniczego dochodzi do zaniku zdolności fotorecepcyjnych szyszynki. Istotną rolę wydaje się w tym procesie odgrywać układ adrenergiczny. Pinealocyty pochodzące z szyszynki 1-dniowych szczurów, hodowane w obecności 1  $\mu\text{M}$  noradrenaliny, zachowywały wrażliwość na światło przez tydzień, natomiast szybko ją traciły, wówczas gdy hodowla prowadzona była w obecności 10  $\mu\text{M}$  noradrenaliny. Na podstawie tych, a także nielicznych wcześniejszych badań [4] można przypuszczać, że to właśnie noradrenalina hamuje rozwój czynników niezbędnych dla procesu fototransdukcji. W wyniku działania hormonu dochodzi do obniżenia ekspresji np. rodopsyny [4, 80]. Inną bardzo ważną obserwacją jest stwierdzenie, że utrzymywane w hodowli szyszynki nowonarodzonych szczurów reagują na światło spadkiem wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  [4]. Jest to kolejny argument przemawiający za tym, że obecne w pinealocytach ssaków białka sygnałowe charakterystyczne dla procesu fototransdukcji rzeczywiście biorą udział w bezpośrednim odbiorze bodźców świetlnych przez szyszynki nowonarodzonych zwierząt. Zdolność ta zanika, gdy dochodzi do unerwienia szyszynki przez włókna współczulne.

## BIĄŁKA SYGNAŁOWE KOMÓREK FOTORECEPTOROWYCH SIATKÓWKI W SZYSZYNKACH KRĘGOWCÓW

Z dość rozproszonych w piśmiennictwie danych wynika, że szyszynki kręgowców mogą wytwarzać praktycznie wszystkie białka niezbędne dla przebiegu procesu fototransdukcji w takiej samej postaci, jak ma to miejsce w komórkach fotoreceptorowych siatkówki. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę tych białek.

**Opsyny** (*opsins*) to białka, które w obecności chromoforu (11-*cis*-retinalu) tworzą receptory światła; zaliczane są do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Od sekwencji aminokwasowej opsyny wchodzącej w skład receptora zależy jego widmo absorbcyjne. Występująca w ludzkich komórkach pręcikowych rodopsyna wykazuje największą czułość na światło o długości fali 500 nm, a fotoreceptory czopków – na fale świetlne o długości 425, 530, 557 nm [78]. Stosując techniki immunocytochemii i biologii molekularnej wykazywano obecność opsyny pręcikowej i opsyn czopkowych w szyszynkach wielu gatunków ryb [20, 23, 36, 70], płazów [45, 51, 67, 87], gadów [39, 51, 83] oraz ptaków [1, 83]. Ponadto u kurcząt wykazano obecność białka podobnego do siatkówkowych opsyn, ale wytwarzanego tylko w szyszynce, które nazwano pinopsyną (P-opsyną) [52, 53, 62]. Białko to w obecności 11-*cis*-retinalu wrażliwe było na światło o długości fali 470 nm [62] i w sposób zależny od światła aktywowało bydlęcą transdukcję [54]. Gdy weźmie się pod uwagę fakt, że szyszynka ssaków w toku ewolucji utraciła bezpośrednią wrażliwość na światło wydaje się interesujące, że również w niej wykrywa się siatkówkowe opsyny [4, 33, 43, 47, 67, 90].

**Arestyna** (*arrestin*, Ar), znana od wielu lat jako antygen S, jest białkiem o masie cząsteczkowej 48 kDa, występującym zarówno w siatkówce, jak i szyszynce kręgowców [4, 10, 21, 23, 27, 36, 44, 45, 58, 84]. Obecna w komórkach pręcikowych siatkówki arestyna, wiążąc się do ufosforylowanej rodopsyny, blokuje wiązanie białka G (transducyny) i zatrzymuje kaskadę aktywacji w procesie fototransdukcji. Homologi arestyny (tzw.  $\beta$ -arestyny) są obecne w różnych tkankach i biorą udział w procesach związanych z przenoszeniem sygnału przez receptory  $\beta$ -adrenergiczne [28, 65].

**Transducyna** (*transducin*, T) jest heterotrimerycznym białkiem G wiążącym się do aktywowanej światłem rodopsyny. Składa się z podjednostki  $\alpha$  (39 kDa) oraz występujących w kompleksie podjednostek  $\beta$  (37 kDa) i  $\gamma$  (8 kDa). Podjednostka  $\alpha$  transducyny zawiera miejsce wiążące nukleotydy guanylowe GDP i GTP, a ponadto wykazuje wewnętrzną aktywność GTP-azową (tzn. rozkłada GTP do GDP) [29, 30]. Stwierdzono obecność podjednostki  $\alpha$  transducyny w szyszynkach różnych gatunków ryb [20, 23, 81], płazów [81, 87], ptaków [38, 52, 61, 81] i ssaków [75].

