

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

GENETYKA W MEDYCYNIE



Tom 43

WARSZAWA 1994

Numer 3/4 (224-225)

Prenumeratę, jak również sprzedaż pojedynczych zeszytów *KOSMOSU* prowadzi, oprócz Wydawcy — **MAWI**, także firma **AMOS**, 01-806 Warszawa, ul. Zuga 12. Koszt prenumeraty w 1995 r. wynosi 280 tys. zł.

Zlecenie dostawy za granicę jest o 100 procent droższe. W przypadku życzenia dostaw drogą lotniczą zamawiający pokrywa dodatkową opłatę.

Wpłaty są przyjmowane na konto firmy **AMOS**:

PKO VIII O/W-wa Nr 1586-77578-136, z dopiskiem na blankiecie tytułu i okresu prenumeraty, a w przypadku pojedynczych zeszytów numeru tomu i zeszytu.

POLSKIE TOWARZYSTWO PRZYRODNIKÓW im. KOPERNIKA

Tom 43

Numer 3/4 (224-225)

KOSMOS

Rok założenia 1876

WARSZAWA 1994

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (wiceprzewodniczący), WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
WŁODZIMIERZ OSTROWSKI, HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (przewodniczący), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI (zastępca redaktora naczelnego), LUCYNA GRĘBECKA, WŁODZIMIERZ MICHAJŁOW,
KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI (redaktor naczelny),
BARBARA BIERZYŃSKA (sekretarz)

REDAKTOR ZESZYTU

JERZY NOWAK

ADRESY REDAKCJI

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Redaktor Naczelny
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel. 658-47-29

Sekretarz
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa
tel. 29-32-21 wew. 24

Wydano z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych

Nr indeksu 362808

PL ISSN 0023-4249

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

Warszawa, ul. Złota 60/28

Druk: Drukarnia Nr 1, Rakowiecka 37, Warszawa

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK ☐

NIE ☐

ROCZNA ☐

PÓŁROCZNA ☐

LICZBA EGZ. 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

CZASOPISMO NASZE JEST DOSTĘPNE GŁÓWNIEM W PRENUMERACIE

ZNACZENIE I PERSPEKTYWY GENETYKI W ROZWOJU NAUK MEDYCZNYCH

Przez dziesiątki lat badania genetyczne człowieka były bardzo ograniczone ze względu na brak odpowiednich metod badawczych. W ostatnich kilkunastu latach obserwujemy bardzo szybki rozwój genetyki medycznej dzięki całkowicie nowym metodom badawczym. Informacja genetyczna człowieka jest zlokalizowana w 46 chromosomach, występujących praktycznie we wszystkich komórkach naszego organizmu. Całość genomu człowieka tworzy łańcuch DNA o długości 3 mld par nukleotydów. Z tej olbrzymiej liczby tylko bardzo niewielka część — około kilka procent genomu jest odpowiedzialna za kodowanie genów strukturalnych, których liczba jest oceniana szacunkowo na około 50 tys. Większą część genomu stanowią sekwencje niekodujące, występujące jako introny lub sekwencje powtarzalne o w pełni jeszcze nie poznanej funkcji.

Dynamiczny rozwój nowoczesnych technik genetyki molekularnej stworzył jakościowo nowe możliwości poznania chorób genetycznie uwarunkowanych, ich diagnostyki i leczenia. Rozwój technik inżynierii genetycznej został zapoczątkowany wykryciem enzymów restrykcyjnych, posiadających zdolność do cięcia DNA w ściśle określonych miejscach. Badania genów człowieka umożliwiają różne metody analizy DNA z klonowaniem i sekwencjonowaniem włącznie. Jednakże prawdziwym przełomem w badaniach genomu człowieka stało się odkrycie i wprowadzenie techniki opartej na łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (polymerase chain reaction — PCR). Jej odkrywca, Kary Mullis, został uhonorowany Nagrodą Nobla w 1993 roku. Wykorzystanie techniki PCR w badaniach podstawowych i diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie stwarza możliwość badania pojedynczych genów człowieka stosunkowo prostymi sposobami. Genialność techniki PCR polega na możliwości wybrania i wielomilionowego namnożenia pojedynczego genu lub jego fragmentu z całego genomu. Czułość tej metody można porównać do przysłowiowego szukania igły w stogu siana z tym, że PCR pozwala na jej precyzyjne odnalezienie i zbadanie. Ogólnie można powiedzieć, że inżynieria genetyczna posiada potencjalnie wręcz trudne do wyobrażenia, a nawet zaakceptowania zastosowania praktyczne nie tylko w medycynie, ale również w biologii, rolnictwie i przemyśle. W naukach medycznych genetyka molekularna stwarza całkowicie nowe możliwości badania etiopatogenezy wielu chorób, nie tylko uwarunkowanych genetycznie.

Medycyna praktyczna bardzo szybko wykorzystwała zdobycze genetyki. Dynamicznie rozwijająca się diagnostyka prenatalna jest tego dobitnym przykładem o czym pisze JACEK ZAREMBA w artykule *Diagnostyka prenatalna*. Głównym celem diagnostyki prenatalnej jest wczesne rozpoznawanie chorób i wad rozwojowych płodu. Początkowo do badań prenatalnych pobierano płyn owodniowy i zawarte w nim komórki pochodzenia płodowego, między innymi złuszczone komórki przewodu pokarmowego i moczowego. Od kilkunastu lat do badań prenatalnych są pobierane komórki trofoblastu. Badanie polega na pobraniu niewielkiej ilości kosmówki, która stanowi wystarczający materiał do podstawowych badań cytogenetycznych i biochemicznych bez konieczności prowadzenia uciążliwej i długotrwałej hodowli komórek *in vitro*. Z pobranego materiału można również izolować DNA w celu przeprowadzenia diagnostyki molekularnej wybranych chorób uwarunkowanych genetycznie. Badania prenatalne są wskazane w różnych sytuacjach, w których istnieje ryzyko urodzenia dziecka chorego. W około 97% przypadków wynik badań prenatalnych wskazuje na prawidłowo rozwijający się płód. Prawidłowy wynik badania prenatalnego szczególnie u ciężarnych z nasiloną nerwicą lękową uwalnia je od strachu przed urodzeniem uszkodzonego dziecka i tym samym przyczynia się do uchronienia ciąży. Pomimo dużych możliwości rozpoznawania wielu chorób i zaburzeń, jeszcze przed urodzeniem dziecka, co w wielu przypadkach umożliwiłoby wczesne wdrożenie leczenia, diagnostyka prenatalna jest wykonywana w Polsce na bardzo małą skalę i zaledwie w kilku ośrodkach. Z drugiej strony postęp na świecie jest tak duży, że została już zapoczątkowana diagnostyka przedimplantacyjna, polegająca na rozpoznawaniu defektów genetycznych na podstawie badania pojedynczej komórki pobranej z rozwijającego się zarodka przed jego wszczepieniem do jamy macicy.

Genetyka człowieka przez wiele lat była w dużym stopniu oparta na klasycznych badaniach cytogenetycznych, które aktualnie zostały zdominowane przez badania molekularne. Frapującym problemem o dużych implikacjach praktycznych zarówno dla cytogenetyki, jak i genetyki molekularnej są nadal chromosomy płciowe. Artykuł BOGDANA KAŁUŻEWSKIEGO pod tytułem: *Czy chromosomy płciowe są nam potrzebne?* skłania do szeregu refleksji. Pomimo, że poczucie przynależności płciowej jest całkowicie oczywiste, to jednak problem identyfikacji płci nie jest ani łatwy, ani jednoznacznie określony. Płeć możemy określać jako chromosomową, związaną z występowaniem w jądrach komórkowych u kobiet grudek chromatyny X, a u mężczyzn grudek chromatyny Y; płeć gonadalną określoną obecnością pierwotnej gonady; płeć endokrynną zdeteminowaną występowaniem określonych hormonów płciowych; płeć fenotypową określoną przez wewnętrzne i zewnętrzne narządy płciowe; płeć metrykalną będącą cywilno-prawną konsekwencją płci fenotypowej oraz płeć psychologiczną obejmującą sferę psycho-seksualną i psycho-społeczną. Autor opisuje wręcz spektakularny wyścig o pierwszeństwo w opisanii genu determinującego rozwój pierwotnej gonady. Obecnie jesteśmy w stanie lepiej zrozumieć mechanizm determinacji płci, ale jednocześnie istnieje możliwość udziału innych jeszcze genów w prawidłowej determinacji płci. Jak wiele pozostało jeszcze do zrobienia pokazuje przykład od wielu lat badanego antygeny H-Y, dla którego gen strukturalny nie został do tej pory zlokalizowany. Na pytanie zawarte w tytule pracy

należy odpowiedzieć twierdząco: prawidłowy rozwój mężczyzny jest związany z prawidłowym kariotypem 46,XY, a kobiety 46,XX.

Rozpoznawanie wielu chorób genetycznych nie byłoby możliwe bez badań molekularnych. Klasyczna analiza cytogenetyczna chromosomów pozwala jedynie na wykrywanie tych zaburzeń genetycznych, które są spowodowane defektami genetycznymi mającymi swoje odzwierciedlenie w aberracjach chromosomów. Większość z ponad 5 tys. schorzeń uwarunkowanych genetycznie jest spowodowana zaburzeniami, których wykrywanie nie jest możliwe poprzez prostą analizę kariotypu. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a stanowi dobry przykład wykorzystania badań molekularnych w precyzyjnym określeniu rodzaju defektu genetycznego. Dystrofia Duchenne'a jest spowodowana mutacjami największego z dotąd poznanych genów człowieka. Gen *DMD* (Duchenne'a muscular dystrophy) o wielkości 2,5 mln nukleotydów, jest złożony z 78 eksonów, poprzedzielanych intronami średniej wielkości 35 kb i jest zlokalizowany na chromosomie X. Pozbawiony intronów cDNA jest stosunkowo mały, złożony z ponad 13 tys. nukleotydów, z czego około 11 tys. koduje białko — dystrofinę. *DMD* jest chorobą letalną występującą z częstością 1 na 3500 noworodków płci męskiej. W około 70% przypadków *DMD* jest spowodowana występującymi w genie *DMD* delecjami, które można wykrywać używając techniki multiplex PCR z zastosowaniem 21 par primerów. W swojej pracy *Diagnostyka molekularna dystrofii mięśniowej* JOLANTA KWIATKOWSKA, DOBRAWA LISIECKA, RYSZARD SŁOMSKI BARBARA SIEMIENIAKO, JADWIGA SOWIŃSKA, BOŻENA GALAS-ZGORZALEWICZ, EWA EMICH-WIDERA, ELŻBIETA MARSZAŁ i TADEUSZ CIESIELSKI omówili nie tylko różne aspekty diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a i Beckera, ale również możliwości określania nosicielstwa genu z defektem w badanej rodzinie poprzez analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych produktu PCR oraz sekwencji mikrosatelitarnych, zlokalizowanych wewnątrz genu *DMD*. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości będzie możliwe dokładne ustalanie nosicielstwa poprzez badanie sekwencji mikrosatelitarnych, sprzężonych z występowaniem określonych mutacji w genie *DMD*.

Wybrane aspekty zależności fenotypu od występującego genotypu w mukowiscydozie zostały omówione w artykule MICHAŁA WITTA *Wybrane aspekty zależności genotyp — fenotyp w mukowiscydozie*. Mukowiscydoza (cystic fibrosis — CF) jest chorobą recesywną, autosomalną występującą z częstością 1 na 2500 urodzeń. Gen, którego defekt jest odpowiedzialny za mukowiscydozę występuje na 7 chromosomie i został sklonowany oraz zsekwencjonowany. Jest rzeczą zdumiewającą, że ta ciężka choroba genetyczna jest spowodowana przeszło 400 różnymi mutacjami, determinującymi w pewnym stopniu obraz kliniczny. Niestety, nie ma prostej relacji genotyp — fenotyp, a sama choroba jest bardzo heterogenna. Próby korelacji, na przykład, zaburzonej funkcji układu oddechowego lub podatności na infekcje bakteryjne z poszczególnymi mutacjami nie są jednoznaczne. Różnorodność fenotypów, mających związek z mutacjami w genie *CFTR*, sugeruje występowanie odmiennego obrazu klinicznego tej samej choroby.

Praca JERZEGO BALA i DOROTY MACIEJKO *Mukowiscydoza od genu do terapii* omawia zasady dziedziczenia, epidemiologię mukowiscydozy, strukturę i funkcję genu *CFTR* oraz diagnostykę molekularną. Autorzy dyskutują kwestię weryfika-

cji rozpoznania klinicznego poprzez badania na poziomie molekularnym. Przedstawiają zasady oznaczania nosicielstwa mutacji w genie *CFTR* oraz diagnostykę prenatalną mukowiscydozy. Na zakończenie omawiają próby zastosowania terapii genowej w leczeniu tego ciężkiego schorzenia.

Fenyloketonuria jest częstą chorobą genetyczną, występującą kilkakrotnie rzadziej niż mukowiscydoza. Stanowi przykład choroby uwarunkowanej genetycznie, która może być skutecznie leczona dietą ubogą w fenyloalaninę. Leczenie może być wcześniej wdrożone, dzięki wykrywaniu tej ciężkiej choroby powszechnie stosowanym u noworodków testem Guthriego. Szybkie wdrożenie diety ubogiej w fenyloalaninę wyeliminowało najważniejszy objaw kliniczny fenyloketonurii, to jest ciężkie upośledzenie umysłowe. U chorych dzieci, pomimo leczenia, obserwuje się trudności w uczeniu się, mogą też występować pewne zaburzenia psychiczne. JADWIGA JARUZELSKA w swym artykule *Fenyloketonuria — od genotypu do kliniki* omówiła mutacje warunkujące fenyloketonurię, zróżnicowany obraz kliniczny tej choroby, problemy opieki nad dziećmi z fenyloketonurią oraz poszukiwanie nowych form terapii.

Molekularne podłoże stosunkowo rzadko występującego genetycznie uwarunkowanego zespołu Huntera opisała EWA POPOWSKA — *Molekularne podłoże zespołu Huntera*. Zespół ten w postaci ciężkiej charakteryzuje się głębokim upośledzeniem umysłowym i znacznymi zmianami w układzie krążenia i kostno-stawowym, zwykle kończy się zgonem przed 15 rokiem życia. W postaci łagodnej nie dochodzi do zaburzeń rozwoju umysłowego, a zmiany w narządzie ruchu i układzie krążenia są mniej nasilone. W pewnym uproszczeniu można przyjąć, że delecje całego lub fragmentu genu, insercje zmieniające ramkę odczytu, mutacje punktowe w rejonach konserwatywnych lub w rejonach unikalnych oraz mutacje wprowadzające kodon terminalny, szczególnie w początkowym rejonie transkryptu, są odpowiedzialne za ciężką postać choroby. Natomiast mutacje wywołujące zmiany w czynnościowo mniej ważnych rejonach białka są związane z łagodną postacią choroby. Możliwości terapeutyczne zespołu Huntera są ograniczone do stosowania odpowiedniej rehabilitacji ruchowej, treningu umysłowego i doraźnego leczenia farmakologicznego.

Zaburzenia genu kodującego alfa-1-antytrypsynę mogą prowadzić do rozwoju marskości wątroby i rozedmy płuc. Autorki: ANNA KOWALSKA i BOŻENA PIŁACIK — *Niedobór alfa-1-antytrypsyny* — przedstawiły molekularne podłoże niedoboru alfa-1-antytrypsyny oraz rolę tego enzymu w patogenezie chorób wątroby i płuc. Wskazały również na znaczenie niedoboru alfa-1-antytrypsyny w reumatoidalnym zapaleniu stawów oraz w patogenezie niektórych chorób skóry o nie wyjaśnionej w pełni etiologii. Obniżenie poziomu alfa-1-antytrypsyny, która jest inhibitorem szeregu proteaz zwiększa ryzyko chorób płuc nie tylko u homozygot, ale również u heterozygot, szczególnie po ekspozycji na działanie dymu papierosowego oraz innych szkodliwych czynników inaktywujących działanie alfa-1-antytrypsyny. Stosowane leczenie polega na podawaniu preparatu alfa-1-antytrypsyny. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości zaistnieje możliwość zastosowania terapii genowej w tej ciężkiej chorobie.

Cukrzyca typu I, tak zwana insulinozależna, jest przykładem choroby uwarunkowanej wieloczynnikowo, w której rozwoju istotną rolę odgrywa wiele genów. W swojej pracy *Cukrzyca insulinozależna — skomplikowany przykład*

choroby uwarunkowanej wieloczynnikowo MAŁGORZATA JUNGEMAN dokonała przeglądu wyników badań nad poznaniem uwarunkowań genetycznych w cukrzycy insulinozależnej. Autorka zwróciła uwagę na złożoność czynników prowadzących do zachorowania na cukrzycę oraz na praktyczne znaczenie badań zmierzających do wczesnego wykrycia osób podatnych na tę chorobę. Identyfikacja zarówno czynników genetycznych oraz środowiskowych może w przyszłości pozwolić na wczesne zapobieganie rozwojowi cukrzycy.

Badania DNA posiadają nie tylko istotne znaczenie w poznawaniu zaburzeń molekularnych prowadzących do wystąpienia choroby genetycznej, lecz również odgrywają coraz większą rolę w diagnostyce molekularnej. Diagnostyka molekularna znajduje coraz szersze zastosowanie nie tylko w różnych dziedzinach medycyny, ale także w biologii. Doskonałym przykładem postępu diagnostyki molekularnej i jej wykorzystania w praktyce jest dochodzenie spornego ojcostwa opisane przez RYSZARDA SŁOMSKIEGO, JOLANĘ KWIATKOWSKĄ, HANĘ CHLEBOWSKĄ, BARBARĘ SIEMIENIAKO i MAGDALENĘ SŁOMSKĄ w artykule *Polimorficzne sekwencje DNA i ich zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa*. Potrzeba określenia spornego ojcostwa występuje nie tylko w sprawach sądowych, lecz jest niezbędna w wybranych badaniach z zakresu poradnictwa genetycznego, diagnostyki prenatalnej i transplantologii. Klasyczna metoda identyfikacji osobniczej, wprowadzona przez Jeffreys'a, znalazła szybkie wykorzystanie w praktyce i pod nazwą DNA fingerprinting jest obecnie szeroko stosowana w diagnostyce molekularnej. Aktualnie badania DNA fingerprinting można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwszą z nich stanowi analiza pojedynczego locus, druga obejmuje jednoczesną analizę wielu loci. Wnioski co do identyfikacji lub pokrewieństwa badanych osób w sprawach o ustalenie ojcostwa są formułowane na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. R. Słomski i współautorzy w swojej pracy dokonali krytycznego przeglądu technik stosowanych w dochodzeniu spornego ojcostwa, zwracając uwagę na pewne ograniczenia i trudności interpretacyjne uzyskiwanych wyników.