**Fosfodiesteraza cGMP** (*phosphodiesterase cGMP*, PDE6) jest efektorowym enzymem aktywowanym w wyniku oświetlenia komórki fotoreceptorowej. Wy-



stępuje on w komórkach pręcikowych w formie błonowej i cytozolowej. Błonowa forma fosfodiesterazy zbudowana jest z czterech podjednostek: dwóch identycznych podjednostek inhibitorowych (tzw. podjednostki  $\gamma$ ) o masie cząsteczkowej 11 kDa i dwóch różnych podjednostek katalitycznych ( $\alpha$  i  $\beta$ ) o masach cząsteczkowych odpowiednio 88 i 84 kDa. Forma cytozolowa zawiera dodatkowo podjednostkę  $\delta$  o masie cząsteczkowej 15 kDa. Budowa fosfodiesterazy cGMP występującej w komórkach czopkowych nie jest dobrze poznana, ale najprawdopodobniej można w niej wyróżnić dwie identyczne podjednostki  $\alpha$ , jedną lub dwie podjednostki inhibitorowe  $\gamma$  (13 kDa) i jedną lub dwie podjednostki  $\delta$  (15 kDa) [3]. Aktywność fosfodiesterazy cGMP stwierdzono w szyszynkach kurcząt [85]. Badania dotyczące ekspresji fosfodiesterazy cGMP w szyszynce ssaków wskazywały, że obecny jest tu jedynie enzym czopkowy [7]. Stosując technikę hybrydyzacji *in situ* potwierdzono w zasadzie wcześniejsze obserwacje, wykazując w szyszynkach myszy i szczura ekspresję przede wszystkim czopkowej i w śladowych ilościach pręcikowej fosfodiesterazy cGMP [4].

**Kinaza rodopsynowa** (*rhodopsin kinase*, RK) jest kinazą serynowo-treoninową fosforylującą w komórkach fotoreceptorowych siatkówki cytoplazmatyczne reszty wzbudzonej przez światło rodopsyny. Fosforylacja rodopsyny przez RK rozpoczyna proces „odczulania” fotoreceptora. Masa cząsteczkowa enzymu wynosi 63 kDa. RK należy do rodziny zbliżonych strukturalnie kinaz fosforylujących receptory sprzężone z białkami G (tzw. rodzina GRK, *G-protein coupled receptors kinases*) i znana jest również pod nazwą GRK1 [28, 66, 72]. Obecność enzymu wykazano w szyszynkach kilku gatunków ssaków [4, 67, 90], a także w szyszynce kurcząt [91].

**Rekoweryna** (*recoverin*, Rcv) jest białkiem wiążącym wapń, występującym głównie w komórkach fotoreceptorowych [16, 55, 86], w niektórych subpopulacjach komórek dwubiegunowych [55, 86], a także w pojedynczych komórkach zwojowych siatkówki [55]. Rekoweryna zawiera dwie domeny wiążące wapń (domeny *EF-hand*), a jej masa cząsteczkowa wynosi 23,4 kDa [16]. Sugeruje się, że białko to bierze udział w zależnej od wapnia regulacji aktywności kinazy rodopsynowej. W obecności jonów wapniowych rekoweryna tworzy kompleks z RK, blokując w ten sposób aktywność enzymu [8, 40]. Obecność rekoweryny stwierdzono w szyszynce kurczęcia [2], żaby, gołębia, szczura, królika, owcy i człowieka [46].

**Kanał jonowy zależny od cGMP** (*cyclic GMP gated channel*, CNG) należy do rodziny niespecyficznych kanałów kationowych regulowanych przez cykliczne nukleotydy. W komórkach fotoreceptorowych siatkówki kręgowców występuje w formie heterotetrameru dwóch podjednostek  $\alpha$  (63 kDa) i dwóch podjednostek  $\beta$  (240 kDa). Działanie kanału jest modulowane przez kalmodulinę w sposób zależny od jonów wapnia. Kalmodulina, łącząc się z podjednostką  $\beta$  kanału, obniża jego powinowactwo do cGMP [31, 32]. Wykazano, że omawiany kanał jonowy występuje

również poza siatkówką, a jego ekspresję stwierdzono w komórkach szyszynki kurczęcia [5, 19], szczura [15] i bydła [5].

**Wymiennik jonów** ( $Na^+/K^+-Ca^{2+}$  exchanger, NCKX) jest glikozylovanym białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 220 kDa [12], które niezależnie od oświetlenia wymienia 4 jony sodowe na 1 jon potasowy i jeden jon wapniowy [74]. Brakuje danych dotyczących obecności NCKX w komórkach szyszynki.

**Cyklaza guanylanowa** (*retinal guanylyl cyclase*, RetGC) jest charakterystycznym dla siatkówki białkiem o masie 116 kDa, należącym do rodziny błonowych cyklaz guanylanowych. W siatkówce cyklaza guanylanowa występuje w dwóch izoformach: RetGC1 i RetGC2. Aktywność enzymu regulowana jest w sposób zależny od wapnia przez białka GCAP. RetGC nie jest aktywowana żadnym znanym ligandem peptydowym aktywującym inne błonowe GC [41]. Poza siatkówką obecność RetGC1 stwierdzono w szyszynce kurczęcia [76] i bydła [82].

**GCAPs** (*guanylyl cyclase activating proteins*) są białkami wiążącymi wapń i regulującymi w sposób zależny od wapnia aktywność cyklazy guanylanowej (GC) [69]. Białka te zawierają po 3 domeny *EF-hand* i mają zbliżone do rekoweryny masy cząsteczkowe (23,5 kDa GCAP1 i 23,7 kDa GCAP2). Ich ruchliwość w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) zależy od obecności jonów wapniowych, co wskazuje na zmiany konformacji cząsteczek GCAP1 i GCAP2 zachodzące w wyniku wiązania  $Ca^{2+}$ . Są to białka bardzo konserwatywne, np. sekwencje aminokwasowe GCAP1 ludzkiego i bydłęcego różnią się zaledwie kilkoma resztami na ponad dwieście [17, 18, 25, 26, 68]. Po raz pierwszy GCAPs zostały zidentyfikowane w siatkówkach bydłęcych [17, 25]. Obecnie wiadomo, że występują również w siatkówkach innych gatunków zwierząt [14, 35, 64]. Obecność GCAP1 stwierdzono w szyszynce bydła [82], a także szczura [A. Dejda i W. A. Gorczyca, dane niepublikowane]. W szyszynce kurczęcia wykazano obecność mRNA zarówno dla GCAP1, jak i GCAP2 [76]. GCAP1, GCAP2 i rekoweryna należą do grupy bardzo podobnych strukturalnie białek tworzących rodzinę tzw. neuronalnych sensorów wapnia (NCS, *neuronal calcium sensors*) [6].

**Fosducyna** (*phosducin*, Phd) jest wykrytą w komórkach fotoreceptorowych fosfoproteiną o masie cząsteczkowej 28 kDa [48]. Nieufosforylowana forma fosducyny tworzy kompleks z podjednostkami  $\beta\gamma$  transducyny i uważa się, że w procesie fototransdukcji zapobiega ich reasocjacji z podjednostką  $\alpha$  [49]. Obecność tego białka stwierdzono w szyszynce pstrąga, kurczęcia, a także kilku gatunków ssaków, łącznie z człowiekiem [13, 73, 77].

## PODSUMOWANIE

Szyszynka, mimo zmian ewolucyjnych, pełni u wszystkich kręgowców funkcję przekaźnika neuroendokrynnego, który w odpowiedzi na bodźce świetlne rytmicznie wytwarza i wydziela melatoninę. Bezpośrednie przetwarzanie informacji świetlnej



w sygnał hormonalny zachodzi u kręgowców, których szyszynka zawiera podobne do czopków pinealocyty fotoreceptorowe i/lub zmodyfikowane pinealocyty fotoreceptorowe, tj. u smoczkoustych, ryb, płazów, niektórych gadów oraz ptaków. Szyszynki ssaków utraciły wrażliwość na światło i otrzymują informacje o warunkach oświetlenia środowiska drogą pośrednią. Niezależnie jednak od sposobu otrzymywania informacji o oświetleniu, w szyszynkach wszystkich kręgowców obecne są białka charakterystyczne dla procesu fototransdukcji. O ile ich funkcja w szyszynkach kręgowców niższych wydaje się być w sposób oczywisty związana ze zdolnością do bezpośredniej recepcji sygnału świetlnego, o tyle w dalszym ciągu pozostaje niejasna u ssaków. Wyniki najnowszych badań sugerują, że białka te mogą być bezpośrednio zaangażowane w proces fototransdukcji, zachodzący w szyszynkach ssaków jedynie we wczesnym okresie życia [80]. Przemawia za tym wyraźne obniżenie ekspresji niektórych z nich (np. rodopsyny) w trakcie rozwoju osobniczego. Z drugiej strony ekspresja takich białek, jak na przykład arestyna, kinaza rodopsynowa, utrzymywana jest na niemalże stałym poziomie w ciągu całego życia organizmu. Przypuszcza się, że białka te wykorzystywane są przez inne szlaki przekazywania sygnału [4, 90]. Ostatnie doniesienia wskazują również, że niektóre z białek charakterystycznych dla fototransdukcji podlegają ekspresji jedynie w części pinealocytów [4, 82]. Na przykład, w pinealocytach nowonarodzonych gryzoni stwierdza się obecność mRNA kodującego komponenty procesu fototransdukcji specyficzne bądź dla czopków, bądź dla pręcików siatkówki [4]. Obecna w szyszynce bydlęcej siatkówkowa cyklaza guanylanowa (Ret GC1) występuje w większości pinealocytów razem z białkiem GCAP1, ale w niewielkiej populacji pinealocytów może też występować z białkiem S100B, które jest jej innym regulatorem [82]. Obserwacje te sugerują, że w obrębie komórek szyszynki występują zróżnicowane funkcjonalnie subpopulacje pinealocytów. Otwiera to nowe obszary badań zarówno nad ich rolą, jak i mechanizmami regulującymi różnicowanie.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Pani Prof. dr hab. Jolancie Zawilskiej oraz Panu Prof. dr hab. Jerzemu Z. Nowakowi za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi, które były pomocne w ostatecznym opracowaniu artykułu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ARAKI M, FUKADA Y, SHICHIDA Y, YOSHIZAWA T, TOKUNAGA F. Differentiation of both rod and cone types of photoreceptors in the *in vivo* and *in vitro* developing pineal glands of the quail. *Dev Brain Res* 1992; **65**: 85–92.
- [2] BASTIANELLI E, POCHET R. Calbindin-D28k, calretinin and recoverin immunoreactivities in developing chick pineal gland. *J Pineal Res* 1994; **17**: 103–111.