HENRYK HÜBNER i ANNA MORDARSKA opisują w swojej pracy *Genomowy imprinting u człowieka* obecnie bardzo atrakcyjny problem genomowego imprinting'u, dla którego proponują polską nazwę — „genomowe piętno rodzicielskie”. To wrodzone piętno wywiera wpływ na ekspresję homologicznych alleli lub regionów chromosomów dziedziczonych od każdego z rodziców. Istnieje szereg dowodów na to, że chromosomy lub geny mogą „zapamiętać” swoje rodzicielskie pochodzenie. U niektórych organizmów konsekwencją genomowego piętna rodzicielskiego jest odwracalna utrata aktywności jednej z dwu homologicznych sekwencji DNA. W ujęciu genetycznym efekt imprintingu jest równoznaczny z homozygotycznością w określonym locus lub zespole loci. Genomowe piętno rodzicielskie nie podważa praw Mendla, lecz wyjaśnia obserwowane od nich odstępstwa. Geny autosomalne pochodzące od matki i ojca w trakcie rozwoju zarodka ulegają zróżnicowanej ekspresji niezbędnej dla prawidłowego rozwoju organizmu. W warunkach patologicznych komórki embrionalnego nowotworu — zaśniadu groniastego rozwijającego się z kosmówki — posiadają 46 prawidłowych chromosomów, które w całości są pochodzenia ojcowskiego. W genetycznie przeciwnym przypadku, w którym wszystkie chromosomy są pochodzenia matczynego, powstaje nowotwór zwany potworniakiem jajnika. Wyżej wspomniane nowotwo-

ry pochodzą z diploidalnego, partenogenetycznego wzrostu komórek bądź ojcowskich, bądź matczynych. Cytogenetycznym dowodem genomowego imprintingu jest występowanie uniparenteralnej disomii. Zdarza się czasami, że przy całkowicie prawidłowym kariotypie cecha sprzężona z płcią jest przenoszona z ojca na syna, a nie na córkę. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że chromosomy X i Y zygoty pochodzą od ojca, a komórka jajowa nie miała chromosomu płci. Znaczenie uniparenteralnej disomii w genetycznym uwarunkowaniu powstawania wad rozwojowych znajduje potwierdzenie w zespole Angelmana, spowodowanego delecją części matczynego chromosomu 15 i fenotypowo różnym zespole Pradera-Willi'ego, uwarunkowanym delecją chromosomu 15 pochodzenia ojcowskiego. Postulowane molekularne mechanizmy rodzicielskiego piętna genomowego są związane z procesem metylacji podczas podziałów mitotycznych, poprzedzających mejozę lub w samej mejozie. Metylacja wywiera wpływ na konfigurację chromatyny i raz wprowadzona podczas gametogenezy mogłaby być powielana aż do chwili aktywacji danego genu.

Obecnie coraz więcej wyników badań wskazuje na duży udział zaburzeń genetycznych w rozwoju procesu nowotworowego. DANUTA ROŻYNKOWA omawia w swej pracy *Perspektywy genetycznych badań nowotworów — odkrycia i wizje* wybrane wyniki badań cytogenetycznych w białaczkach i chłoniakach, które stanowiły pierwszy etap do poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za zjawiska nowotworzenia. Szczególną uwagę zwraca na zaburzenia komórkowych onkogenów i genów przeciwnowotworowych odgrywających znamionną rolę w nowotworach. Autorka wyraża pogląd, że badania cytogenetyczne i molekularne uzupełniają, ale nie zastępują patomorfologii w dziedzinie diagnostyki nowotworów. Istota badań molekularno-genetycznych polega bowiem na wykrywaniu nie znanych przedtem mechanizmów odpowiedzialnych za deregulację kontroli transkrypcyjnej i autonomii wzrostu komórek.

Znaczne rozwinięcie problematyki onkogenów i genów przeciwnowotworowych przedstawił w swojej pracy ANTONI HORST — *Produkty genów przeciwnowotworowych*. Obecnie jest poznanych ponad 100 onkogenów i około 50 anty-onkogenów. Aktualnie przyjmuje się, że rozwój nowotworu zależy z jednej strony od nadmiaru czynników pobudzających wzrost, czyli onkogenów zarówno ustrojowych, jak i pozaustrojowych, z drugiej zaś strony od niedoboru lub utraty produktów genów przeciwnowotworowych. Cechą charakterystyczną każdego nowotworu jest nie kontrolowana proliferacja komórek, przebiegająca w zaburzonym cyklu komórkowym. W warunkach prawidłowych cykl komórkowy znajduje się pod ścisłą kontrolą mechanizmów regulacyjnych. Kluczową rolę w poszczególnych fazach cyklu życiowego odgrywają czynniki mające związek z produktami onkogenów i genów przeciwnowotworowych. Poznanie skomplikowanych mechanizmów regulujących cykl komórkowy posiada istotne znaczenie w wypracowaniu nowych rozwiązań w terapii nowotworów.

Rozwój nowotworu jest również uwarunkowany osobniczo zmiennym metabolizmem chemicznych karcynogenów oraz procesem reparacji DNA. ANDRZEJ L. PAWLAK w artykule *Dziedziczne podatności na nowotwory i czynniki wpływające na ryzyko zachorowania* i KRZYSZTOF SZYFTER w artykule *Zróźnicowanie procesu naprawy DNA w normie i patologii człowieka* omawiają problem dziedzicznej podatności na nowotwory i czynniki wpływające na ryzyko zachorowania.

Z uwagi na możliwość wczesnego wdrożenia postępowania profilaktycznego praktyczne znaczenie tego problemu dla osób podatnych na nowotwory jest ogromne. Uwarunkowania podłoża genetycznej wrażliwości na nowotwory mają charakter subtelny, często trudny do określenia. Genetyczna wrażliwość na wybrane karcynogeny środowiskowe nie jest jeszcze w pełni poznana. Wiadomo, że genetycznie uwarunkowany polimorfizm może oddziaływać na etapie powstawania uszkodzeń DNA, naprawy tych uszkodzeń oraz kontroli proliferacji zmienionych komórek. Z kolei zaburzenia reparacji DNA jako podstawową przyczynę podatności na nowotwory stwierdza się głównie w zespole Fanconiego, *xeroderma pigmentosum* i w *ataxia telangiectasia*. Ze względu na powiązanie defektu zaburzeń reparacji DNA z wrażliwością na określone czynniki genotoksyczne również bezobjawowi nosiciele genów wyżej wspomnianych zespołów mogą oznaczać się zwiększoną zachorowalnością na nowotwory w wyniku ekspozycji na określone czynniki genotoksyczne. Zróżnicowanie procesu naprawy DNA w populacji ludzkiej dotyczy zarówno poziomu całego genomu, fragmentów DNA, a nawet pojedynczych genów. Naprawa DNA przebiega ze zróżnicowaną wydajnością w różnych częściach genomu. Sprawność tego procesu obniża się wraz z wiekiem, co koreluje ze zwiększoną częstością występowania chorób nowotworowych w starszym wieku. Praktycznie, wczesne rozpoznanie podatności na raka jelita grubego jest możliwe u osób obciążonych tak zwaną rodzinną polipowatością jelita grubego. Rozpoznanie takie może nastąpić jeszcze przed wystąpieniem polipów w śluzówce jelita grubego, co otwiera nowe możliwości zapobiegania transformacji nowotworowej przy użyciu leków przeciwnowotworowych. Ze sprawą podatności na nowotwory wiąże się problem genetycznego zróżnicowania populacji w aspekcie dopuszczalnych ekspozycji na czynniki genotoksyczne.

MARIA SASIADEK i JÓZEF JAGIELSKI — *Biologiczne skutki działania czynników mutagennych* omawiają biologiczne skutki działania czynników mutagennych, zależnych w dużym stopniu od etapu rozwoju zarodka. Pierwsze 10–14 dni po okresie zapłodnienia, czyli w okresie przedimplantacyjnym, zapłodniona komórka jajowa jest stosunkowo mało wrażliwa na działanie czynników zewnętrznych. Jeśli jednak ulegnie uszkodzeniu dochodzi zwykle do jej obumarcia. W okresie organogenezy płód jest najbardziej wrażliwy na działanie teratogenne. W zależności od momentu zadziałania szkodliwego czynnika może dojść do uszkodzenia różnych narządów. Działanie związków mutagennych na komórki somatyczne po 8 tygodniu ciąży może prowadzić do ich transformacji nowotworowej. W swoim artykule autorzy rozważają problem dokładnego poznania właściwości mutagennych i kancerogennych substancji chemicznych wprowadzanych do środowiska w związku z rozwojem przemysłu, a także wykrywania wczesnych efektów biologicznych działania tych związków na człowieka w ramach tak zwanego monitorowania biologicznego.

Szybki rozwój technologii transferu genu sprawił, że obecnie możemy mówić — JERZY NOWAK w artykule *Postępy terapii genowej chorób dziedzicznych* — o pierwszych pozytywnych wynikach terapii genowej chorób dziedzicznych. Wydaje się, że w przyszłości terapia genowa będzie stanowić leczenie przyczynowe niektórych chorób dziedzicznych, głównie jednogenowych. Trzeba zdać sobie sprawę, że terapia genowa dopiero zaczyna się rozwijać. Obecnie nie możemy

jeszcze stwarzać nadziei ciężko chorym na skuteczne wyleczenie za pomocą tej nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że terapia genowa będzie stawała się w przyszłości coraz powszechniejszą i skuteczniejszą formą leczenia i zapobiegania wielu chorobom.

Geny Lureli

GENETICS IN DEVELOPMENT OF MEDICAL SCIENCES. IMPORTANCE AND PERSPECTIVES

Genetic studies concerning humans were for several decades very limited because of the lack of appropriate experimental research methods. Within the last several years medical genetics has been developing rapidly due to introduction of entirely new research techniques. Human genetic information is contained in 46 chromosomes which occur in practically all the cells of our organisms. The whole human genome consists of a DNA composed of 3 milliard pairs of nucleotides. Only a small part of the genome, not exceeding a few percent, is engaged in coding of structural genes, the number of which is estimated at about 50 thousand. The major part of the genome consists of non-coding sequences: introns or repetitive sequences, the function of which has not been so far established.

The dynamic development of new techniques of molecular genetics has created qualitatively new possibilities for gaining knowledge of genetic diseases, as well as for diagnosis and therapy. Development of the genetic engineering techniques began by the discovery of restriction enzymes which are able to cut DNA at precisely defined sites. Studies on human genes became possible due to progress in various methods of DNA analysis, including cloning and sequencing. However, the discovery and bringing into practice the polymerase chain reaction, (PCR) constituted the real turning point. The author of the PCR technique, Kary Mullis, was awarded the Nobel Prize in 1993. The use of PCR in basic research and for diagnosis of genetic diseases gives the possibility of studying, by a relatively simple technique, of even a single human gene.

The exceptional value of the PCR technique consists in its making possible isolation and several-million-fold amplification of a single gene or its fragment. This task can be compared to the proverbial looking for a needle in a haystack, sensitivity of PCR permitting to find it with great precision and, moreover, to study it. Generally speaking, the range of possible practical applications of genetic engineering, not only in medicine but also in biology, agriculture and industry, is difficult to imagine and, may be, also difficult to accept. As concerns medical sciences, molecular genetics creates completely new possibilities of studying the ethiopathogenesis of several diseases, not only those caused by genetic defects.

Medical practice has taken advantage of the achievements of genetics very rapidly. As a particularly good example can serve prenatal diagnosis: JACEK ZAREMBA, *Prenatal diagnosis*. The main aim of this method is to make possible early diagnosis of diseases and developmental defects in the foetus. Initially, prenatal diagnosis was performed using the amniotic fluid and the cells of foetal origin present in this fluid, inter alia, the desquamated cells of the gastrointe-

stinal and urinary tracts. Within the last dozen years they became superseded by trophoblast cells. The test consists in withdrawing a small amount of chorion, sufficient for basic cytogenetic and biochemical studies, and the PCR method eliminates the necessity of tedious culturing of the cells *in vitro*. It is also possible to isolate, from the withdrawn material, the DNA for molecular testing for selected genetic defects. It is advisable to make prenatal diagnosis in various situations when there is a risk of a woman giving birth to a diseased child. In about 97% of the cases the results of prenatal diagnosis point to normal development of the foetus. Such a favorable result, especially in the case of a pregnant woman suffering from severe anxiety neurosis liberates her from the fear of giving birth to an abnormal child and contributes in this way to maintenance of the pregnancy. It is possible at present to diagnose several diseases and defects even before the birth of the child and in many cases this might permit early beginning of the treatment. Despite their advantages, the prenatal diagnosis tests are made in Poland only on a very small scale and but in a few medical centers. On the other hand, in the leading foreign laboratories the progress is so great that attempts have been made at preimplantation diagnosis which consists in diagnosing genetic effects on the basis of testing a single cell withdrawn from a developing embryo prior to its implantation into the uterus.

For a long time human genetics has been based to a large extent on classical cytogenetic studies, at present, however, molecular studies begin to predominate. Both for cytogenetics and molecular genetics sex chromosomes continue to present a challenging problem of great practical significance. The paper by BOGDAN KALUŻEWSKI entitled *Do we need sex chromosomes* provokes many reflections. Although the feeling of one's sexual identity is usually quite obvious to the person concerned, the problem of sexual differentiation and identification is neither simple nor unequivocally formulated. Sex can be defined as: chromosomal, related to the occurrence in cell nuclei of sex chromatin X in a woman, and of sex chromatin Y in a man; gonadal sex defined by the presence of a primary gonad; endocrinological sex determined by the activity of particular sex hormones; phenotypic sex defined according to the internal and external sex organs present; and psychological sex comprising the psycho-sexual and psycho-social spheres. The author describes the most spectacular race for priority in identifying the genes which determine development of the primary gonad. So far, we have gained better understanding of the sex determination mechanism, however, one should consider simultaneously possible involvement of still other genes in normal sex differentiation. To see how much remains to be done, take for example antigen H-Y for which, after so many years of research, the structural gene has not been located. To the question posed in the title of BOGDAN KALUŻEWSKI'S paper the answer should be in the affirmative: a normal karyotype 46,XY or 46,XX is indispensable for normal development of a man or a woman, respectively.

It would not be possible to diagnose several genetic diseases without taking advantage of molecular studies. The classical cytogenetic analysis of chromosomes permits to detect only the genetic disturbances due to those genetic defects which are related to chromosome aberrations. The majority of the five thousand

genetic diseases are undetectable by the simple analysis of the karyotype. Duchenne muscular dystrophy can serve as a good example of usefulness of molecular studies for precise determination of the genetic defect. Duchenne dystrophy is caused by mutations in the largest human gene so far known, the *DMD* (Duchenne muscular dystrophy) gene. It is 2.5 million nucleotides in length, is composed of 78 exons interspersed with introns, on average of 25 kb, and is located on chromosome X. cDNA deprived of introns is of a rather small size being composed of over 13 thousand nucleotides, of which about 11 thousand code for a protein called dystrophin. *DMD* is lethal disease encountered at a frequency of 1 per 3500 male newborns. In about 70% of the cases it is caused by deletions in the *DMD* gene, which can be detected by multiplex PCR technique using 21 pairs of primers. JOLANTA KWIATKOWSKA, DOBRAWA LISIECKA, RYSZARD SŁOMSKI, BOŻENA SIEMIENIAKO, JADWIGA SOWIŃSKA, BOŻENA GALAS-ZGORZALEWICZ, EWA EMICH-WIDERA, ELŻBIETA MARZAŁ i TADEUSZ CIESIELSKI — *Molecular diagnostics of Duchenne/Becker muscular dystrophy* — discussed not only various aspects of molecular diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy but also the possibility of carrier screening by testing for polymorphism of the PCR product restriction fragments and determination of microsatellite sequences within the *DMD* gene. It seems that in the near future it will be possible to identify precisely the *DMD* carriers by studying microsatellite sequences related to specific mutations in the *DMD* gene.

Selected aspects of the dependence in mucoviscidosis, of phenotype on genotype have been discussed by MICHAŁ WITT — *Selected aspects of genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis*. Mucoviscidosis (cystic fibrosis, CF) is an autosomal recessive disease encountered once per 2500 births. The defective gene responsible for mucoviscidosis is located on chromosome 7, and has been cloned and sequenced. It is most astonishing that this grave genetic disease is caused by over 400 different mutations which determine to some extent its clinical pattern. Unfortunately, there is no simple genotype/phenotype correlation, and the disease itself appears in very diverse forms. Attempts at a correlation of, e.g., disturbed functioning of the respiratory system or susceptibility to bacterial infections to specific mutations gave no unequivocal results. The diversity of phenotypes related to gene *CFTR* mutations points to the possible occurrence of the disease in very varied forms.

Paper by JERZY BAL and DOROTA MACIEJKO *Mucoviscidosis — from gene to therapy* deals with mode of inheritance, epidemiology of cystic fibrosis, structure and function of *CFTR* gene as well as molecular diagnosis. Authors discuss the matter of verification of clinical diagnosis by the study at the molecular level. They present the principle of detection of *CFTR* gene mutation carriers and prenatal diagnosis of mucoviscidosis. Finally they discuss clinical trials of gene therapy for cystic fibrosis.

Phenylketonuria is a rather common genetic disease. It can serve as an example of a genetic disease that can be effectively treated by application of a diet poor in phenylalanine. The therapy can be started quite early due to the commonly applied screening of newborns by Guthrie test. Early implementation of the phenylalanine-poor diet permits to eliminate the most important clinical symptom of phenylketonuria, i.e. deep mental impairment. Despite the treat-

ment the affected children usually learn with difficulty, and in some cases psychical disturbances are observed. JADWIGA JARUZELSKA — *Phenylketonuria — from genotype to the clinic* — discusses the mutations responsible for phenylketonuria, its diversified clinical manifestations, problems of treatment and management of phenylketonuria children, and search for new forms of therapy.