- [3] BEAVO JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995; **75**: 725–748.
- [4] BLACKSHAW S, SNYDER SH. Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci* 1997; **17**: 8074–8082.
- [5] BÖNIGK W, MULLER F, MIDDENDORFF R, WEYAND I, KAUP B. Two alternatively spliced forms of the cGMP-gated channel  $\alpha$ -subunit from cone photoreceptor are expressed in the chick pineal organ. *J Neurosci* 1996; **16**: 7458–7468.
- [6] BRAUNEWELL KH, GUNDELFINGER ED. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* 1999; **295**: 1–12.
- [7] CARCAMO B, HURWITZ MY, CRAFT CM, HURWITZ RL. The mammalian pineal expresses the cone but not rod cyclic GMP phosphodiesterase. *J Neurochem* 1995; **65**: 1085–1092.
- [8] CHEN CHK, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ, HURLEY JB.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18060–18066.
- [9] COLLIN JP, BRISSON P, FALCON J, VOISIN P. Multiple cell types in the pineal: functional aspects. [w] O'Brien PJ, Klein DC [red.] Pineal and retinal relationships. Academic Press INC 1986: 15–32.
- [10] COLLIN JP, MIRSHAHI M, BRISSON P, FALCON J, GUERLOTTE J, FAURE JP. Pineal-retinal molecular relationships: distribution of „S-antigen” in the pineal complex. *Neuroscience* 1986; **19**: 657–666.
- [11] COLLIN JP, VOISIN P, FALCON J, FAURE JP, BRISSON P, DEFAYE JR. Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch Histol Cytol* 1989; **52**: 441–449.
- [12] COOK NJ, KAUPPUB. Solubilization, purification, and reconstitution of the sodium-calcium exchanger from bovine retinal rod outer segments. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11382–11388.
- [13] CRAFT CM, LOLLEY RN, SELDIN MF, LEE RH. Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse. *Genomics* 1991; **10**: 400–409.
- [14] CUENCA N, LOPEZ S, HOWES K, KOLB H. The localization of guanylyl cyclase-activating proteins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; **39**: 1243–1250.
- [15] DING CH, POTTER ED, QIU W, COON SL, LEVINE MA, GUGGINO SE. Cloning and widespread distribution of the rat rod-type nucleotide-gated cation channel. *Am J Physiol* 1997; **272**: C1335–C1344.
- [16] DIZHOOR AM, RAY S, KUMAR S, NIEMI G, SPENCER M, BROLLEY D, WALSH KA, PHILIPOV PP, HURLEY JB, STRYER L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science* 1991; **251**: 915–918.
- [17] DIZHOOR AM, LOWE DG, OLSHEVSKAYA EV, LAURA RP, HURLEY JB. The human photoreceptor membrane guanylyl cyclase, RetGC, is present in outer segments and is regulated by calcium and a soluble activator. *Neuron* 1994; **12**: 1345–1352.
- [18] DIZHOOR AM, OLSHEVSKAYA EV, HENZEL WJ, WONG S, STULTS JT, ANKOUDI-NOVA I, HURLEY JM. Cloning, sequencing, and expressing of a 24-kDa  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein activating photoreceptor guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25200–25206.
- [19] DRYER SE, HENDERSON D. A cyclic GMP-activated channel in dissociated cells of chick pineal gland. *Nature* 1991; **353**: 756–758.
- [20] EKSTROM P, FOSTER RG, KORF HW, SCHALKEN JJ. Antibodies against retinal photoreceptor-specific proteins reveal axonal projections from the photosensory pineal organ in teleosts. *J Comp Neurol* 1987; **265**: 25–33.



- [21] EKSTROM P, MEISSL H. Electron microscopic analysis of S-antigen- and serotonin-immunoreactive neural and sensory elements in the photosensory pineal organ of the salmon. *J Comp Neurol* 1990; **292**: 73–82.
- [22] FALCON J. Cellular circadian clocks in the pineal. *Progress in Neurobiology* 1999; **58**: 121–162.
- [23] FORSELL J, HOLMQVIST B, HELVIK JV, EKSTROM P. Role of the pineal in the photoregulated hatching of the Atlantic halibut. *Int J Dev Biol* 1997; **41**: 591–595.
- [24] GORCZYCA WA. Role of calcium ions in vertebrate phototransduction. *Pol J Pharmacol* 1999; **51**: 167–172.
- [25] GORCZYCA WA, GRAY-KELLER MP, DETWILER PB, PALCZEWSKI K. Purification and physiological evaluation of guanylate cyclase activating protein from retinal rods. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4014–4018.
- [26] GORCZYCA WA, POLANS AS, SURGUCHEVA IG, SUBBARAYA I, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Guanylyl cyclase activating protein. A calcium-sensitive regulator of phototransduction. *J Biol Chem* 1995; **270**: 22029–22036.
- [27] Hafeez MA, Korf HW, Oksche A. Immunocytochemical and electron-microscopic investigations of the pineal organ in adult agamid lizards, *Uromastix hardwicki*. *Cell Tissue Res* 1987; **250**: 571–578.
- [28] HAGA T, HAGA K, KAMEYAMA K. G protein-coupled receptor kinases. *J Neurochem* 1994; **63**: 400–412.
- [29] HARGRAVE PS, HAMM HE. Regulation of visual transduction. [w] Sibley DR, Houslay MD [red.] Regulation of cellular signal transduction pathways by desensitization and amplification. John Wiley & Sons Ltd. 1994: 25–67.
- [30] HARGRAVE PS, MCDOWELL JH. Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J* 1992; **6**: 2323–2331.
- [31] HSU YT, MOLDAY RS. Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 29765–29770.
- [32] HSU YT, MOLDAY RS. Modulation of the cGMP-gated channel of rod photoreceptor cells by calmodulin. *Nature* 1993; **361**: 76–79.
- [33] HUANG SH, KLEIN DC, KORF HW. Immunocytochemical demonstration of rod-opsin, S-antigen, and neuron-specific proteins in the human pineal gland. *Cell Tissue Res* 1992; **267**: 493–498.
- [34] JINDROVA H. Vertebrate phototransduction: activation, recovery, and adaptation. *Physiol Res* 1998; **47**: 155–168.
- [35] KACHIS, NISHIZAWA Y, OLSHEVSKAYA E, YAMAZAKI A, MIYAKE Y, WAKABA-YASHI T, DIZHOOR A, USUKURA J. Detailed localization of photoreceptor guanylate cyclase activating protein-1 and -2 in mammalian retinas using light and electron microscopy. *Exp Eye Res* 1999; **68**: 465–473.
- [36] KALSOW CM, GREENHOUSE SS, GERN W, ADAMUS G, HARGRAVE PA, LANG LS, DONOSO LA. Photoreceptor cell specific proteins of snake pineal. *J Pineal Res* 1991; **11**: 49–56.
- [37] KARASEK M. Szyszynka i melatonina, PWN, W-wa-Łódź 1997: 17–25.
- [38] KASAHARA T, OKANO T, YOSHIKAWA T, YAMAZAKI K, FUKADA Y. Rod-type transducin  $\alpha$ -subunit mediates a phototransduction pathway in the chicken pineal gland. *J Neurochem* 2000; **75**: 217–224.
- [39] KAWAMURA S, YOKOYAMA S. Expression of visual and nonvisual opsins in American chameleon. *Vision Res* 1997; **37**: 1867–1871.
- [40] KLENCHIN VA, CALVERT PD, BOWNDS MD. Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 16147–16152.
- [41] KOBIAŁKA M, GORCZYCA WA. Particulate guanylyl cyclases: multiple mechanisms of activation. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 517–528.