The molecular basis of Hunter syndrome, a rather rare genetic disease, has been presented by EWA POPOWSKA — *Molecular basis of Hunter syndrome*. This syndrome, in its grave form, characterized by deep mental retardation, marked changes in circulation and the bone-joint system, leads usually to death before the patient has reached the 15th year of life. In its mild form the syndrome does not lead to disturbances in mental development, and changes in the circulatory and the skeletal bone-joint systems are much less apparent. To put it in a simplified form, deletions of the whole gene or its fragment, insertions altering the reading frame, point mutations in conserved or unique regions, and mutations introducing the termination codon, especially into the initial region of the transcript, seem to be responsible for the grave form of the disease. On the other hand, mutations altering the functionally less important protein regions lead to the mild form of the disease. The possibilities of the Hunter syndrome therapy are limited to application of motor rehabilitation, mental training and temporary pharmacological treatment.

Defects in the alfa-1-antitrypsin coding gene can lead to liver cirrhosis and pulmonary emphysema. ANNA KOWALSKA and BOŻENA PIŁACIK present in their paper *Deficiency of alpha-1-antitrypsin* the molecular basis of alfa-1-antitrypsin deficiency and the role of this enzyme in pathogenesis of liver and lung diseases. They point also to the significance of alfa-1-antitrypsin deficiency in rheumatoid arthritis and in pathogenesis of some skin diseases which so far has not been fully elucidated. Lowering of the level of alfa-1-antitrypsin, the enzyme inhibiting several proteases, raises the risk of pulmonary diseases not only in homozygotes but also in heterozygotes, especially after exposure to tobacco smoke and other noxious, alfa-1-antitrypsin inactivating factors. The treatment applied consists in administration of alfa-1-antitrypsin preparation. It seems that it might be possible, in the near future, to apply gene therapy in treatment of this disease.

Diabetes mellitus of type I, i.e. insulin dependent, is an example of a disease dependent on multiple factors, many genes playing an essential role in its development. MAŁGORZATA JUNGEMAN presents a review of studies on genetic conditioning of insulin-dependent diabetes — *Insulin dependent diabetes mellitus — a complicated example of multifactorial disorder*. She draws attention to the complexity of factors leading to development of diabetes, and to the practical importance of research aiming at early detection of persons who are prone to become diabetic. In the future, identification of both genetic and environmental factors involved could permit early prevention of the insulin-dependent diabetes.

Studies on DNA are essential not only for gaining knowledge of molecular defects leading to the occurrence of genetic diseases but simultaneously play a steadily increasing role in molecular diagnostics. The latter finds broad application not only in various branches of medicine but also in biology. An excellent example of the progress in molecular genetics and its practical usefulness is

paternity testing. The necessity to ascertain contestable paternity occurs not only in lawsuits but is also indispensable in some cases concerning genetic counselling, prenatal diagnostics and transplantology. The standard method for individual identification introduced by Jeffreys rapidly found application in practice and, under the name of DNA fingerprinting, is at present widely used in molecular diagnostics. The currently applied DNA fingerprinting tests can be divided into two main groups: analysis of a single locus or of multiple loci. The conclusions concerning kinship of the persons examined in the cases of contestable paternity are formulated on the basis of comparison of the DNA fragments found in those persons. RYSZARD SŁOMSKI, JOLANTA KWIATKOWSKA, HANNA CHLEBOWSKA, BARBARA SIEMIENIAKO i MAGDALENA SŁOMSKA — *Polymorphic DNA sequences and their application in paternity* — present a critical review of the paternity testing techniques, drawing attention to some limitations of the methods applied and difficulties in interpretation of the results.

HENRYK HÜBNER and ANNA MORDALSKA discuss the very interesting problem of genomic imprinting, for which they propose a new Polish name — *Genomic imprinting in man*. This inborn imprint affects the expression of homologous alleles or regions of chromosomes inherited from either of the parents. There is ample evidence that chromosomes or genes can "remember" their parental origin. In some organisms genomic imprinting results in a reversible loss of activity of one of the two homologous DNA sequences. From the genetic point of view the effect of imprinting is equivalent to homozygosity at a defined locus or in a group of loci. The concept of genomic imprinting is not incompatible with the Mendelian law but explains the observed deviations from this law. Autosomal genes of maternal and paternal origin undergo, during development of the embryo, differentiated expression indispensable for proper development of the organism. Under pathological conditions, an embryonal neoplasma, hydatid mole, developing from chorion, contains 46 normal chromosomes, all of them of paternal origin. In the genetically opposite situation, when all the chromosomes are of maternal origin, there appears a neoplasma called teratoma. These neoplasmas result from diploidal, partenogenetic growth of either paternal or maternal cells. As cytogenetic evidence for genomic imprinting can serve the occurrence of uniparental disomy. It happens sometimes that, along with a completely normal karyotype, a sex-linked trait is transferred from father to son and not to the daughter. This phenomenon can be explained by assuming that chromosomes X and Y of the zygote were of paternal origin, and the ovum had no sex chromosomes. The significance of uniparental disomy in causing genetic disturbances leading to developmental defects finds its confirmation in the case of the Angelman syndrome, which results from a deletion of a part of maternal chromosome 15, and in the phenotypically different Prader-Willi syndrome, evoked by the deletion of paternal chromosome 15. The postulated molecular mechanisms of genomic imprinting are related to the process of DNA methylation occurring during mitotic divisions preceding meiosis, or during meiosis itself. Methylation affects chromatin conformation and, once introduced during gametogenesis, could be reproduced until activation of the gene.

At present, an increasing body of evidence points to a significant involvement of genetic disturbances in neoplasma development. DANUTA ROŻYŃKOWA —

Perspectivess in cancer genetic research — discoveries and visions — discusses selected results of cytogenetic studies on leukemias and lymphomas, the studies which formed the first step in elucidation of the molecular mechanisms responsible for the phenomena of neoplastic transformation. She draws special attention to disturbances in functioning of cellular oncogenes and antioncogenes. According to her views, in diagnosis of neoplasma, cytogenetic and molecular tests supplement but can not replace pathomorphology, as the main role of molecular genetics consists in detecting the previously unknown mechanisms responsible for deregulation of transcription control, and for autonomy of cell growth.

A significant discussion of the problems of oncogenes and antioncogenes has been presented by ANTONI HORST — *Products of the tumor suppressor genes*. So far, over 100 oncogenes and about 50 antioncogenes have been described. It is at present accepted that development of neoplasma is dependent on the one hand on the presence of an excess of growth promoting factors, i.e. oncogenes, both of endogenous and exogenous origin, and on the other hand on a deficiency or loss of the products of antioncogenes. Under normal conditions the cell cycle is strictly controlled by regulatory mechanisms. The products of oncogenes and antioncogenes play the key role at successive phases of the cell cycle. The understanding of the complex mechanisms which regulate the cell cycle is of great importance for elaboration of new solutions in the therapy of neoplasmas.

Neoplastic transformation and development of neoplasma are also dependent on the metabolism of chemical carcinogens and the process of DNA repair, which both differ from individual to individual. ANDRZEJ L. PAWLAK — *Inherited susceptibility to cancer and other factors influencing cancer occurrence* and KRZYSZTOF SZYFLER — *Physiological and pathological variability of DNA repair in human* — write about the problems of hereditary proneness to neoplasma, and the factors affecting the risk of its development. In view of the possibility of early implementation in some cases of prophylactic measures, the practical significance of solving this problem is immense, especially for the neoplasma-prone persons. The factors underlying proneness to neoplasma are of a subtle character and are often difficult to define. The genetic sensitivity to environmental carcinogens has not been fully recognized yet. It is known that genetic polymorphism can exert its action at the stage of formation of DNA defects, of DNA repair, and control of proliferation of the transformed cells. In turn, disturbances in DNA repair have been described so far to be the main factor underlying proneness to neoplasma in the Fanconi syndrome, *xeroderma pigmentosum* and in *ataxia telangiectasia*. Due to the relationship existing the defect in DNA rapair and sensitivity to particular genotoxic agents, also the symptom-free carriers of the genes of the above-mentioned syndromes can show increased neoplasma proneness on exposition to specific genotoxic factors. Diversity in the course of DNA repair processes in the human population concerns both the level of the whole genome, DNA fragments, or even a single gene. The intensity of DNA repair processes in different parts of the genome is unequal. The efficiency of DNA repair becomes lowered with age, in correlation with increased frequency of occurrence of neoplastic dieases in more advanced age. In practice, it is possible to diagnose rather early the proneness to the large intestine cancer in persons

burdened by the so-called familial adenomatous polyposis coli. The diagnosis can be made even prior to the appearance of polyps in the intestinal mucosa. This opens new possibilities for prophylaxis of neoplastic transformation with the use of anti-inflammatory drugs. The problem of neoplasma proneness is related to the problem of genetic diversity of the population in the aspect of admissible exposition to genotoxic agents.

MARIA SĄSIĄDEK and JÓZEF JAGIELSKI — *Biological effects of mutagenic agents* discuss the biological impact of mutagenic agents during pregnancy, which is, dependent to a large extent on the embryo development stage. In the first 10–14 days following fertilization, that is in the preimplantation period, the fertilized ovum cell has rather low sensitivity to the action of external agents. However, if damaged at that time, it usually undergoes atrophy. In the period of organogenesis the embryo is most sensitive to teratogenic agents. Depending on the time of their action, the injury can concern various organs. After the 8th week of pregnancy, mutagenic compounds can cause neoplastic transformation of somatic cells. The authors discuss also the necessity of gaining thorough knowledge of the mutagenic and carcinogenic properties of the chemical substances introduced into the environment as a result of industrial development, as well as the importance of the detection, within the framework of the so-called biological monitoring, of early biological effects of these compounds on man.

Due to rapid development of the gene transfer technology — JERZY NOWAK — *Progress in gene therapy of hereditary diseases* — we can at present speak about the first positive results of gene therapy for hereditary diseases. It seems that, in the future, gene therapy will be applied for causal treatment of inherited diseases, mainly those caused by a defect in a single gene. One should, however, realize that gene therapy is only beginning to develop. At present we can not yet offer hope to the seriously ill that this new form of therapy could successfully cure them. However, one can be sure that, in the future, gene therapy will become an increasingly common and effective form of treatment and prophylaxis for various types of diseases.

Jerzy Nowak

JACEK ZAREMBA

*Zakład Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii
Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa*

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Badania wykonywane w I i II trymestrze ciąży, mające na celu rozpoznawanie chorób i wad rozwojowych płodu, określa się terminem „diagnostyka prenatalna” (DP). Badania te rozwinęły się na świecie w ciągu trzech ostatnich dziesięcioleci; w Polsce prowadzi się je już od blisko 20 lat.

DP jest wyrazem ogromnego postępu, jaki dokonał się w dziedzinie nauk medycznych, a w szczególności w genetyce człowieka. Od roku 1966 jest możliwe badanie chromosomów płodu w hodowanych amniocytach (komórki pochodzenia płodowego znajdujące się w płynie owodniowym) (STEEL i BREG 1966). W kilka lat później, dzięki postępowi w badaniach biochemicznych, możliwe stało się również rozpoznawanie genetycznie uwarunkowanych defektów metabolicznych płodu, takich jak mukopolisacharydozy (FRATANCONI i współaut. 1969), glikogenozy, jak choroba Pompego (NADLER i MESSINA 1968).

Diagnostyka chorób metabolicznych, takich na przykład, jak wyżej wymienione, polega w głównej mierze na wykrywaniu defektów enzymatycznych, to znaczy na stwierdzeniu braku lub obniżonej aktywności określonych enzymów. Materiał do badań stanowią zazwyczaj hodowane fibroblasty płynu owodniowego lub też inne komórki pochodzenia płodowego. Za miarę aktywności enzymatycznej przyjmuje się ilość substratu właściwego dla określonego enzymu, rozłożonego przez ten enzym w jednostce czasu, w przeliczeniu na jeden gram białka komórkowego. Pomiaru dokonuje się zazwyczaj spektrofлуorymetrem. Jako substratu w wielu defektach enzymatycznych używa się fluorogennych, syntetycznych pochodnych 4-metyloumbelliferonu (CZARTORYSKA i współaut. 1993).

Duży postęp w prenatalnym wykrywaniu chorób przyniosły badania molekularne — zwłaszcza analiza DNA, która poczyniła wielkie postępy w ostatnim dziesięcioleciu. Dzięki nim udało się zlokalizować lub nawet sklonować geny szeregu genetycznie uwarunkowanych chorób, na przykład takich, jak mukowiscydoza, dystrofia mięśniowa Duchenne’a, zespół kruchego chromosomu X.

Zastosowanie hybrydyzacji metodą Southerna i reakcji łańcuchowej z polimerazą (ang. polymerase chain reaction — PCR) umożliwiło wykrywanie mutacji wielu chorób. Diagnoza jest stosunkowo prosta w wypadku, gdy gen został już sklonowany i dostępne są sondy cDNA odpowiadające poszczególnym jego odcinkom. W przypadkach, gdy jest znana tylko lokalizacja genu, posługujemy się polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych DNA (ang. restriction

fragment length polymorphism — RFLP) i badamy sprzężenie genu chorobowego z tym polimorfizmem. Zastosowanie powyższych metod przyczyniło się w znacznym stopniu do zwiększenia liczby chorób, które można rozpoznać u płodu lub też po urodzeniu dziecka, często na długo przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby.

Na początku lat siedemdziesiątych ruszyła też diagnostyka prenatalna tak zwanych otwartych wad cewy nerwowej — na podstawie określenia poziomu alfafetoprotein (AFP) i acetylocholinesterazy w płynie owodniowym (BROCK i SCRIMGEOUR 1972, *Collaborative Acetylcholinesterase Study* 1981). W tym samym mniej więcej okresie rozwinęła się ultrasonograficzna diagnostyka wad płodu — zwłaszcza otwartych wad cewy nerwowej (CAMPBELL i współaut. 1972, 1975). Udoskonalona ultrasonografia (USG) pozwala obecnie na wykrycie wielu innych wad rozwojowych płodu — takich jak wady serca, wady twarzoczaszki i kończyn. Od niedawna USG pomaga również w diagnozowaniu niektórych aberracji chromosomowych płodu. Podejrzenie takich zmian może, na przykład, nasunąć obrzęk płodu — jak to często bywa w zespole Turnera, a także — choć w mniejszym stopniu — w zespole Downa i zespole Edwardsa (NICOLAIDES i współaut. 1992, SAVOLDELLI i współaut. 1993). Ponadto USG z reguły stanowi integralną część badania prenatalnego, ponieważ pod jej kontrolą wykonuje się amniocentezę (AMC) inaczej zwaną amniopunkcją — to znaczy nakłucie pęcherza owodniowego przez powłoki brzuszne w celu pobrania próbki płynu owodniowego. AMC wykonywano początkowo tylko w II trymestrze ciąży — zazwyczaj w 15–17 tygodniu; ostatnio wykonuje się już także w okresie wcześniejszym — pomiędzy 12 i 14 tygodniem (tzw. wczesna AMC).

Jako materiał do badań prenatalnych służył początkowo wyłącznie płyn owodniowy i zawarte w nim komórki pochodzenia płodowego, między innymi złuszczone komórki przewodu pokarmowego, moczowego i inne.

W latach osiemdziesiątych jako materiału do badań prenatalnych zaczęto używać komórek pobieranych za pomocą biopsji trofoblastu (BT), którą wykonuje się w I trymestrze ciąży (według terminologii angielskiej chorion villus sampling, CVS). Badanie polega na pobraniu niewielkiej ilości kosmówki (nawet kilku kosmków), która stanowi doskonały materiał do badań cytogenetycznych i biochemicznych, a także do analizy DNA — bez konieczności prowadzenia długotrwałej hodowli komórkowej. Biopsja trofoblastu była poprzedzona eksperymentami w końcu lat sześćdziesiątych i w latach siedemdziesiątych (HAHNEMANN i MOHR 1969, KULLANDER i SANDAHL 1973). Ciekawe, że do praktyki weszła najpierw w Chinach, gdzie posługiwano się nią w celu oznaczania płci płodu (Department of Obstetrics and Gynaekology, ANSHAN 1975). Do klinicznej diagnostyki prenatalnej weszła jednak dopiero w latach osiemdziesiątych, stosowana w szczególności do badań cytogenetycznych (NIAZI i współaut. 1981), oznaczania poziomu aktywności niektórych enzymów oraz płci płodu (KAZY i współaut. 1982) i do rozpoznawania niektórych hemoglobinopatii za pomocą analizy DNA (WILLIAMSON i współaut. 1981, OLD i współaut. 1982). Wykazano, że z kosmków trofoblastu można uzyskać kariotyp płodu już w kilka godzin po pobraniu materiału (SIMONI i współaut. 1983, RODECK i MORSMAN 1983); metoda ta jest tańsza niż amniocenteza, ponieważ oszczędza się tu na kosztownych pożywkach zużywanych przy kilkutygodniowej hodowli komórek płynu owodnio-

wego. BT wykonuje się pomiędzy 8 i 10 tygodniem ciąży, za pomocą specjalnego cewnika wprowadzonego przez szyjkę macicy lub biopsji igłowej przez powłoki brzuszne, co pozwala na znacznie wcześniejsze niż przy AMC uzyskanie wyników badania. Wadą tej metody jest wyższe ryzyko poronienia niż przy amniocentezie, częstsze artefakty — a więc błędne wyniki — w badaniu cytogenetycznym i, jak niedawno stwierdzono, częstsze występowanie niektórych zaburzeń rozwojowych płodu będących najpewniej następstwem BT — zwłaszcza wykonanej wcześniej, to jest około 8 tygodnia ciąży (FIRTH i współaut. 1991). Metoda ta nie znajduje zastosowania w badaniach biochemicznych, w których materiałem jest płyn owodniowy — na przykład w przypadkach podejrzenia wad otwartych cewy nerwowej.

Obie metody, AMC i BT, są bardzo przydatne i wzajemnie uzupełniają się. Obecnie istnieje tendencja, ażeby BT wykonywać w przypadkach, w których ryzyko urodzenia dziecka chorego jest szczególnie wysokie — na przykład w niektórych chorobach uwarunkowanych monogenicznie, które rozpoznaje się na podstawie oznaczania aktywności enzymatycznej w tkankach pochodzenia płodowego bądź też na podstawie analizy DNA. W większości pozostałych przypadków korzysta się raczej z wczesnej amniocentezy.

Cenną metodą badania jest pobranie próbki krwi płodowej poprzez nakłucie żyły pępowinowej — czyli tak zwaną kordocentezę — oczywiście pod kontrolą USG. Metoda ta znajduje zastosowanie w przypadkach bardziej zaawansowanej ciąży (około 18–20 tygodnia), zwłaszcza wówczas, gdy zachodzi konieczność weryfikacji wątpliwego wyniku badania lub późnego wykonania badania cytogenetycznego — zazwyczaj w związku ze zbyt późnym skierowaniem pacjentki na badanie.

Jedną z metod była do niedawna fetoskopia z użyciem cienkiego fibroskopu igłowego (ang. needlescope) (RODECK i NICOLAIDES 1983). Metoda ta pozwala na obejrzenie płodu, wykrycie niektórych wad rozwojowych, pobranie próbki krwi pępowinowej, biopsję skóry, biopsję wątroby płodu. Obecnie jednak w związku ze stosunkowo dużym ryzykiem zabiegu (przynajmniej około 5%) fetoskopia wychodzi z użycia jako metoda zbyt inwazyjna i ryzykowna; zastępuje ją skutecznie udoskonalona USG.

WSKAZANIA

Najważniejsze wskazania do badań prenatalnych zestawiono w tabeli 1. Wskazania „cytogenetyczne” ustala się w przypadkach, w których istnieje zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z aberracją chromosomową. Najczęstszym wskazaniem w tej grupie jest zaawansowany wiek kobiety, ryzyko urodzenia dziecka z aberracją chromosomową wzrasta bowiem wyraźnie wraz z wiekiem matki. Ogólnie przyjmuje się, że badanie prenatalne należy proponować kobietom począwszy od 35 roku życia, to jest wówczas, gdy ryzyko urodzenia dziecka z zespołem Downa lub inną aberracją chromosomową zbliża się do 1:300. Ryzyko takie uważa się też za wartość progową przy kwalifikowaniu do badania prenatalnego kobiet na podstawie wyników badań przesiewowych (patrz niżej).

Tabela 1

Wskazania do badań prenatalnych (amniocentezy, biopsji trofoblastu lub kordocentezy)

Wskazania	Ryzyko urodzenia dziecka chorego
— Wiek matki 35 lat i powyżej	$\geq 1 : 300$ (patrz tabela 2)
— Poprzednie urodzenie dziecka z zespołem Downa lub inną aberracją chromosomową	0,5% do 1,4%
— Translokacje chromosomowe występujące rodzinnie	różne w zależności od rodzaju translokacji i objętych nią chromosomów
— Zmiany wykryte USG nasuwające podejrzenie aberracji chromosomowych płodu	około 10%
— Poprzednie urodzenie dziecka z chorobą monogeniczną, np. chorobą metaboliczną, jak mukopolisacharydoza, lipidoza i inne	25% do 50% (patrz tabela 3)
— Poprzednie urodzenie dziecka z otwartą wadą cewy nerwowej, jak przepuklina rdzeniowa, przepuklina mózgowa, bezmózgowie	3% do 5% (o ile dana osoba urodziła więcej niż jedno dziecko z taką wadą ryzyko wynosi 10% lub więcej)
— Wynik testu przesiewowego wskazujący na zwiększone ryzyko urodzenia dziecka chorego	$\geq 1 : 300^*$

*Dotyczy aberracji chromosomowych płodu.

W tabeli 2 podano wartości ryzyka urodzenia dziecka z zespołem Downa (trisomia chromosomu 21) — najczęstszą aberracją chromosomową — w zależności od wieku matki. Do innych wskazań cytogenetycznych należą:

— Poprzednie urodzenie dziecka z aberracją chromosomową; w odniesieniu do zespołu Downa wynosi ono około 0,5%, a w przeliczeniu na wszystkie aberracje chromosomowe łącznie 1,4% (STENE i współaut. 1984).

— Rodzinnie występujące translokacje chromosomowe lub też inne zrównoważone zmiany strukturalne chromosomów. Ryzyko w przypadkach translokacji wymiennych waha się znacznie — zależnie od chromosomów i ich odcinków, które uległy przemieszczeniu.

— Zmiany w USG nasuwające podejrzenie aberracji chromosomowych płodu. Na przykład pogrubienie fałdu skórniego na karku płodu (objaw związany ze wspomnianym wyżej obrzękiem płodu) uważa się obecnie za cechę charakterystyczną dla zespołu Downa, i w związku z tym za wskazanie do AMC lub BT (NICOLAIDES i współaut. 1992).

Wśród pozostałych wskazań do diagnozy prenatalnej znajdują się:

— Zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z chorobą monogeniczną.

Przykłady takich chorób — dziedziczących się zgodnie z prawami Mendla — podano w tabeli 3. Diagnostyka prenatalna w takich przypadkach polega na badaniu produktu genu, na przykład, na określeniu aktywności jednego z enzymów lub też na analizie samego materiału genetycznego, to jest DNA.

— Poprzednie urodzenie dziecka z otwartą wadą cewy nerwowej.

Jest to wada uwarunkowana wieloczynnikowo; rozpoznanie można ustalić na podstawie badania USG płodu lub też stwierdzenia w płynie owodniowym obecności lub podwyższonego poziomu takich markerów biochemicznych, jak wspomniana wyżej AFP lub acetylocholinesteraza.

— Wynik testu przesiewowego wskazujący na zwiększone ryzyko urodzenia dziecka chorego.

Tabela 2

Częstość* występowania zespołu Downa w zależności od wieku matki (Hook i LINDSJO 1978)

WM	Częstość	WM	Częstość	WM	Częstość
20	1/1923	30	1/885	40	1/109
21	1/1695	31	1/826	41	1/85
22	1/1538	32	1/725	42	1/67
23	1/1408	33	1/592	43	1/53
24	1/1299	34	1/465	44	1/41
25	1/1205	35	1/365	45	1/32
26	1/1124	36	1/287	46	1/25
27	1/1053	37	1/225	47	1/20
28	1/990	38	1/176	48	1/16
29	1/935	39	1/139	49	1/12

WM — wiek matki

*Częstość występowania wśród żywo urodzonych noworodków = ryzyku urodzenia dziecka z zespołem Downa

Tabela 3

Przykłady chorób monogenicznych, które można rozpoznać u płodu

Nazwa choroby i sposób dziedziczenia		Wysokość ryzyka	Sposób diagnozowania	Materiał
Choroba Tay'a i Sachsa (gangliozydoza GM2)	R-A	25%	określenie aktywności beta-heksozoaminidazy A	trofoblast amniocyty
Choroba Hurler (mukopolisacharydoza)	R-A	25%	określenie aktywności alfa-iduronidazy	trofoblast amniocyty płyn owodniowy**
Mukowiscydoza	R-A *	25%	analiza DNA	trofoblast amniocyty
Zespół kruchego chromosomu X	D-X	50%*	analiza DNA badanie cytogenetyczne	trofoblast amniocyty
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a/Beckera	R-X	50%(M)	analiza DNA	trofoblast amniocyty
Choroba Huntingtona	D-A	50%	analiza DNA	trofoblast amniocyty

R-A — dziedziczenie recesywne autosomalne

D-A — dziedziczenie dominujące autosomalne

R-X — dziedziczenie recesywne sprzężone z płcią

D-X — dziedziczenie dominujące sprzężone z płcią

(M) — dotyczy tylko potomstwa płci męskiej

* — ryzyko zbliżone do 50% dotyczy tylko mężczyzn, u kobiet-heterozygot ryzyko jest niższe (niepełna penetracja genu chorobowego)

** — podwyższony poziom mukopolisacharydów w płynie owodniowym

Badania przesiewowe ukierunkowane na wykrywanie otwartej wady cewy nerwowej były prowadzone już w latach 70-tych. Polegały one na określaniu poziomu AFP w surowicy krwi kobiet w 16–18 tygodniu ciąży. W przypadku istnienia tego typu wad u płodu poziom AFP w surowicy krwi matek jest znamienne podwyższony. U kobiet takich wykonywano dokładne badanie USG i AMC, co w efekcie pozwoliło na znaczną redukcję urodzeń dzieci z otwartą wadą cewy nerwowej — w Szkocji zanotowano spadek o 72% do 83% (FERGUSON-SMITH 1983). W końcu lat 80-tych okazało się, że w zespole Downa i innych aberracjach chromosomowych poziom AFP w surowicy krwi matek jest obniżony. Stwierdza się ponadto obniżenie poziomu nie związanego estriolu (uE3) i podwyższenie poziomu gonadotropiny kosmówkowej (hCG). Wszystkie te markery: AFP, uE3 i hCG w surowicy krwi matki oraz dodatkowo wiek matki są obecnie wykorzystywane w teście przesiewowym ukierunkowanym na wykrywanie zespołu Downa i innych aberracji chromosomowych. Dzięki temu testowi wykrywalność zespołu Downa może przekroczyć 60% (WALD i współaut. 1988). Jest to bardzo dużo, jeśli się zważy, że kwalifikowanie do badań prenatalnych kobiet na podstawie kryterium wieku — 35 lat lub powyżej — w najlepszym wypadku pozwala na wykrycie 30% przypadków zespołu Downa.

— Są jeszcze inne wskazania do badań prenatalnych. Jednym z nich jest nerwica lękowa o znacznym nasileniu. Wykonanie badania prenatalnego u takich kobiet uwalnia je od lęku i w ten sposób może przyczynić się do uchronienia ciąży. Badania prenatalne dzięki wprowadzaniu nowych metod są nieustannie udoskonalane. Wspomnianą wyżej technikę PCR wykorzystano ostatnio do wykrywania defektów genetycznych — takich na przykład jak mukowiscydoza — nawet w pojedynczych komórkach. Zarysowują się więc możliwości preimtanplantacyjnej diagnozy prenatalnej (WU i współaut. 1993).

Badania prenatalne obecnej doby prowadzi się głównie pod kątem wykrywania ciężkich i nieuleczalnych chorób płodu. W razie wykrycia jednej z takich chorób matka ma prawo zadecydować o dalszych losach ciąży. W większości takich przypadków dochodzi do przerwania ciąży ze wskazań lekarskich.

W Polsce badania prenatalne są wykonywane na bardzo małą skalę i tylko w kilku ośrodkach. Badania przesiewowe oparte na oznaczaniu wymienionych wyżej markerów biochemicznych w surowicy matki nie są dotychczas prowadzone. W Polsce, podobnie jak w większości innych krajów, najczęstszym wskazaniem do diagnostyki prenatalnej jest zaawansowany wiek matki. Biorąc pod uwagę wszystkie wskazania do badań prenatalnych łącznie chorobę lub wadę płodu rozpoznaje się tylko w 3% do 4% przypadków. Pozostałe 96%–97% kobiet dowiaduje się natomiast o prawidłowym wyniku badania i decyduje się na urodzenie dziecka.

PRENATAL DIAGNOSIS

Summary

Short history of the prenatal diagnosis, categories of the risk and indications as well as new trends are briefly discussed. The paper ends with a few remarks about the situation in Poland, characterised by: too small number of genetic centers performing prenatal diagnosis, too small number of tests carried out and the maternal blood serum screening test not being applied so far.

LITERATURA

- BROCK D. J. H., SCRIMGEOUR J. B., 1972. *Early prenatal diagnosis of anencephaly*. Lancet, 2, 1252-1253.
- CAMPBELL S., JOHNSTONE F. D., HOLT E. M., MAY P., 1972. *Anencephaly: Early ultrasonic diagnosis and active management*. Lancet, 2 1226-1227.
- CAMPBELL S., PRYSE-DAVIES J., COLTART T. M., SELLER M. J., SINGER J. D., 1975. *Ultrasound in the diagnosis of spina bifida*. Lancet, 1, 1065-1066.
- Collaborative Acetylcholinesterase Study, 1981. Lancet, 2, 321-324.
- CZARTORYSKA B., GÓRSKA D., SZIRKOWIEC-GMURCZYK W., 1993. Aktywność enzymów lizosomalnych w leukocytach krwi pacjentów z różnymi postępującymi chorobami neurologicznymi o niewyjaśnionej etiologii. Diagn. lab., 29, 407-414.
- Department of Obstetrics and Gynaecology, Anshan, 1975. *Fetal sex prediction by sex chromatin of chorionic villi cells during early pregnancy*. Chinese Med. J. 1, 117-126.
- FERGUSON-SMITH M. A., 1983. *The reduction of anencephalic and spina bifida births by maternal serum alphafetoprotein screening*. Brit. Med. Bull., 39, 365-372.
- FIRTH H. V., BOYD P. A., CHAMBERLAIN P., MACKENZIE I. Z., LINDEBAUM R. H., HUSON S. M., 1991. *Severe limb abnormalities after chorion villus sampling at 56-66 days gestation*. Lancet, 337, 762-763.
- FRATANCONI J. C., HALL C. W., NEUFELD E. F., 1968. *The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: faulty degradation of mucopolysaccharide*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 60, 699-706.
- HAHNEMANN N., MOHR J., 1969. *Antenatal fetal diagnosis in genetic disease*. Bull. Eur. Soc. Hum. Genet. 3, 47-54.
- HOOKE E. B., LINDSJO A., 1978. *Down's syndrome in live births by a single-year maternal age interval in a Swedish study: comparison with results from a New York study*. Am. J. Hum. Genet. 30, 19-27.
- KAZY Z., ROSOVSKY I. S., BAKHAREV V. A., 1982. *Chorion biopsy in early pregnancy: a method of early prenatal diagnosis for inherited disorders*. Prenat. Diagn. 2, 39-45.
- KULLANDER S., SANDAHL B., 1973. *Fetal chromosome analysis after transvisceral placental biopsies during early pregnancy*. Acta Obstet. Gynec. Scand. 52, 355-359.
- NADLER H. L., MESSINA A. M., 1969. *In-utero detection of type II glycogenosis (Pompe's disease)*. Lancet, 2, 1277-1278.
- NAZI M., COLEMAN D. V., LOEFFLER F. E., 1981. *Trophoblast sampling in early pregnancy. Culture of rapidly dividing cells from immature placental villi*. Brit. J. Obstet. Gynaec., 88, 1081-1085.
- NICOLAIDES K. H., AZAR G., BYRNE D., MANSUR C., MARKS K., 1992. *Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy*. Br. Med. J., 304, 867-869.
- OLD J. M., WARD R. H. T., KARAGOZLU F., PETRON M., MODELL B., WEATHERALL D. J., 1982. *First trimester fetal diagnosis for haemoglobinopathies: 3 cases*. Lancet 2, 1414-1416.
- RODECK C. H., MORSMAN J. M., 1983. *First-trimester chorion biopsy*. Brit. Med. Bull. 39, 338-342.
- RODECK C. H., NICOLAIDES K. H., 1983. *Fetoscopy and fetal tissue sampling*. Brit. Med. Bull., 39, 332-337.
- SAVOLDELLI G., BINLEWIT F., ACHERMANN J., SCHMID W., 1993. *Ultrasound screening for chromosomal anomalies in the first trimester of pregnancy*. Prenat. Diagn., 13, 513-518.
- SIMONI G., BRAMBATI B., DANESINO C., ROSELLA F., TERZOLI G. L., FERRARI M., FRACCARO M., 1983. *Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy*. Hum. Genet. 64, 349-357.
- STEEL M. W., BREG W. R., 1966. *Chromosome analysis of human amniotic cells*. Lancet 1, 383-385.
- STENE J., STENE E., MIKKELSEN M., 1984. *Risk for chromosome abnormality at amniocentesis following a child with a non-inherited chromosome aberration. A European Collaborative Study on Prenatal Diagnosis 1981*. Prenat. Diagn. 4, Spec. No., 81-95.
- WALD N. J., CUCLE H. S., DENSEM J. W., NANCHAHAL K., ROYSTON P., CHARD T., HADDOW J. E., KNIGHT G. J., PALOMAKI G. E., CANICK J. A., 1988. *Maternal serum screening for Down's syndrome in early pregnancy*. Br. Med. J., 297, 883-887.
- WILLIAMSON R., ESKDALE J., COLEMAN D. V., NAZI M., LOEFFLER F. E., MODEL B. M., 1981. *Direct gene analysis of chorionic villi. A possible technique for first trimester antenatal diagnosis of haemoglobinopathy*. Lancet 2, 1125-1127.

- WU R., CUPPENS H., BUYSE I., DECORTE R., MARYNEN P., GORDS P., CASSIMAN J. J., 1993. *Co-amplification of the sequence in single cell PCR: Implications for improved assessment of polar bodies and blastomeres in preimplantation diagnosis*. Prenat. Diagn., 13, 1111-1122.

BOGDAN KAŁUŻEWSKI

*Zakład Genetyki Medycznej Instytutu Endokrynologii
Akademii Medycznej w Łodzi
Sterlinga 3, 91-425 Łódź*

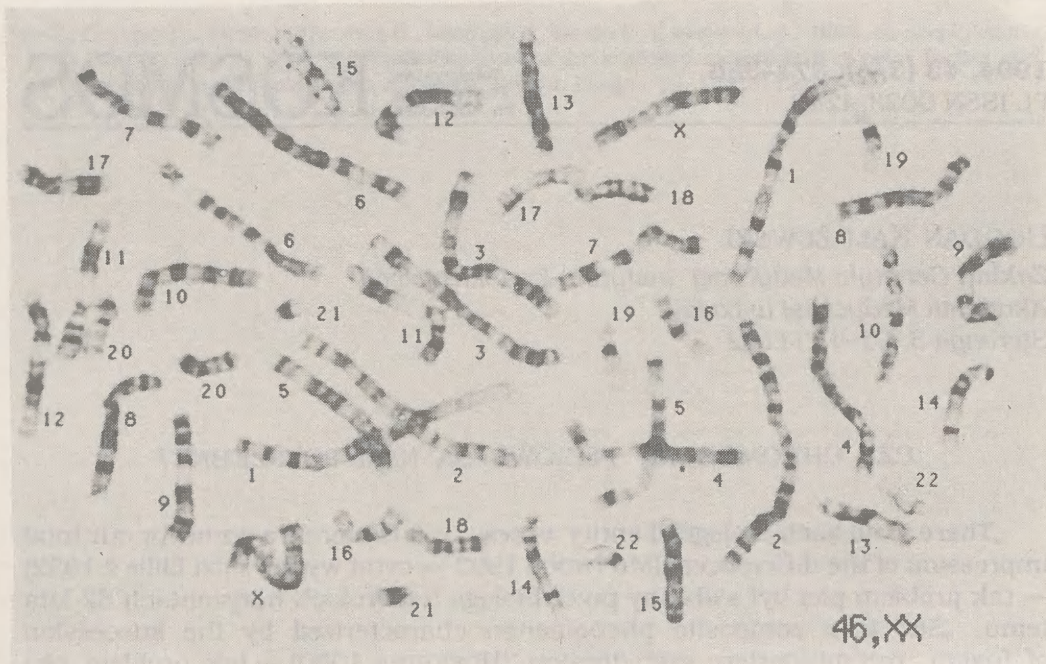
CZY CHROMOSOMY PŁCIOWE SĄ NAM POTRZEBNE?