- [42] KOLB H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35**: 2385–2404.
- [43] KORF HW, FOSTER RG, EKSTROM P, SCHALKEN JJ. Opsin-like immunoreaction in the retinae and pineal organs of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 1985; **242**: 645–648.
- [44] KORF HW, MOLLER M, GERY I, ZIGLER JS, KLEIN DC. Immunocytochemical demonstration of retinal S-antigen in the pineal organ of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 1985; **239**: 81–85.
- [45] KORF B, ROLLAG MD, KORF HW. Ontogenetic development of S-antigen and rod-opsin immunoreactions in retinal and pineal photoreceptors of *Xenopus laevis* in relation to the onset of melatonin-dependent color-change mechanisms. *Cell Tissue Res* 1989; **258**: 319–329.
- [46] KORF HW, WHITE BH, SCHAAD NC, KLEIN DC. Recoverin in pineal organs and retinae of various vertebrate species including man. *Brain Res* 1992; **595**: 57–66.
- [47] KRAMM CM, de GRIP WJ, KORF HW. Rod-opsin immunoreaction in the pineal organ of the pigmented mouse does not indicate the presence of a functional photopigment. *Cell Tissue Res* 1993; **274**: 71–78.
- [48] LEE RH, FOWLER A, MCGINNIS JF, LOLLEY RN, CRAFT ChM. Amino acid and cDNA sequence of bovine phosducin, a soluble phosphoprotein from photoreceptor cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 15867–15873.
- [49] LEE RH, TING TD, LIEBERMAN BS, TOBIAS DE, LOLLEY RN, HO YK. Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 25104–25112.
- [50] LEWANDOWSKI MH. Zegar biologiczny u ssaków: struktura i funkcja. *Post Hig Dośw* 1999; **53**(3): 405–422.
- [51] MASUDA H, OISHI T, OHTANI M, MICHINOMAE M, FUKADA Y, SHICHIDA Y, YOSHIZAWA T. Visual pigments in the pineal complex of the Japanese quail, Japanese grass lizard and bullfrog: immunocytochemistry and HPLC analysis. *Tissue Cell* 1994; **26**: 101–113.
- [52] MATSUSHITA A, YOSHIKAWA T, OKANO T, KASAHARA T, FUKADA Y. Colocalization of pinopsin with two types of G-protein alpha-subunits in the chicken pineal gland. *Cell Tissue Res* 2000; **299**: 245–251.
- [53] MAX M, MCKINNON PJ, SEIDENMAN KJ, BARRET RK, APPLEBURY ML, TAKAHASHI JS, MARGOLSKEE RF. Pineal opsin: a nonvisual opsin expressed in chick pineal. *Science* 1995; **267**: 1502–1506.
- [54] MAX M, SURYA A, TAKAHASHI JS, MARGOLSKEE RF, KNOX BE. Light-dependent activation of rod transducin by pineal opsin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 26820–26826.
- [55] MCGINNIS JF, STEPANIK PL, JARIANGPRASERT S, LERIOUS V. Functional significance of recoverin localization in multiple retina cell types. *J Neurosci Res* 1997; **50**: 487–495.
- [56] MEISSL H. Photic regulation of pineal function. Analogies between retinal and pineal photoreceptors. *Biol Cell* 1997; **89**: 549–554.
- [57] MEISSL H, EKSTROM P. Dark and light adaptation of pineal photoreceptors. *Vision Res* 1988; **28** (1): 49–56.
- [58] MIRSHAHI M, FAURE JP, BRISSON P, FALCON J, GUERLOTTE J, COLLIN J. S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol Cell* 1984; **52**: 195–198.
- [59] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. Melatonina i jej rola w funkcji systemu okołodobowego. *Post Hig Dośw* 1999; **53** (3): 445–471.
- [60] NOWAK JZ, ZAWILSKA JB. Zegar biologiczny i rytmika okołodobowa. *Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii* 1998; **1**: 5–32.
- [61] OKANO T, YAMAZAKI K, KASAHARA T, FUKADA Y. Molecular cloning of heterotrimeric G-protein alpha-subunits in chicken pineal gland. *J Mol Evol* 1997; **44**: 91–97.
- [62] OKANO T, YOSHIZAWA T, FUKADA Y. Pinopsin in a chicken pineal photoreceptive molecule. *Nature* 1994; **372**: 94–97.