„There is no such biological entity as sex. ..., it is merely a name for our total impression of the differences” (MITTWOCH 1992 — cytata wypowiedzi Lillie z 1932) — tak problem płci był widziany przez biologa o szerokich horyzontach 62 lata temu. „Sex is a composite phenomenon characterized by the succession of fusion, recombination, and division” (HOEKSTRA 1990) — tak problem płci i prokreacji rozumie współczesny genetyk populacyjny. Jednoznacznie i arbitralnie seks opisują z natury rzeczy związane słowniki: „sex 1. being male or female,... 2. males and females as a group...”. (HORNBY 1974).

Trzeba przyznać, że powszechne poczucie przynależności płciowej jest tak oczywiste, że często nie skłania do głębszej refleksji i jest raczej bliższe pojęciu słownikowemu niż dwóm wyżej przytoczonym poglądom. Jednak współcześnie rozumiany problem identyfikacji płci nie jest ani łatwy ani jednoznacznie określony. W praktyce zawodowej lekarza ginekologa, endokrynologa, genetyka i psychiatry z całą pewnością powinniśmy uwzględnić szereg kryteriów płci, takich jak:

- płęć chromosomową (w tym także chromatynową, której pojęcie jest związane z obecnością grudek chromatyny X w jądrach komórkowych kobiety oraz grudek chromatyny Y w jądrach komórkowych mężczyzny);
- płęć gonadalną (określoną determinacją pierwotnej gonady);
- płęć endokrynną (zdeteminowaną podjęciem czynności endokrynnnej przez gonadę i udział hormonów płciowych w regulacji osi: podwzgórze, przysadka mózgowa, gonada niezależnie od ich funkcji autonomicznych w procesie dojrzewania);
- płęć fenotypową (wewnętrznych, w pierwszej kolejności, nieco później zewnętrznych narządów płciowych) jako efekt płci hormonalnej;
- płęć metrykalną będącą prostą, cywilno-prawną konsekwencją ustalenia płci fenotypowej;
- płęć psychologiczną (psychoseksualną, psychospołeczną i inne).

Rozpoznawanie płci chromosomowej stało się możliwe dzięki metodom umożliwiającym obserwację chromosomów człowieka w stadium podziału komórki (ryc. 1).



Ryc. 1. Stadium podziału limfocyta krwi obwodowej. Chromosomy zostały zabarwione techniką GTG (G-bands by trypsin using giemsa). Charakterystyczny wzór prążków umożliwia jednoznaczną identyfikację 23 par chromosomów (kariotyp 46,XX).

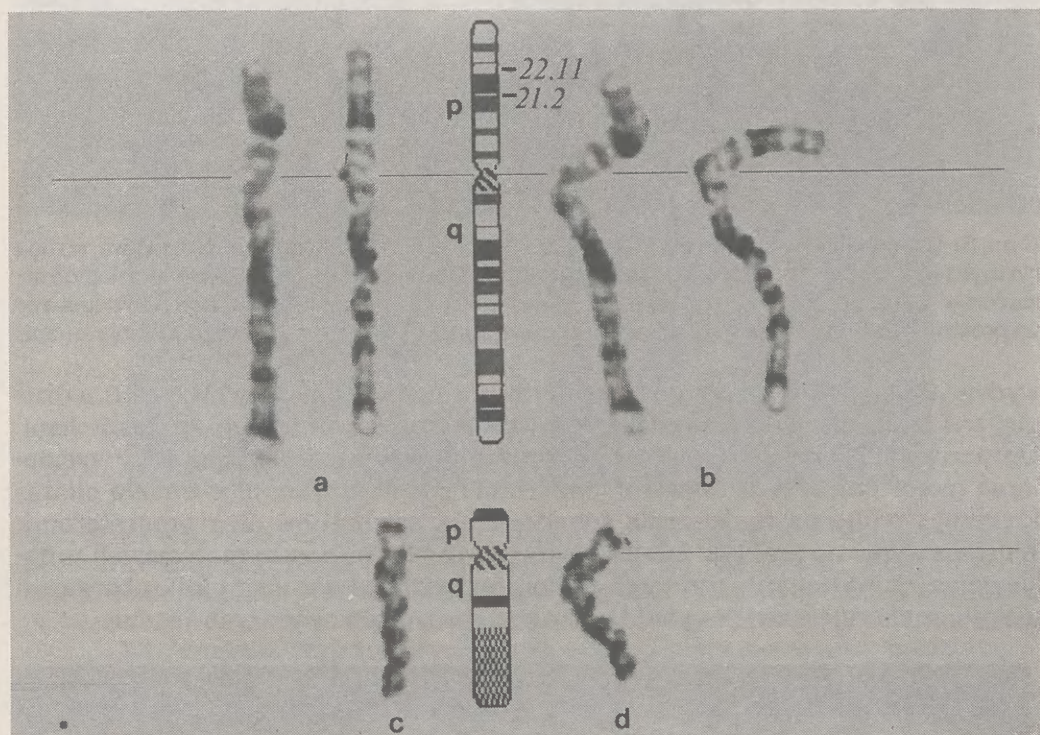
Każdy z 46 prezentowanych chromosomów może być rozpoznany dzięki charakterystycznemu wzorowi prążkowemu, który umożliwia nie tylko jednoznaczną identyfikację chromosomów, ale również pozwala na rozpoznanie ich aberracji strukturalnych. Twórcy systemu nomenklaturowego ramię długie każdego z chromosomów opisali literą q, natomiast ramię krótkie literą p. W chromosomach wyróżniono regiony ograniczone punktami granicznymi, którymi najczęściej są wyraźne, łatwe do identyfikacji prążki, centromery i telomery chromosomów. Poszczególne prążki ponumerowano, co umożliwia odwoływanie się do poszczególnych prążków bez względu na stopień rozdzielczości metody prążkowej, za pomocą której badamy chromosomy (ryc. 2).

Zapis Xp21.2p22.11 w sposób jednoznaczny opisuje region, w którym autor (ARN i współaut. 1994) lokalizuje, na przykład, locus SRVX (sex reversal X) — patrz niżej. Sekwencję prążków negatywnych i pozytywnych oraz ich wzajemną relację w chromosomie X charakteryzuje powtarzalność zarówno międzykomórkowa, jak i międzyosobnicza. Odmiennie pod tym względem zachowuje się chromosom Y, który dziedzicząc się w sposób holandryczny zachowuje stałą liczbę i układ prążków w obrębie jednej rodziny, ale jednocześnie charakteryzuje się znacznym polimorfizmem międzyosobniczym (ryc. 3). Każdy z trzech chromosomów Y, przedstawionych na rycinie 3 i 4, jest prawidłowym chromosomem Y pochodzącym od różnych osobników. Różnice morfologiczne są związane z wielkością nieaktywnego genetycznie bloku heterochromatyny Yq (ryc. 4).

Rozpoznanie płci chromatynowej jest możliwe dzięki jednoczesnemu przeprowadzeniu testów chromatyny X i Y. Testy powyższe polegają na identyfikacji

w jądrze komórki w stadium międzypodziałowym, charakterystycznych grudek chromatyny; w pierwszym przypadku obserwowanych w mikroskopie optycznym w świetle przechodzącym, w drugim przypadku dzięki zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego (ryc. 5).

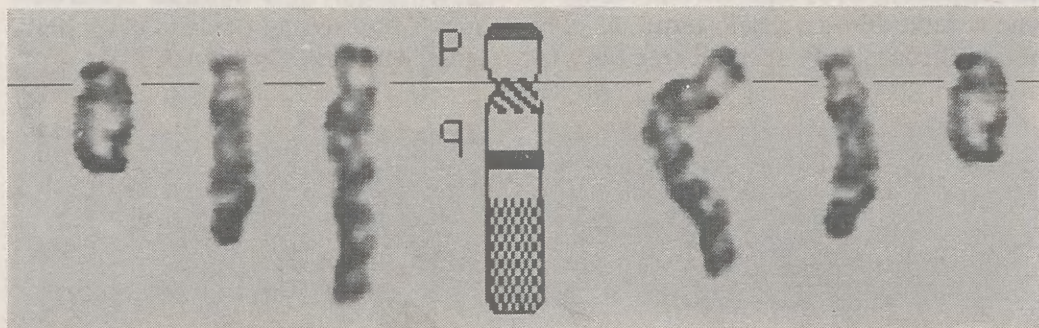
Grudkę chromatyny X identyfikujemy z jednym z dwóch chromosomów płciowych X kobiety, który na drodze losowej ulega genetycznej inaktywacji. Cytologicznym wyrazem inaktywacji jest heterochromatynizacja i heterocykliczna replikacja DNA tego chromosomu. Grudkę chromatyny Y możemy obserwować w mikroskopie dzięki temu, że chromosom Y najczęściej posiada duży blok heterochromatyny, specyficznie barwiący się barwnikami akrydynowymi.



Ryc. 2. Chromosomy barwione techniką GTG. a, b — chromosomy X, c, d — chromosom Y. Zgodnie z konwencją międzynarodową ramię krótkie chromosomu oznaczamy literą p, ramię długie literą q. Ideogram umożliwia porównanie standardu wzoru prążkowego z wzorem prążkowym w każdym konkretnym przypadku. a–c chromosomy wyprostowane przy użyciu techniki komputerowej, b–d chromosomy w stanie „naturalnym”.

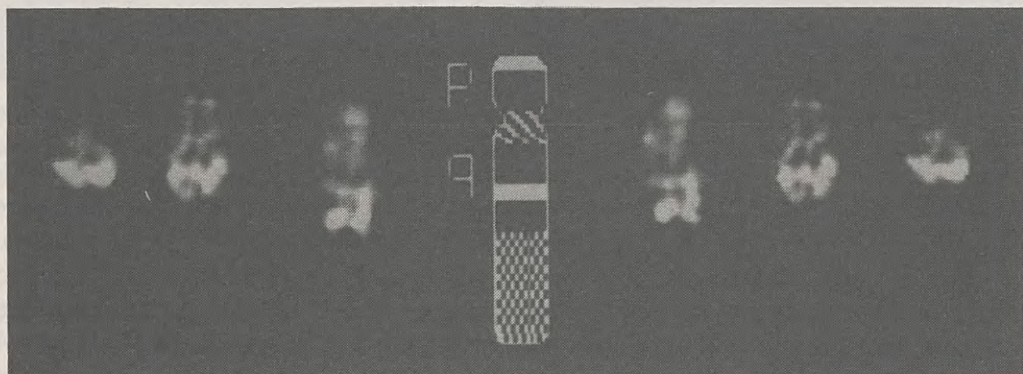
Rozpoznanie płci gonadalnej u zdrowych mężczyzn (porównaj ryciny 4 i 5 b, d) jest łatwe, ale w przypadkach patologicznych często musimy posługiwać się ultrasonografią, laparoskopią lub diagnostyczną laparotomią. Podobnie u kobiet, ultrasonografia przezpłokowa i przezpochwowa umożliwia lokalizację i opis struktury, którą dzięki obecnej rozdzielczości aparatów można nazwać strukturą morfologiczną jajnika. W patologii często jednak musimy się odwoływać do metod inwazyjnych.

Płeć endokrynną jesteśmy w stanie rozpoznać, określając stężenia hormonów płciowych w surowicy krwi oraz w moczu. Jakkolwiek u obu płci funkcja gonad jest regulowana przez te same hormony — gonadotropiny: FSH (folikulotropinę) i LH (luteotropinę), wydzielanie obu hormonów u obu płci jest odmienne. U mężczyzn podstawowe wydzielanie gonadotropin jest regulowane tonicznym wpływem podwzgórza oraz hamującym działaniem steroidów płciowych. U kobiet cykliczne wydzielanie gonadotropin jest regulowane z jednej strony pulsacyjnym

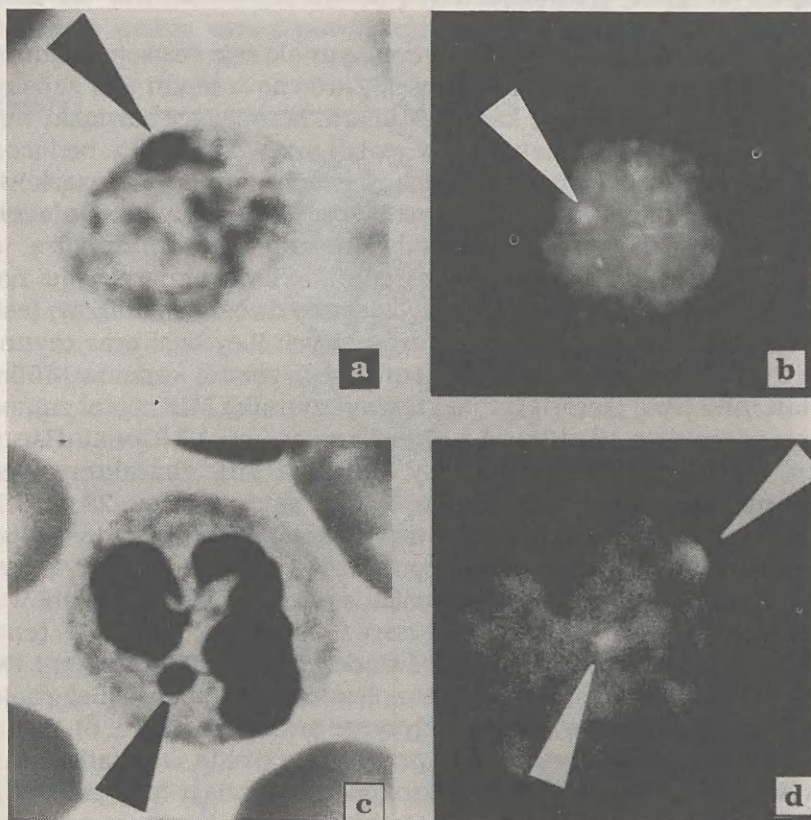


Ryc. 3. Chromosomy barwione techniką GTG. Każdy z chromosomów Y (prawa strona ryciny) pochodzi od innego zdrowego mężczyzny. Chromosomy różnią się morfologicznie, zarówno wzorem prążkowym, jak i długością. Po stronie lewej te same chromosomy wyprostowano komputerowo, co ułatwia porównanie ich wzoru prążkowego z ideogramem.

wydzielaniem GnRH (podwzgórzowy neurohormon uwalniający LH i FSH), z drugiej zaś dodatnim sprzężeniem zwrotnym z estrogenami (głównie estradiolem). Upraszczając, hormonalną płę męską charakteryzują „męskie” poziomy wydzielania testosteronu oraz toniczne wydzielanie gonadotropin, płę żeńską charakteryzuje cykliczne wydzielanie gonadotropin, estrogenów oraz progesteronu. Wprowadzenie do praktyki laboratoryjnej metod immunoenzymatycznych umożliwiających wykonanie oznaczeń poziomów hormonów w ciągu kilkunastu minut, znakomicie zwiększyło kliniczną użyteczność powyższych testów.



Ryc. 4. Chromosomy barwione techniką QFQ (Q — bands by fluorescence using quinacrine). Układ ryciny identyczny jak ryciny 3. Uwagę zwraca polimorfizm heterochromatycznego regionu terminalnego Yq.



Ryc. 5. a — strzałka wskazuje heterochromatyczną grudkę X, b — strzałka wskazuje heterochromatyczną grudkę Y, c — strzałka wskazuje pałeczkę dobosza, którą utożsamia się z chromatyną X, d — strzałki wskazują dwie grudki chromatyny Y, co przemawia za polisomią chromosomu Y. Więcej szczegółów na temat użyteczności testów chromatyny X i Y znajdzie Czytelnik w podręczniku (KAŁUŻEWSKI i JAKUBOWSKI 1992).

Prezentując kryteria rozpoznawania płci pacjenta nie bez powodu na pierwszym miejscu wymienilem cechy płci męskiej i żeńskiej na poziomie komórkowym (płeć chromosomowa w tym chromatynowa). Kluczem uruchamiającym kaskadę wydarzeń, determinujących rozwój pierwotnej gonady w kierunku jądra, jest bowiem chromosom Y. Niewiele jest wiadomo o roli genu lub genów zaangażowanych w prawidłowe różnicowanie się pierwotnej gonady w kierunku jajnika. U człowieka proces ten przebiega prawidłowo jedynie w obecności dwóch, strukturalnie niezmiennych chromosomów X. Jakkolwiek płeć genetyczna embrionu zostaje zdeterminowana już w momencie zapłodnienia, zależnie od obecności chromosomu X bądź Y w haploidalnym zestawie chromosomów plemnika, to przed upływem 6 tygodnia życia płodowego nie obserwuje się różnic morfologicznych, które w późniejszym okresie stanowią o różnicowaniu się pierwotnej gonady w kierunku jajnika lub jądra. O ile rozwój gonady niezróżnicowanej i zróżnicowanej zdaje się głównie zależeć od czynnika chromosomo-

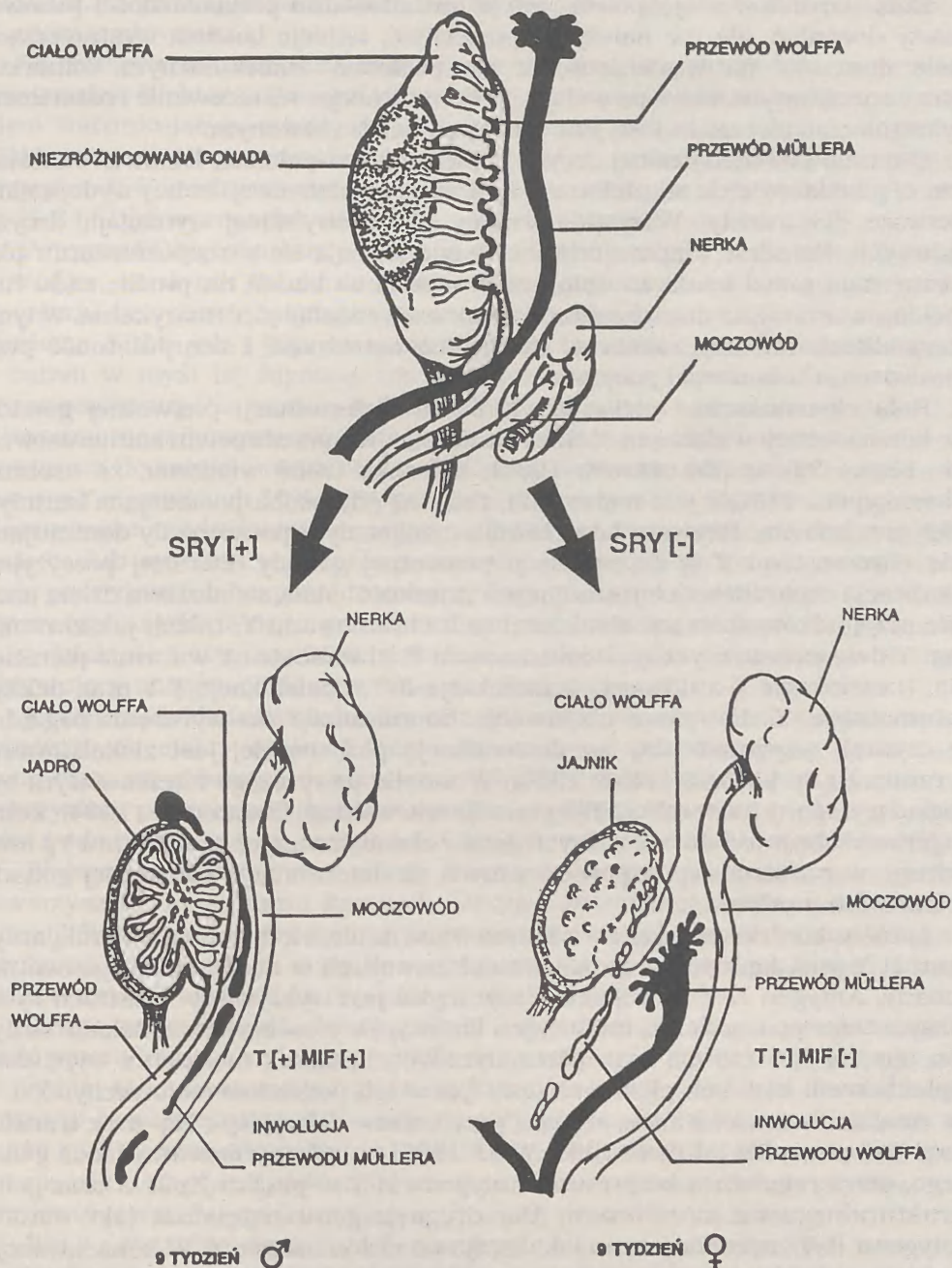
wego, o tyle rozwój wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych zależy przede wszystkim od płci hormonalnej.

Zawiazki narządów płciowych we wczesnym okresie rozwoju płodu są obojętne niezależnie od płci chromosomowej. Zarówno u płodu płci żeńskiej (XX), jak i męskiej (XY) rozwijają się kanały Müllera, stanowiące zawiazki wewnętrznych narządów płciowych żeńskich oraz ciała i przewody Wolffa, będące zawiazkami wewnętrznych narządów płciowych męskich. Istnienie zawiazków narządów płciowych obu płci wydaje się logiczną konsekwencją potencjalnych możliwości różnicowania się pierwotnej gonady zarówno w kierunku jądra, jak i jajnika. Typ gonady decyduje już bezpośrednio o kierunku rozwoju narządów płciowych. Płodowe jądro rozpoczyna wydzielanie dwóch czynników: testosteronu wytwarzanego w komórkach śródmiąższowych (Leydiga) oraz czynnika wytwarzanego w komórkach Sertoliego, hamującego rozwój kanałów Müllera (MIF — Müllerian inhibiting factor). Locus genowy czynnika MIF został zmapowany i znajduje się w regionie 19p13.2 → p13.3 chromosomu 19 (COHEN-HAGUENAUER i współaut. 1987). Określono poziomy czynnika MIF charakterystyczne dla płodów płci męskiej (40.5 ± 3.9 ng/ml w 19–30 tygodniu ciąży, 28.4 ± 6.1 ng/ml od 30 tygodnia – do terminu porodu. Najwcześniej produkty transkrypcji genu MIF zidentyfikowano w tkance płodowego jądra w 8 tygodniu ciąży. Sugeruje się wykorzystanie markera, jakim jest określanie stężenia czynnika MIF w diagnostyce zaburzeń cielesno-płciowych (JOSSO i współaut. 1993). W ten sposób wyniki genialnych w swej prostocie doświadczeń Josta (GRUMBACH i VAN WYKE 1974) znalazły wyjaśnienie na poziomie molekularnym, jak również znajdują, co jest równie ważne, zastosowanie w medycynie praktycznej (ryc. 6).

Testosteron indukuje rozwój ciał i przewodów Wolffa w najądrza, nasieniodoty, pęcherzyki nasienne i gruczoł krokowy, natomiast MIF powoduje zanik kanałów Müllera. Przy różnicowaniu się jajników, a tym samym przy braku czynników wytwarzanych przez jądro, samoistnie następuje rozwój wewnętrznych narządów płciowych żeńskich (jajowodów, macicy i górnej części pochwy).

W przypadku prawidłowo przebiegającego rozwoju płodu w momencie porodu nie ma żadnej innej dostatecznie przekonującej cechy, która pozwalałaby na ustalenie płci fenotypowej dziecka, poza wyglądem jego zewnętrznych narządów płciowych. Określenie płci fenotypowej jest podstawą ustalenia płci metrykalnej. Płeć fenotypowa i metrykalna decyduje o postępowaniu rodziców i najbliższego otoczenia dziecka, mającym na celu wytworzenie u niego poczucia przynależności do określonej płci. Poczucie przynależności płciowej powstaje ostatecznie na przełomie 2 i 3 roku życia dziecka. O tym jak trudna staje się rola lekarza jako doradcy chorego z zaburzeniami rozwoju cielesno-płciowego łatwo można się przekonać, gdy proces diagnostyki, nieświadomość lub opieszałość rodziny chorego zmuszają do podejmowania istotnych decyzji po przekroczeniu tego krytycznego wieku. Podejmowanie jakichkolwiek decyzji, które mają radykalnie zmienić sytuację pacjenta powinno być bardzo rozważne. Nie należy nigdy żałować czasu poświęconego na konsylium lekarskie z udziałem także doświadczonych psychologów. O tym, że rola tych ostatnich nie jest łatwa świadczy ubóstwo technik psychologicznych (BILKIEWICZ i IMIELIŃSKI 1978, SANOCKI 1980, SIEK 1983), które by umożliwiły jednoznaczną ocenę osobowości pacjenta nie tylko w chwili badania, ale i prognostyczną uwzględniającą dalszy, odbiegający

siłą rzeczy od prawidłowego, rozwój psychospołeczny pacjenta. Za pionierską w tym zakresie należy uznać publikację (KUCZYŃSKA 1992) stwarzającą szansę



Ryc. 6. Rozwój układu moczowo-płciowego we wczesnym okresie embrionalnym. SRY (sex determining region on the Y; patrz niżej), T — testosteron, MIF — müllerian inhibiting factor. Rycinę opracowano, modyfikując ryc. 1 z publikacji: MÜLLER U. 1990.

na uzyskanie narzędzia umożliwiającego rozpoznanie płci psychologicznej w warunkach pracy z indywidualnym chorym.

Rolę warunków socjospołecznych w kształtowaniu przynależności płciowej należy doceniać, ale nie należy jej przeceniać, istnieje bowiem wystarczająco wiele dowodów na istnienie różnic na poziomie molekularnym, komórkowym i narządowym, które powodują, że determinacja, różnicowanie i ostateczne wykształcenie płci osobniczej jest procesem bardzo złożonym.

O naszej płci metrykalnej decydują pielęgniarzka-położna, lekarz neonatolog oraz ci przedstawiciele administracji szpitalnej i państwowej, którzy wydają nam pierwsze dokumenty. Wszystkie zmiany płci metrykalnej wymagają decyzji sądowych. Poradnie i laboratoria, które specjalizują się w rozpoznawaniu płci często stają przed koniecznością przeprowadzania badań na prośbę sądu lub pacjentów, którzy na drodze sądowej zamierzają zmienić płeć metrykalną. W tych przypadkach radzimy zachować szczególną ostrożność i skrupulatność przy sprawdzeniu tożsamości pacjenta.

Rola chromosomów płciowych X i Y w determinacji pierwotnej gonady i w konsekwencji w dalszym różnicowaniu płci jest przedmiotem zainteresowań od blisko 35 lat (KAŁUŻEWSKI 1984). Od roku 1959 wiadomo, że osobnik z kariotypem 47,XXY jest mężczyzną, podczas gdy osoba posiadająca kariotyp 45,X jest kobietą. Pierwsze lata rozwoju cytogenetyki potwierdziły dominującą rolę chromosomu Y w determinacji pierwotnej gonady. Bardziej precyzyjna lokalizacja czynników determinujących „męskość” stała się możliwa dzięki analizie przypadków aberracji strukturalnych chromosomu Y, takich jak chromosom Y dwucentromeryczny, izochromosom Y, chromosom Y w formie pierścienia, translokacje Y-autosomy, translokacje X-Y, translokacje Y-Y oraz delecje chromosomu Y. Powyższe obserwacje doprowadziły do wyrażenia poglądu, że czynnik odpowiedzialny za determinację płci męskiej jest zlokalizowany w ramieniu Yp (JACOBS i ROSS 1966). W świetle powyższego interesującym był pogląd wyrażony już w roku 1971 przez Boczkowskiego (KAŁUŻEWSKI 1984), który sugerował obecność dwóch różnych genów zlokalizowanych w ramieniu Yp oraz jednego w ramieniu Xp odpowiedzialnych za determinację pierwotnej gonady w kierunku męskim.

Lata osiemdziesiąte zostały zdominowane naukową dyskusją nad rolą antygeny H-Y jako kandydata do pierwszoplanowej roli w determinacji pierwotnej gonady. Antygen H-Y (w pojęciu klasycznym) jest wykrywany w testach cytotoxyczności po uczuleniu na antygen limfocytów T osobników żeńskich. Antygen ten ma być częścią błon plazmatycznych komórek męskich z wyjątkiem diploidalnych komórek płciowych (t.zn. przed ich podziałem mejotycznym).

Analiza immunologiczna szeregu przypadków delecji Xp-; Xq- oraz translokacji X-Y pozwoliła (MÜLLER 1985, WOLF 1985) na zidentyfikowanie locus genowego, genu regulatora (supresora) antygeny H-Y w prążku Xp22.3 oraz genu strukturalnego na autosomach. Dla drugiego genu regulatora (aktywatora) antygeny H-Y zaproponowano lokalizację na chromosomie Y. W konsekwencji, podwójna „dawka genu” regulatora sprzężonego z chromosomem X, przy kariotypie 46,XX miała zapobiegać produkcji antygeny H-Y, natomiast w przypadkach monosomii 45,X przy obecności pojedynczej „dawki genu” obserwuje się niskie poziomy antygeny H-Y. Kariotypom 47,XXY; 48,XXXXY oraz 49,XXXXXY towarzyszy-

szyły dzięki obecności chromosomu Y poziomy antygen H-Y umożliwiające indukcję jądra. Ostatnia obserwacja pozwalała na wysunięcie hipotetycznego poglądu, że gen regulator (supresor) antygen H-Y sprzężony z chromosomem X unika inaktywacji.

W różnicowaniu się jądra znaczną rolę odgrywa antygen H-Y rozpuszczalny w surowicy. Niektórzy antygen ten nazywają wykrywanym serologicznie czynnikiem warunkującym rozwój męski (serologically determined male antigen — SDM antigen). Jest to tendencja słuszną, gdyż zamienne stosowanie pojęcia antygen H-Y w odniesieniu do obu wyżej wymienionych czynników (klasycznego H-Y i SDM) wprowadza wiele zamętu (DAIGER i CHAKRABORTY 1985).

Antygen SDM jest już też jedynie hasłem wywoławczym. Dostarczono bowiem dowodów, że wynik działania SDM zależy także od obecności swoistego dla antygeny receptora, znajdującego się w komórkach różnicującej się gonady. Zarówno SDM, jak i jego receptor stanowią produkt genów autosomalnych, a zatem w myśl tej hipotezy ich wytwarzanie może być niezależne od płci chromosomowej. Na modelach doświadczalnych lub w badaniach tkanek z kariotypami mozaikowymi XX/XY wykazano, że 20% komórek z chromosomem Y wystarcza do zainicjowania różnicowania się jądra. Liczba komórek z chromosomem Y w granicach 10%–20% prowadzi do wytworzenia się struktur ovotestis. Reasumując, w odniesieniu do antygeny SDM powinno się używać raczej pojęcia układu lub systemu jego funkcjonowania, angażującego przynajmniej cztery geny pośrednio lub bezpośrednio wpływające na ekspresję SDM: gen strukturalny antygeny jako takiego, gen strukturalny dla swoistego receptora, gen hamujący działanie antygeny SDM zlokalizowany w obrębie chromosomu X i gen aktywujący antygen SDM sprzężony z chromosomem Y.

Nawet najdokładniejsze analizy relacji fenotypowo-chromosomowych wykorzystujących efekty dyskusji nad rolą antygeny H-Y (antygeny SDM) jako kandydata na głównego determinanta płci TDF (testis determining factor) nie wytrzymały próby czasu, bowiem nie tłumaczyły etiologii dwóch grup przypadków z odwróceniem płci: mężczyźni — 46,XX (M-XX) i kobiety — 46,XY (K-XY).

W pierwszym przypadku chorzy mężczyźni cierpieli na atrofie jąder, której towarzyszyły: hyperplazja komórek Leydiga, zeszkliwienie błon podstawnych kanalików krętych, wybitnie upośledzona spermatogeneza, niepłodność i ginekomastia. W badaniach dodatkowych obserwowano obniżony poziom testosteronu i prawidłowy bądź podwyższony poziom gonadotropin.

Drugą grupę chorych, fenotypowych kobiet (K-XY), charakteryzuje bezpłodność spowodowana brakiem prawidłowo rozwiniętych jajników, występujących w postaci łącznotkankowych pasm (w których istnieje 20%–30% ryzyka transformacji nowotworowej). W efekcie dysgenezy gonad u chorych obserwuje się także niski poziom estrogenów, wysoki poziom gonadotropin, pierwotny brak miesiączki, infantylne niekiedy wewnętrzne i zewnętrzne narządy płciowe, niedorozwój piersi. Pacjentki te mają najczęściej prawidłowy wzrost.

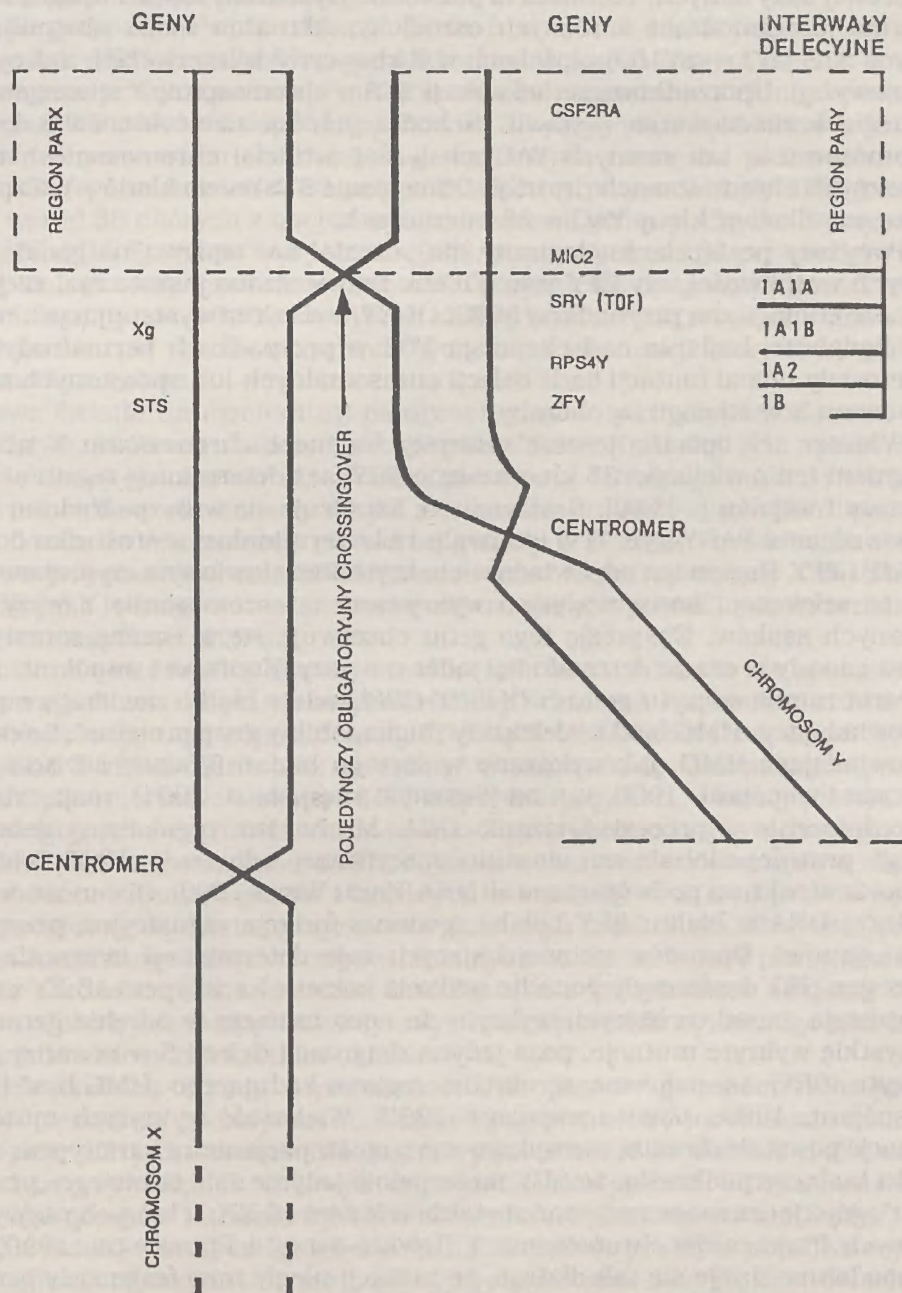
Wraz z coraz liczniejszymi informacjami na temat molekularnych homologii pomiędzy chromosomami X i Y przypomniano obserwacje sprzed niemal 50 lat dotyczące zjawiska crossing-over pomiędzy obu chromosomami (BURGOYNE 1982). Wyniki badań molekularnych, wsparte obserwacjami w mikroskopie elektronowym, doprowadziły do wyodrębnienia w chromosomach X i Y regionu PAR

(pseudo autosomal region). Region PAR (PARY w przypadku chromosomu Y), znajdujący się w terminalnym regionie Yp, ma wielkość $2,5 \times 10^6$ bp (MÜLLER 1990). Region PAR (PARX w przypadku chromosomu X) chromosomu X unika inaktywacji, co dobrze ilustruje potwierdzony fakt unikania X — inaktywacji przez dwa geny genomu kobiety, zlokalizowane w tym subregionie (antygen Xg oraz gen STS — steroid sulfatase deficycy). Jakkolwiek oba chromosomy X męczyzn-XX (M-XX) są morfologicznie nierozróżnialne, to jednak przy dokładniejszej analizie (MAGENIS i współaut. 1982) lub po zastosowaniu specjalnych technik (DEBIEC -RYCHTER i współaut. 1982) dokonano obserwacji sugerujących niewzajemną (unequal) X-Y rekombinację podczas ojcowskiej mejozy, co w rezultacie przyniosło insercję materiału genetycznego chromosomu Y, zawierającego TDF (testis determining factor) do zygoty 46,XX. W rzeczywistości badania molekularne potwierdziły, że część przypadków M-XX jest TDF(+).