- [63] OKSCHE A. Historical perspectives of photoneuroendocrine systems. [w] O'Brien PJ, Klein DC [red.] Pineal and retinal relationships. Academic Press INC 1986: 1–14.
- [64] OTTO-BRUC A, FARISS RN, HAESELEER F, HUANG J, BUCZYŁKO J, SURGUCHEVA I, BAEHR W, MILAM AH, PALCZEWSKI K. Localization of guanylate cyclase-activating protein 2 in mammalian retinas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4727–4732.
- [65] PALCZEWSKI K. Structure and functions of arrestins. *Protein Sci* 1994; **3**: 1355–1361.
- [66] PALCZEWSKI K, BENOVIĆ JL. G-protein-coupled receptor kinases. *Trends Biochem Sci* 1991; **16**: 387–391.
- [67] PALCZEWSKI K, CARRUTH ME, ADAMUS G, McDOWELL JH, HARGRAVE PA. Molecular, enzymatic and functional properties of rhodopsin kinase from rat pineal gland. *Vision Res* 1990; **30**: 1129–1137.
- [68] PALCZEWSKI K, SUBBARAYA I, GORCZYCA WA, HELEKAR BS, RUIZ CC, OHGURO H, HUANG J, ZHAO X, CRABB JW, JOHNSON RS, WALSH KA, GRAY-KELLER MP, DETWILER PB, BAEHR W. Molecular cloning and characterization of retinal guanylyl cyclase-activating protein. *Neuron* 1994; **13**: 395–404.
- [69] PALCZEWSKI K, POLANS AS, BAEHR W, AMES JB. Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases. *BioEssays* 2000; **22**: 337–350.
- [70] PHILP AR, GARCIA-FERNANDEZ JM, SONIBG, LUCAS RJ, BELLINGHAM J, FOSTER R G. Vertebrate ancient (VA) opsin and extraretinal photoreception in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol* 2000; **203 Pt 12**: 1925–1936.
- [71] POLANS A, BAEHR W, PALCZEWSKI K. Turned on by Ca<sup>2+</sup>! The physiology and pathology of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the retina. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 547–554.
- [72] PREMONT RT, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995; **9**: 175–182.
- [73] REIG JA, YU L, KLEINS DC. Pineal transduction. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5816–5824.
- [74] SCHNETKAMP PM, BASU DK., SZERENCSEI RT. Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in bovine rod outer segments requires and transports K<sup>+</sup>. *Am J Physiol* 1989; **257**: C153–C157.
- [75] SCHOMERUS CH, RUTH P, KORF HW. Photoreceptor-specific proteins in the mammalian pineal organ: immunocytochemical data and functional consideration. *Acta Neurobiol Exp* 1994; **54 (Suppl.)**: 9–17.
- [76] SEMPLE-ROWLAND SL, LARKIN P, BRONSON JD, NYKAMP K, STREIT WJ, BAEHR W. Characterization of the chicken GCAP gene array and analyses of GCAP1, GCAP2, and GC1 gene expression in normal and *rd* chicken pineal. *Molecular Vision* 1999; **5**, 14.
- [77] SHAAD NC, SHINOHARA T, ABE T, KLEIN DC. Photoneural control of the synthesis and phosphorylation of pineal MEKA (phosducin). *Endocrinology* 1991; **129**: 3289–3298.
- [78] SHICHIDA Y, IMAI H. Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell Mol Life Sci* 1998; **54**: 1299–1315.
- [79] TAKAHASHI JS. Circadian rhythms: from gene expression to behavior. *Curr Opin Neurobiol* 1991; **1**: 556–561.
- [80] TOSINI G, DOYLE S, GEUSZ M, MENAKER M. Induction of photosensitivity in neonatal rat pineal gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 11540–11544.
- [81] van VEEN T, OSTHOLM T, GIERSCHIK P, SPIEGEL A, SOMERS R, KORF HW, KLEIN DC.  $\alpha$ -Transducin immunoreactivity in retinae and sensory pineal organs of adult vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 912–916.
- [82] VENKATARAMAN V, NAGELER, DUDA T, SHARMA RK. Rod outer segment membrane guanylate cyclase type 1-linked stimulatory and inhibitory calcium signaling systems in the pineal gland: biochemical, molecular, and immunohistochemical evidence. *Biochemistry* 2000; **39**: 6042–6052.
- [83] VIGH B, VIGH-TEICHMANN I, ROHLICH P, AROS B. Immunoreactive opsin in the pineal organ of reptiles and birds. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1982; **96**: 113–129.

- [84] VIGH-TEICHMANN I, VIGH B, GERY I, van VEEN T. Different types of pinealocytes as revealed by immunoelectron microscopy of anti-S-antigen and antiopsin binding sites in the pineal organ of toad, frog, hedgehog and bat. *Exp Biol* 1986; **45**: 27–43.
- [85] WAINWRIGHT SD, WAINWRIGHT LK. Enzymes of guanine nucleotide metabolism and the diurnal cycle in cGMP content of the chick pineal gland. *Can J Biochem Cell Biol* 1983; **61**: 137–143.
- [86] WIECHMANN AF, HAMMARBACK JA. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding recoverin from human retina. *Exp Eye Res* 1993; **56**: 463–470.
- [87] YOSHIKAWA T, YASHIRO Y, OISHI T, KOKAME K, FUKADA Y. Immunoreactivities to rhodopsin and rod/cone transducin antisera in the retina, pineal complex and deep brain of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Zoolog Sci* 1994; **11**: 675–680.
- [88] ZAWILSKA JB. Kaskada wzbudzenia wzrokowego, czyli jak fotoreceptory reagują na światło. *Wszechświat* 1994; **95** (5): 120–123.
- [89] ZAWILSKA JB, NOWAK JZ. Przetwarzanie sygnału neuronalnego w rytmiczny sygnał hormonalny, czyli krótka historia o szyszynce ssaków jako transduktorze neuroendokryologicznym. *Wszechświat* 1997; **98** (4): 104–106.
- [90] ZHAO X, HAESELEER F, FARRIS RN, HUANG J, BAEHR W, MILAM AH, PALCZEWSKI K. Molecular cloning and localization of rhodopsin kinase in the mammalian pineal. *Vis Neurosci* 1997; **14**: 225–232.
- [91] ZHAO X, YOKOYAMA K, WHITTEN ME, HUANG J, GELB MH, PALCZEWSKI K. A novel form of rhodopsin kinase from chicken retina and pineal gland. *FEBS Lett* 1999; **254**: 115–121.

*Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska*

*Otrzymano: 01.06.2001 r.*

*Przyjęto: 31.08.2001 r.*

*Adres autorów: Zakład Amin Biogennych PAN,  
90-950 Łódź, ul. Tylna 3*



## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

### **j. polski**

Podstawy zagadnienia: jedno zdanie  
Podtytuły: do każdego podtytułu 3–5 zdań  
Wnioski: 2 zdania  
Słowa kluczowe: do 8 słów

### **j. angielski**

Background:  
Subtitles:  
Conclusions:  
Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2002 r.

---

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

---

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





Nr 1

W tym Zeszycie „Postępów Biologii Komórki”	1
Wykaz recenzentów z tomu 27, 2000 – Referee of the volume 27, 2000	1
BOBIŃSKI R., OLCZYK K., WISOWSKI G., JARCO K.: Gliplikany – The glypicans	3
SIMEONOVA E., MOSTOWSKA A.: Biochemiczne i molekularne aspekty starzenia się liści	17
Biochemical and molecular aspects of leaf senescence	17
KUKULSKI F., KOMOSZYŃSKI M.: Sygnałowa funkcja ATP w centralnym układzie nerwowym	33
Signal functions of ATP in the central nervous system	33
MILLER A., JĘDRZEJCZAK W. W.: Komórki dendrytyczne w immunoterapii	51
Dendritic cells for immunotherapy	51
KACZANOWSCY A. i J.: Mechanizmy przestrzennego różnicowania zarodka	69
Embryon spatial differentiation mechanisms	69
DOSZCZAK M. M., PIERZCHALSKI A., BIGDA J.: Mechanizmy sygnalizacji interleukiny 1	99
Mechanisms of interleukin 1 signal transduction	99
DRELA N.: Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej.	129
Zastosowanie i problemy	129
Detection of intracellular cytokines by flow cytometry: Application and problems	129
RADWAŃSKA K., KACZMAREK L.: Badania nad przekazywaniem informacji w układzie nerwowym	147
uhonorowane nagrodą Nobla 2000 z medycyny i fizjologii – Nobel Prize 2000 in Medicine	147
and Physiology for the studies on the signal transduction in the nervous system	147
Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 2000	153
Errata	155
Treść tomu 27, 2000 – Contents of the volume 27, 2000	157
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	

Nr 2

W tym Zeszycie	153
ZIELIŃSKA E., KOWALCZYK S.: Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego	155
Perception and transduction of auxin signal	155
SKUZA L. J.: Charakterystyka molekularna mitochondrialnego DNA żyta uprawnego ( <i>Secale cereale</i> L.)	185
Molecular characterisation of mitochondrial DNA of fall rye ( <i>Secale cereale</i> L.)	185
ROMAŃSKI K., BORODULIN-NADZIEJA L., ZABEL M.: Komórki rozrusznikowe	197
w przewodzie pokarmowym – Zależności struktury i funkcji	197
The pacemaking cells in the gastrointestinal tract – Structure - function relationships	197
KORTYLEWSKI M., MACKIEWICZ A.: Cytokiny i procesy przekazywania sygnału:	213
Grupa cytokin typu interleukinY-6 jako układ modelowy	213
Cytokines and signal transduction mechanisms: IL-6-type cytokines as a model system	213
WINNICKA A.: Cząsteczki różnicowania na powierzchni limfocytów przeżuwaczy	229
Cluster of differentiation on ruminant lymphocytes	229
PAPROCKA M., DUŚ D.: Niektóre cechy fenotypowe i czynnościowe komórek śródbłonnków	247
naczyniowych – Phenotypic and functional features of endothelial cells	247
KURLANDZKA A.: Tworzenie i rozpad kompleksu kohezyjnego chromatyd siostrzanych	261
Formation and decay of sister chromatid cohesion complex	261
PTAK K., LEWANDOWSKI M. H., MONTEAU R.: Neurokininy i ich receptory	273
Neurokinins and their receptors	273
Sprawozdanie Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za rok 1999	287
Komunikaty	290
Recenzenci tomu 26 z 1999 r.	290
Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK	291
Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	291