Analiza map delecyjnych (patrz niżej) przypadków M-XX oraz K-XY umożliwiła lokalizację genu/genów kandydata odpowiadającego kryterium TDF w dystalnym regionie Yp poniżej regionu PARY (PAGE i współaut. 1987). W kolejnym etapie badań dokonano izolacji i sekwencjonowania fragmentu DNA o wielkości 140 kb, kodującego specyficzne białko, którego 13 domen, bogatych w cysteinę i histydynę jest związanych z jonami cynku. Opisaną sekwencję określono mianem czynnika ZFY („zinc-finger Y protein”). Czynniki ZFY koduje białko o budowie „palca cynkowego”, czyli białko regulatorowe, aktywujące transkrypcję. Gen ZFY jest pod względem struktury molekularnej podobny do czynnika ZFX, którego locus znajduje się w obrębie ramion Xp (Xp22.3). Sekwencja nukleotydowa obu genów została opublikowana przez SCHNEIDER-GÄDICKE i współaut. w roku 1989. W chwili obecnej wydaje się jednak pewnym, że czynnika ZFY nie można utożsamiać z czynnikiem TDF, naukowa weryfikacja poglądu na temat wyłączności roli czynnika ZFY nastąpiła po opublikowaniu wyników badań molekularnych (PALMER i współaut. 1989, JÄGER i współaut. 1990). Autorzy przebadali łącznie 22 przypadki z odwróconą płcią (sex reverse). W tej grupie w 5 przypadkach przy nieobecności sekwencji ZFY(-), wykryto obecność sekwencji specyficznej dla chromosomu Y, zlokalizowanej w bezpośredniej bliskości regionu PARY(+).

Przeprowadzenie analizy restrykcyjnej DNA z użyciem blisko 140 specyficznych dla chromosomu Y sond molekularnych u ponad 100 pacjentów i pacjentek, rekrutujących się z dwóch wyżej wymienionych grup chorych oraz przypadków z różnego typu aberracjami struktury chromosomu Y, w tym translokacjami Y/autosomy umożliwiło skonstruowanie tak zwanej delecyjnej mapy chromosomu Y, na której wyodrębniono 7 interwałów (VERGNAUD i współaut. 1986). Obecność lub nieobecność „sygnałów hybrydyzacyjnych” upoważniała autorów tych prac do coraz dokładniejszej identyfikacji molekularnej struktury chromosomu Y (ryc. 7).

Dokładniejszą mapę chromosomu Y, a ściślej 98% euchromatyny chromosomu Y, opracowano używając 196 rekombinacyjnych klonów DNA (FOOTE i współaut. 1992) wykorzystując tak zwany STS (sequence tagged sites). STS jest to krótki odcinek genomowego DNA, który może być rozpoznany metodą PCR i zmapowany w określonym punkcie genomu, gdzie dany STS może służyć jako punkt odniesienia (znak; ang. landmark). STS'y i odpowiednio wyselekcjonowa-



Ryc. 7. Schemat przedstawia X-Y obligatoryjny crossing-over oraz lokalizację niektórych genów ramienia Yp i Xp w obrębie regionu PARY i PARX oraz w najbliższym sąsiedztwie (rycinę opracowano na podstawie publikacji: BURGOYNE 1982 oraz FOOTE i współaut. 1992).

ne sekwencje DNA metodą PCR mogą być dalej analizowane przy użyciu komputerowej bazy danych. Technika ta pozwoliła usystematyzować i uporządkować informacje pochodzące z różnych ośrodków. Aktualna mapa obejmuje 160 pozycji STS (sY1 — sY160) ułożonych w 7 klasycznych interwałach delecyjnych (patrz wyżej). Uporządkowanie sekwencji STS w chromosomie Y stworzyło nową strategię konstruowania zestawu zachodzących na siebie klonów sekwencji chromosomu w tak zwanych YAC'ach (yeast artificial chromosomes), to jest sztucznych chromosomach drożdży. Odniesienie STS'ów do klonów YAC pozwoliło uporządkować klony YAC w 28 interwałach.

Powyższy postęp technologiczny nie pozostał bez wpływu na generowanie nowych wątpliwości, czy ZFY jest TDFem. Potwierdzono jeszcze raz niejednorodność etiologiczną przypadków M-XX i K-XY, zwłaszcza występujących rodzinie. Podobnie, badania nad ekspresją TDF w przypadkach hermafrodytyzmu sugerowały udział mutacji bądź delecji autosomalnych lub sprzężonych z chromosomem X w etiologii tej choroby.

Wkrótce też opisano jeszcze mniejszy fragment chromosomu Y niż ZFY. Fragment ten o wielkości 35 kb, nazwano SRY (sex determining region of the Y; SINCLAIR i współaut. 1990). Sekwencję tę lokalizuje się w bezpośrednim sąsiedztwie regionu PARY (ryc. 7) w interwale 1A1A terminalnie w stosunku do genu *RPS4Y* i *ZFY*. Region ten odpowiada wielu kryteriom stawianym czynnikowi TDF: jest to sekwencja konserwatywna wykrywana w chromosomie Y wszystkich badanych ssaków. Ekspresję tego genu obserwuje się w tkance somatycznej zrębu gonady w czasie determinacji jąder u myszy (KOOPMAN i współaut. 1990). Otwarta ramka odczytu genu *SRY* (*SRY-ORF*) koduje białko zawierające motyw odpowiadający „HMG box” białek klasy „high mobility grup proteins”. Sekwencje odpowiadające HMG, jak wykazano w szeregu badań (WRIGHT i DIXON 1988, JANTZEN i współaut. 1990, VAN DE WETERING i współaut. 1991), mają zdolność pośredniczenia w procesie wiązania DNA. Mechanizm regulacyjny genu *SRY* polega prawdopodobnie na wiązaniu specyficznej sekwencji „HMG box” tego białka ze strukturą podwójnej spirali DNA (KING i WEISS 1993). Obecność domeny wiążącej DNA w białku *SRY* byłaby zgodna z funkcją regulacyjną przypisaną temu genowi. Dowodów potwierdzających rolę determinacji tworzenia jąder przez gen *SRY* dostarczyły ponadto badania kobiet z kariotypem 46,XY z czystą dysgenezją gonad, u których wykryto *de novo* mutacje w odrębie genu *SRY*. Wszystkie wykryte mutacje, poza jedyną dotyczącą delecji 5 w otwartej ramce odczytu *SRY*, są położone w obrębie regionu kodującego „HMG box” (BERTA i współaut. 1990, JÄGER i współaut. 1990). Większość wykrytych mutacji to mutacje powstałe *de novo*, nie wykrywane u ojców pacjentek z kariotypem 46,XY. Wielu badaczy podkreśla, że *SRY* może pełnić jedynie rolę swoistego „przełącznika”, gdyż jądra mogą rozwinać się także u kobiet 46,XX, u których nie wykryto żadnych fragmentów chromosomu Y (LOVELL-BADGE i ROBERTSON. 1990). Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że mutacji uległy inne fragmenty genomu. Natomiast gen *SRY* determinujący (rozpoczynający) tę przemianę — jest obecny jedynie w chromosomie Y. Uznanie genu *SRY* za TDF jest jednocześnie końcem jednego i początkiem nowego etapu poszukiwań. Szczególnie interesujące dla tych poszukiwań są przypadki kobiet 46,XY, u których nie wykryto mutacji

w genie SRY. Dlaczego nie powstały u nich jądra? Czy istnieją mutacje innych genów, poprzedzające działanie genu SRY?

W 30 przypadkach prawdziwego hermafrodytyzmu 46,XX jedynie trzy okazały się być SRY(+), a dla 27 przypadków nadal postulowanym mechanizmem etiopatogenetycznym pozostaje autosomalna lub sprzężona z chromosomem X mutacja (McELREAVEY i współaut. 1992). W 35 przypadkach M-XX, wśród których nie obserwowano obojnaczych zewnętrznych narządów płciowych, obecność SRY(+) stwierdzono w 32 przypadkach, trzy przypadki były SRY(-), natomiast wśród 38 chorych z obojnaczymi narządami płciowymi tylko 2 przypadki były SRY(+) (McELREAVEY i współaut. 1993), pozostałych zaś 36 przypadków było SRY(-). Jak już wspomniano u większości pacjentek z dysgenezją gonad, obarczonych kariotypem 46,XY, nie wykryto delecji bądź mutacji w obrębie genu SRY a pomimo to nie doszło u tych chorych do determinacji pierwotnej gonady w kierunku męskim.

Nowe światło na mechanizm patogenetyczny w tym przypadku rzuca opis rodzeństwa, któremu matka, nosicielka duplikacji Xp21.2p22.11, przekazała nieprawidłowy chromosom X, ojcowie z pierwszego i drugiego małżeństwa przekazali prawidłowy chromosom Y i, jak się okazało, prawidłowy gen SRY i pomimo to nie doszło do determinacji pierwotnej gonady w kierunku męskim. Powyższa obserwacja potwierdza rolę SRVX („sex reversal locus” sprzężony z chromosomem X) jako jednego z mechanizmów zaburzających prawidłową determinację płci (ARN i współaut. 1994).

Opisano autosomalny „sex reversal locus”, SRA1 w trzech nie spokrewnionych przypadkach dysplazji kampoimielicznej, w których rozpoznano zrównoważoną traslokację obejmującą region 17q24q25 (TOMMERUP i współaut. 1993). Wskazano istnienie genu „sex reversing” w ramieniu 9p (BENNETT i współaut. 1993). Opisano wreszcie chorą 46,XY z dysgenezją gonad, u której stwierdzono mikrodelecję sekwencji DNA chromosomu Y przy obecności prawidłowego genu SRY (McELREAVEY i współaut. 1992), co może wskazywać na obecność w obrębie chromosomu Y innych genów włączonych w kaskadę wydarzeń prowadzących do prawidłowej determinacji gonady w kierunku męskim (BOCZKOWSKI 1971). Identyfikacja innych genów, odpowiedzialnych za determinację płci, może okazać się bardzo trudna i żmudna. Dziś lepiej niż kiedykolwiek zdajemy sobie sprawę z faktu, jak skomplikowanym systemem jest embriogeneza gonad, która kreuje tak wiele w tak krótkim okresie.

Spektakularny wyścig o pierszeństwo w opisanii genu determinującego rozwój pierwotnej gonady pozwolił nam lepiej zrozumieć mechanizm determinacji płci, ale jednocześnie uświadomił, jak wiele jest do zrobienia, aby umieć w każdym przypadku chorobowym odpowiedzieć na pytanie, który z elementów złożonego procesu determinacji i różnicowania uległ zaburzeniu. Niemniej jednak, już dzisiaj szereg osiągnięć można aplikować do praktyki poradnianej.

Możliwość sporządzania map delecyjnych chromosomu Y (nie w celach poznawczych, ale diagnostycznych) przy użyciu kilkudziesięciu sond molekularnych (tab. 1), pozwala znakomicie uprecyzynić rozpoznania cytogenetyczne, umożliwiając lokalizację punktów złamań tego bardzo małego chromosomu z niespotykaną dotąd dokładnością. Ma to znaczenie rokownicze w tych przy-

Tabela 1

Lista 32 specyficznych dla chromosomu Y sond molekularnych zgromadzonych w Zakładzie Genetyki Medycznej A. M. w Łodzi, umożliwiających sporządzanie map delecyjnych chromosomu Y dla celów poradnictwa genetycznego. Wielkość insertu jest podana w tysiącach par zasad (kb)

L.p.	Sonda	Locus	Lokalizacja	Wektor	Insert
1.	pDP230	DXYS20	Yp11.3	pUC13	2.2
2.	Y-286(Yp)	DYS184p	Yp11.3	pBR322	1.7
3.	pHU14 (#)	SRY	Yp11.3	pUC18	12.7
4.	pZFY	ZFY	Yp11.3	pUC18	1.3
5.	Y-280	DYS186	Yp11.3-11.2	pBR322	2.2
6.	Y-227	DYS185	Yp11.3-11.2	pBR322	2.8
7.	Y-156	DYZ2	Yp11.2	pUC18	4.4
8.	Y-190	DYZ5	Yp11.2	pBR322	3.5
9.	47z	DXYS5Y	Yp11	pBR327	2.3
10.	pDP34	DXYS1Y	Yp11	pDP322	2.2
11.	Y-431		Yp	pBR322	3.5
12.	Y-182		Yp	pBR322	1.85
13.	Y-219		Yp	pBR322	5.1
14.	Y-223a		Yp	pBR322	0.75
15.	118e (@)	DYS8	Yp		
16.	52d (@)	DYF27	Yp	pBR322	1.1
17.	Y-97	DYZ3	Ycen	pBR322	6.7
18.	50f2	DYS7	Yq11	pBR327	1.7
19.	49f	DYS1	Yq11	pBR322	2.8
20.	M1A	DXS31Y	Yq11	pBR322	2.1
21.	Y-253	DYS106	Yq11.21-11.22	pBR322	3.6
22.	Y-198	DYS168	Yq11.21-11.22	pBR322	1.2
23.	Y-157a	DYS112	Yq11.21-11.22	pBR322	3.7
24.	Y-221	DYS109	Yq11.21-11.22	pBR322	2.4
25.	Y-294	DYS110	Yq11.21-11.22	pBR322	2.1
26.	Y-202	DYS107	Yq11.23	pBR322	1.5
27.	Y-216a	DYS108	Yq11.23	pBR322	2.4
28.	Y-460	DYS154	Yq11.23	pUC18	1.2
29.	Y-214	DYS111	Yq11.23	pBR322	2.3
30.	Y-286	DYS184q	Yq11.23	pBR322	1.7
31.	Y-402	DYS155	Yq11.23	pUC18	3.5
32.	Y-418	DYS156	Yq11.23	pUC18	2.5

- w polach zacienionych wymieniono próby zakupione w ATCC

- symbolem (@) oznaczono próby udostępnione przez J. Weissenbacha, Instytut Pasteura, Paryż, Francja

- symbolem (#) oznaczono próbę udostępnioną przez P. N. Goodfellow, Uniwersytet Cambridge, Anglia

- pozostałe próby zostały udostępnione przez U. Müllera, Instytut Genetyki Człowieka, Uniwersytet w Giessen, Niemcy

padkach, gdzie punkt złamania jest zlokalizowany w/lub powyżej regionu ILA (lateral asymmetry) (KAŁUŻEWSKI 1984, 1985).

Molekularna analiza DNA umożliwia identyfikację markerów chromosomowych i łatwą identyfikację markerów pochodzących z chromosomów X i Y, których obecność może towarzyszyć lub wręcz wywoływać zaburzenia cielesno płciowe, ale nie pociąga za sobą innych ciężkich nieprawidłowości fenotypowych. Ma to duże znaczenie w prognostyce diagnostyki prenatalnej. Wdrożenie testu na obecność w genomie genu *SRY* oraz sekwencji centromerowych chromosomu Y (WITT i współaut. 1993, KOCOVA i współaut. 1993, 1994) umożliwia wyselekcjonowanie grupy przypadków zwiększonego ryzyka transformacji nowotworowej dysgenetycznej gonady i jest wskazaniem do profilaktycznego usunięcia nieprawidłowych gonad. Zabieg ten zresztą może być przeprowadzony na drodze laparoskopii operacyjnej.

Trzeba przyznać, że, podobnie jak w innych dziedzinach nauki, w diagnostyce i terapii zaburzeń cielesno płciowych istnieje dramatyczna różnica pomiędzy spektakularnymi osiągnięciami w naukach podstawowych, w tym przypadku biologii molekularnej, i aplikacją tych osiągnięć w medycynie praktycznej. W Zakładzie i Poradni Genetyki Medycznej w Łodzi w okresie 25 lat zdiagnozowano 874 przypadków aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów, z czego 354 są to przypadki aberracji liczbowych i strukturalnych chromosomów płciowych, co stanowi około 40% liczby ogólnej. U 354 chorych postawiono diagnozę, wdrożono leczenie, niekiedy leczenie operacyjne. U wielu chorych uzyskano zadowalające wyniki, optymalizując ich adaptację do środowiska. Pozostaje jednak uczucie niedosytu, bowiem tak rzadko możemy powiedzieć, że wyleczyliśmy chorego z zaburzeniem cielesno-płciowym w sensie „*restitutio ad integrum*”, tak niewiele mamy również do zaproponowania naszym pacjentom, jeśli chodzi o profilaktykę choroby.