Nr 3

W tym zeszytcie PKB	296
KUBIAK J. Z.: Rak i cykl komórkowy – Cancer and cell cycle	297
LUBERDA Z.: Współczesne poglądy dotyczące wpływu reaktywnych form tlenu na funkcje plemników u ssaków Present conception regarding the effect of reactive oxygen species on functions of mammalian spermatozoa	309
WOJCIECHOWSKA M.: Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin – The symptoms of programmed cell death during plant development	317
JÓZEFOWSKI S., MARCINKIEWICZ J.: Biosynteza oraz właściwości immunomodulacyjne lipoksyn – metabolitów kwasu arachidonowego Biosynthesis and immunomodulatory properties of lipoxins – metabolites of arachidonic acid	335
KOSZAŁKA P., BIGDA J.: Wpływ czynnika martwicy nowotworu (TNF) na łożysko naczyniowe nowotworów Influence of tumor necrosis factor (TNF) on tumor vasculature	351
KRZEŚLAK A., LIPIŃSKA A.: Transport jądrowo-cytoplazmatyczny białek i kwasów rybonukleinowych – Nucleocytoplasmic transport of proteins and ribonucleic acids	373
WYROBIEC G., STĘPIEŃ M.: Mała tkanka – duża siła. Tkanka tłuszczowa brunatna: budowa, występowanie, znaczenie Small tissue – large strength. Brown adipose tissue: structure, existence and significance	395
TRZECIAK A.: Uszkodzenia DNA w komórkach ssaków DNA damage in mammalian cells	407
FIEDOROW P., PACAK A.: Wykorzystanie analizy sekwencji DNA w badaniach filogenetycznych i taksonomicznych mszaków Application of DNA sequence analysis to phylogenetic and taxonomic studies of bryophytes	431
ROSZEK K., GNIOT-SZULŻYCKA J.: Transport makromolekuł pomiędzy siateczką śródplazmatyczną a aparatem Golgiego. Rola pęcherzyków COPI i COPII oraz przedziału pośredniego Transport of macromolecules between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. The role of COPI- and COPII-coated vesicles and the intermediate compartment	443
Wskaźniki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	466

Nr 4

W tym zeszytcie PKB	469
Wykaz recenzentów z tou 28, 2001	470
DRAGAN M., ROLIŃSKI J.: Ocena długości telomerów i aktywności telomerazy za pomocą cytometrii przepływowej Flow cytometric analysis of telomere length and telomerase activity	471
DOMAGAŁA A., KURPISZ M.: Autoantygeny plemnikowe – I. Charakterystyka immunobiologiczna Sperm autoantigens – I. Immunobiological characterisation	483
DOMAGAŁA A., KURPISZ M.: Autoantygeny plemnikowe – II. Aspekty funkcjonalne i aplikacyjne Sperm autoantigens – II. Application and functional aspects	497
GRABOWSKA A., FILIPECKI M., LINKIEWICZ A.: Genetyczna regulacja embriogenezy u roślin Genetic regulation of plant embryogenesis	509
CIEŚLAK D.: Komórki satelitarne mięśni szkieletowych – Satellite cells of the skeletal muscle	529
TRZECIAK A., MAŁECKA-PANAS E., ROMANOWICZ-MAKOWSKA E., KULIG A.: Etanol i aldehyd octowy: Udział w procesach mutagenozy i karcynogenezy Ethanol and acetaldehyde: Participation in mutagenesis and carcinogenesis	543
KUŹNIAK W., JABŁOŃSKI J.R., OCZERETKO E., KASACKA I.: Wymiar fraktalny w morfologii nowotworów – Fractal dimension in morphology of neoplasmas	561
DEJDA A., GORCZYCA W.A.: Zmiany ewolucyjne układu otorecepcyjnego szyszynki kręgowców Evolutionary changes of vertebrate pineal photoreception system	571
Wskaźniki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	



# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie 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 wystąpienia do redakcji);

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

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 160) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana 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 rycin. 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 rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, 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 niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. 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 koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja rezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

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

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

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

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PKB	469
Wykaz recenzentów z tou 28, 2001	470
DRAGAN M., ROLIŃSKI J.: Ocena długości telomerów i aktywności telomerazy za pomocą cytometrii przepływowej	471
Flow cytometric analysis of telomere length and telomerase activity	471
DOMAGAŁA A., KURPISZ M.: Autoantygeny plemnikowe – I. Charakterystyka immunobiologiczna	483
Sperm autoantigens – I. Immunobiological characterisation	483
DOMAGAŁA A., KURPISZ M.: Autoantygeny plemnikowe – II. Aspekty funkcjonalne i aplikacyjne	497
Sperm autoantigens – II. Application and functional aspects	497
GRABOWSKA A., FILIPECKI M., LINKIEWICZ A.: Genetyczna regulacja embriogenezy u roślin – Genetic regulation of plant embryogenesis	509
CIEŚLAK D.: Komórki satelitarne mięśni szkieletowych	529
Satellite cells of the skeletal muscle	529
TRZECIAK A., MAŁECKA-PANAS E., ROMANOWICZ-MAKOWSKA E., KULIG A.: Etanol i aldehyd octowy: Udział w procesach mutagenezy i karcynogenezy	543
Ethanol and acetaldehyde: Participation in mutagenesis and carcinogenesis	543
KUŹNIAK W., JABŁOŃSKI J.R., OCZERETKO E., KASACKA I.: Wymiar fraktalny w morfologii nowotworów	561
Fractal dimension in morphology of neoplasmas	561
DEJDA A., GORCZYCA W.A.: Zmiany ewolucyjne układu otorepcyjnego szyszynki kręgowców	571
Evolutionary changes of vertebrate pineal photoreception system	571
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK	589

**Warunki prenumeraty kwartalnika PBK**

***Prenumerata na rok 2002***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2002 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001. Cena prenumeraty rocznika na rok 2002: dla instytucji (bibliotek) wynosi 90 zł, a dla odbiorców indywidualnych 30 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2002 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001. Price per year 20 dollars USA.

**Indeks 369705**