Fakt pojawienia się unikalnych sekwencji satelitarnego DNA chromosomu Y był prawdopodobnie pierwszym krokiem na ewolucyjnej drodze uzyskania morfologicznej tożsamości tego chromosomu (BRUTLAG 1980, KUNKEL i współaut. 1977). Na drodze ewolucji od prymitywnych kręgowców, u których nie obserwujemy dimorfizmu chromosomów płciowych, do człowieka chromosom Y w odróżnieniu od chromosomu X został niemal zupełnie pozbawiony loci genowych, z wyjątkiem determinujących płć, kontrolujących rozwój gonad, pośrednio kontrolujących rozwój układu moczowo-płciowego oraz 6 innych dotychczas opisanych genów (McKUSICK 1992). Podczas tego procesu, nazywanego „erozją chromosomu Y” (DARLINGTON 1958) lub „degeneracją chromosomu Y” (MONSALVE i współaut. 1980) rozmiary tego chromosomu zostały zredukowane do 1/3 chromosomu X. Wielu autorów przyjmuje, że translokacja była mechanizmem napędowym ewolucji niezróżnicowanych chromosomów płciowych niższych kręgowców do chromosomów dimorficznych ssaków wyższych i człowieka. Po szeregu rearanżacjach cytogenetycznych, chromosom X stał się „chimerą” subregionów, odpowiedzialnych za cechy somatyczne oraz funkcję gonad, wykazujących homologię z chromosomem Y, co znalazło szereg potwierdzeń, również z zakresu badań molekularnych. Wydaje się więc prawdopodobne, że w procesie ewolucji chromosom Y „podzielił” się odpowiedzialnością za determinację

i różnicowanie pierwotnej gonady z chromosomem X i prawdopodobnie autosomami.

Przy całym entuzjastycznym podziwie dla postępu technologicznego, który towarzyszył opisaniu genu *SRY*, należy z szacunkiem odnieść się do postulowanego od szeregu lat przez MITTWOCH (1992, 1993) poglądu o wieloczynnikowym z progową dichotomią systemie determinacji płci. Autorka od lat sceptycznie odnosi się do prób wyjaśnienia mechanizmu determinacji pierwotnej gonady z udziałem jednego genu. Przeciwno takiemu mechanizmowi przemawia szereg starannie dokonanych obserwacji naukowych (MITTWOCH 1992). Stąd odpowiadając na zadane w tytule pytanie, o rolę chromosomów płciowych w determinacji płci należy odpowiedzieć twierdząco: prawidłowy rozwój męczyzny jest związany z prawidłowym kariotypem 46,XY a kobiety — 46,XX.

Powierzenie przez proces ewolucji tak ważnego genu, jak gen *SRY* chromosomowi, który szczególnie często jest narażony na nierozdzielność (non-disjunctio) mitotyczną i mejoetyczną, który często ulega aberracjom strukturalnym, niebezpiecznym gdy punkt złamania jest zlokalizowany w/lub powyżej I regionu LA (KAŁUŻEWSKI i współaut. 1978, LIMON i współaut. 1979, KAŁUŻEWSKI 1984, 1985) każe wątpić, czy jest to rozwiązanie optymalne. Tylko spekulacją byłby pogląd, że „erozja” chromosomu Y będzie trwała nadal i zmieni ona mechanizm determinacji płci gatunku *Homo sapiens* w perspektywie 20–40 milionów lat.

Autor dziękuje Doktor A. Jeziorowskiej i Doktorowi L. Jakubowskiemu za kreatywną dyskusję też artykułu oraz Doktorowi L. Dudarewiczowi za pomoc w przygotowaniu manuskryptu.

DO WE NEED SEX CHROMOSOMES?

Summary

The author presents problems encountered by a practising physician when diagnosing the sex of patients with disturbances of sexual differentiation. Evolution of the present knowledge of the role of the Y chromosome, H-Y antigen, factor SDM, ZFY and ZFX sequences and *SRY* gene in the process of a determination of the primary gonad is described. The author emphasizes limitations of our capabilities in prophylaxis and therapy of disturbances of sexual differentiation.

LITERATURA

- ARN P., CHEN H., TUCK-MULLER C., MANKINEN C., WACHTEL G., LI S., SHEN C.-C., WACHTEL S. S., 1994. *SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11*. Hum. Genet., 93, 389–393.
- BENNETT C. P., DOCHERTY Z., ROBB S. A., RAMANI P., HAWKINS J. R., GRANT D., 1993. Deletion 9p and sex reversal. J. Med. Genet., 30, 518–520.
- BERTA P., HAWKINS J. R., SINCLAIR A. H., TAYLOR A., GRIFFITHS B. L., GOODFELLOW P. N., FELLOUS M., 1990. Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. Nature, 348, 448–450.
- BILIKIEWICZ T., IMIELŃSKI K., 1978. Seksuologia kliniczna, PZWL, Warszawa, 89–100.
- BOCHKOWSKI K., 1971. Sex determination and gonadal differentiation in man. Clin. Genet., 2, 379–386.
- BRUTLAG D. L., 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. Ann. Rev. Genet., 14, 121–144.
- BURGOYNE P., 1982. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of mammals. Hum. Genet., 61, 85–90.

- COHEN-HAGUENAUER O., PICARD J. Y., MATTEI M. G., SERERO S., NGUYEN V. C., TAND DE M. F., GUERRIER D., HORS-CAYLA M. C., JOSSO N., FREZAL J., 1987. Mapping of the gene for anti-Müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 44, 2-6.
- DAIGER S. P., CHAKRABORTY R., 1985. Mapping the human Y chromosome. W: SANDBERG A. A. (red.). *Progress and Topics in Cytogenetics*, 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 93-124.
- DARLINGTON C. D., 1958. *The evolution of genetic systems*. Basic Books, New York, 265.
- DĘBIEC-RYCHTER M., KALUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., MORUZGAŁA T., ZARZYCKI J., KULA K., 1982. Does the heteromorphism of X chromosome in XX males really exist?, 8th International Chromosome Conference Lübeck, Abstracts, 2-13.
- FOOTE S., VOLLRATH D., HILTON A., PAGE D. C., 1992. The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science*, 258, 60-65.
- GRUMBACH M. M., VAN WYKE J. J., 1974. Disorders of sex differentiation. W: WILLIAMS R. H., (red.). *Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 423-501.
- HOEKSTRA R. F., 1990. The evolution of male-female dimorphism: Older than sex? *J. Genet.*, 69, 11-15.
- HORNBY A. S., 1974. *Oxford Advanced Learner's Dictionary of Current English*. Oxford University Press, Oxford, 782.
- JACOBS P. A., ROSS A., 1966. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature*, 210, 352-354.
- JÄGER R. J., ANVRET M., HALL K., SCHERER G., 1990. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate gene SRY. *Nature*, 348, 452-454.
- JANTZEN H-M., ADMON A., BELL S. P., TJIAN R., 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*, 344, 830-836.
- JOSSO N., LAMARRE I., PICARD J., BERTA P., DAVIES N., MORICHON N., PESCHANSKI M., JENY R., 1993. Anti-Müllerian hormone in early human development. *Early Hum. Dev.*, 33, 91.
- KALUŻEWSKI B., JAKUBOWSKI L., 1992. Interseksualizm i dysgenезja gonad. W: PAWLKOWSKI M. (red.), *Zarys endokrynologii klinicznej*, PZWL, Warszawa, 123-165
- KALUŻEWSKI B., 1984. Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część I — Chromosom X. *Postępy Biologii Komórki*, 11, 203-238.
- KALUŻEWSKI B., 1984. Chromosomy płciowe człowieka. Wybór informacji. Część II — Chromosom Y. *Postępy Biologii Komórki*, 11, 239-262.
- KALUŻEWSKI B., JOKINEN A., HORTLING H., DE LA CHAPELLE A., 1978. A theory explaining the abnormality in 45,X/46,XY mosaicism with non-fluorescent Y chromosome. Presentation of three cases. *Ann. Génét.*, 21, 5-11.
- KALUŻEWSKI B., 1985. Replication kinetics of the human Y chromosome. W: SANDBERG A. A. (red.), *Progress and Topics in Cytogenetics*, 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 327-356.
- KING C-Y., WEISS M. A., 1993. The SRY high-mobility-group box recognizes DNA by partial intercalation in the minor groove: A topological mechanism of sequence specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11990-11994.
- KOCOVA M., SIEGEL S. F., WENGER S. L., LEE P. A., TRUCCO M., 1993. Detection of Y chromosome sequences in Turner's syndrome by Southern blot analysis of amplified DNA. *Lancet*, 342, 140-143.
- KOCOVA M., SIEGEL S. F., NALESNICK M., TRUCCO M., 1994. Detection of Y-chromosome sequences in gonadal tissue of patients with Turner's syndrome (45,X). *New Engl. J. Med.*, 331, 682-683.
- KOOPMAN P., MÜNSTERBERG A., CAPEL B., VIVIAN N., LOVELL-BADGE R., 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348, 450-452.
- KUCZYŃSKA A., 1992. Płeć psychologiczna. Podstawy teoretyczne, dane empiryczne oraz narzędzie pomiaru. *Przeg. Psycholog.*, 237-247.
- KUNKEL L. M., SMITH K. D., BOYER S. H., BORGAONKAR D. S., WACHTEL S. S., MILLER O. J., BREG W. R., JONES H. W., RARY J. M., 1977. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1245-1249.
- LIMON J., GIBAS Z., KALUŻEWSKI B., MORUZGAŁA T., 1979. Demonstration of two different regions of lateral asymmetry in human Y chromosomes. *Hum. Genet.*, 51, 247-252.
- LOVELL-BADGE R., ROBERTSON E., 1990. XY females resulting from a heritable mutation in the murine primary testis-determining gene. *Development*, 109, 635-646.
- MAGENIS R. E., WEBB M. J., MCKEAN R. S., 1982. Translocation (X;Y)(p22.3;p11.2) in XX males: etiology of male phenotype. *Hum. Genet.*, 62, 271-276.
- MCELREAVEY K., RAPPAPOORT R., VILAIN E., ABBAS N., RICHARD F., LORTAT-JACOB S., BERGER R., LECONIAT M., BOUCEKKINE C., KUCHERIA K., TEMTAMY S., NIHOUL-FEKETE C., BRAUNER R., FELLOUS M., 1992. A

- minority of 46,XX true hermaphrodites are positive for the Y-DNA sequence including SRY. *Hum. Genet.*, 90, 121-125.
- McELREAVEY K., VILAIN E., ABBAS N., HERSKOVITZ I., FELLOUS M., 1993. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3368-3372.
- McKUSICK V. A., 1992. *Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes.* The John Hopkins University Press, Baltimore and London, CXCIV-CXCV.
- MITTWOCH U., 1992. Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. *Hum. Genet.*, 89, 467-479.
- MITTWOCH U., 1993. Identical SRY mutations with different phenotypic effects. *Am. J. Hum. Genet.*, 52, 1272-1273.
- MONSALVE M. V., ERDTMANN B., OTTO P. A., FROTA-PESSOA O., 1980. The human Y chromosome: racial variation and evolution. *Rev. Brazil. Genet.*, 4, 443-446.
- MÜLLER U., 1985. The H-Y antigen: Identification, function, and role in sexuality. W: *Progress and Topics in Cytogenetics*, SANDBERG A. A. (red.), 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 63-80.
- MÜLLER U., 1990. Searching for the testis-determining factor. *Contemporary Ob/Gyn*, April, 1-6.
- PAGE D. C., MOSHER R., SIMPSON E. M., FISHER E. M. C., MARDON G., POLLACK J., MCGILLIVRAY B., DE LA CHAPPELLE A., BROWN L. G., 1987. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, 51, 1091-1104.
- PALMER M. S., SINCLAIR A. H., BERTA P., ELLIS N. A., GOODFELLOW P. N., ABBAS N. E., FELLOUS M., 1989. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*, 342, 937-939.
- SANOCKI W., 1980. *Kwestionariusze osobowości w psycho-logii.* PWN, Warszawa. 214-219.
- SCHNEIDER-GÄDICKE A., BEER-ROMERO P., BROWN L. G., NUSSBAUM R., PAGE D. C., 1989. ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, 57, 1247-1258.
- SIEK S., 1983. *Wybrane metody badania osobowości.* Akademia Teologii Katolickiej, Warszawa. 71.
- SINCLAIR A. H., BERTA P., PALMER M. S., HAWKINS J. R., GRIFFITHS B. L., SMITH M. J., FOSTER J. W., FRISCHAUF A.-M., LOVELL-BADGE R., GOODFELLOW P. N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- TOMMERUP N., SCHEMP W., MEINECKE P., PEDERSEN S., BOLUND L., BRANDT C., GOODPASTURE C., GULDBERG P., HELD K. R., REINWEIN H., SAUGSTAD O. D., SCHERER G., SKJELDAL O., TODER R., WESTVIK J., HAGEN C. D., VAN DER WOLF U., 1993. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3q25.1. *Nature Genet.*, 4, 170-174.
- VERGNAUD G., PAGE D. C., SIMMLER M. C., BROWN I., ROUYER F., NOEL B., BOTSTEIN D., CHAPPELLE DE LA A., WEISSENBACH J., 1986. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.*, 38, 109-124.
- VAN DE WETERING M., OOSTERWEGEL M., DOOIJES D., CLEVERS H., 1991. Identification and cloning of TCF-1, a lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.*, 10, 123-132.
- WITT M., MICHALCZAK K., LATOS-BIELEŃSKA A., JARUZELSKA J., KUCZORA I., LOPEZ M., 1993. An improved, non-isotopic method of screening cells from patients with abnormalities of sexual differentiation for Y chromosomal DNA content. *J. Med. Genet.*, 30, 304-307.
- WOLF U., 1985. *Genes of the H-Y antigen system and their expression in mammals.* W: *Progress and Topics in Cytogenetics*, SANDBERG A. A. (red.), 6A, Alan R. Liss, Inc., New York, 81-92.
- WRIGHT J. M., DIXON G. H., 1988. Induction by torsional stress of an altered DNA conformation 5' upstream of a gene for a high mobility group protein from trout and specific binding to flanking sequences by the gene product HMG. *T. Biochemistry*, 27, 576-581.

JOLANTA KWIATKOWSKA¹, DOBRAWA LISIECKA¹,
RYSZARD SŁOMSKI^{1, 2}, BARBARA SIEMIENIAKO²,
JADWIGA SOWIŃSKA³, BOŻENA GALAS-ZGORZALEWICZ³,
EWA EMICH-WIDERA⁴, ELŻBIETA MARSZAŁ⁴, TADEUSZ CIESIELSKI⁵

¹Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

³Klinika Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej w Poznaniu

⁴II Klinika Pediatrii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

⁵Oddział Neurologiczny Szpitala Wojewódzkiego w Olsztynie

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA DYSTROFII MIĘŚNIOWEJ DUCHENNE'A/BECKERA

WSTĘP

Analiza DNA pacjentów i ich rodzin umożliwia obecnie dla wielu przypadków pełną diagnostykę choroby genetycznej. Liczbę monogenowych chorób genetycznych człowieka szacuje się na ponad 3000 i dla wielu z nich jest znane tylko zaburzenie na poziomie biochemicznym. Już w 1861 i 1868 roku Duchenne opisał po raz pierwszy chorobę, nazwaną później dystrofią mięśniową Duchenne'a. Pierwsze doniesienia o chorobie były, jak na ówczesne lata, bardzo nowoczesne — zawierały dokładne opisy kliniczne uzupełnione wynikami badań z zakresu fizjologii i histologii mięśni (DUCHENNE 1861, 1868, GOWERS 1879).

Rozwój nowych technik badawczych w ostatnich latach umożliwił bliższe poznanie molekularnego podłoża dystrofii. W 1986 roku zlokalizowano w prażku Xp21 w chromosomie X gen wywołujący dystrofię (gen *DMD*)*.

Od tej pory rozwój wydarzeń potoczył się w błyskawicznym tempie. W okresie krótszym niż rok wyizolowano gen (MONACO i KUNKEL 1988, KOENIG i współaut. 1987), poznano strukturę cDNA i wykryto białkowy produkt genu, który nazwano dystrofina (HOFFMAN i współaut. 1987, 1988). Technika elektroforezy w zmiennym polu wykazano, że gen *DMD* zawiera 2,5 miliona par zasad (2,5 Mbp), co stanowi ponad 1% DNA chromosomu X (0,001 genomu człowieka) (DEN DUNNEN i współaut. 1987, 1989). Liczba eksonów genu *DMD* nie jest dokładnie

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych. Numer projektu badawczego 6P 207 109 04.

*Wykaz stosowanych skrótów: CK — kinaza kreatynowa (E.C. 2.7.3.2), BMD — dystrofia mięśniowa typu Beckera, DMD — dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a, PCR — reakcja łańcuchowa polimerazy, pz — pary zasad, RFLP — polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, VNTR — tandemowe powtórzenia o dużej zmienności.

znana, ale przyjmuje się, że jest ich ponad 78. Eksony są przedzielone intronami o średniej wielkości 35 kb (KOENIG i współaut. 1987, VAN OMMEN i współaut. 1987). cDNA dystrofiny jest stosunkowo mały, złożony z 13 973 nukleotydów, z czego pierwsze 11 336 nukleotydów koduje białko, a reszta stanowi region nie ulegający translacji (KOENIG i współaut. 1988, 1989).

Dystrofina kodowana przez gen *DMD* jest dużym białkiem, o masie 427 kDa zbudowanym z 3685 aminokwasów i jest białkiem mocno konserwatywnym, szczególnie na końcu karboksylowym. Na przekrojach podłużnych i poprzecznych preparatów mikroskopowych włókien mięśniowych zaobserwowano, że dystrofina występuje w sarkolemie, w postaci cienkiej, nieprzerwanej warstwy.

Dystrofie mięśniowe są zaliczane do najczęstszych chorób genetycznych. W oparciu o dane kliniczne i genetyczne wyodrębniono dystrofie sprzężone z chromosomem X (DMD, dystrofia Duchenne'a, BMD, dystrofia Beckera oraz dystrofia Emery-Dreifuss'a), dystrofie dziedziczone jako autosomalne cechy recesywne (np. dystrofia obręczowo-kończynowa) i jako autosomalne cechy dominujące (np. dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramieniowa i dystrofia miotoniczna) (HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ 1992, ZAREMBA 1992). DMD jest chorobą letalną, występującą z częstością 1/3500 noworodków płci męskiej (EMERY 1991) i w 1/3 przypadków jest następstwem nowych, sporadycznych mutacji (MOSER 1984). BMD występuje z około 10-krotnie mniejszą częstością. Jako mutacje najczęściej występujące w locus DMD/BMD stwierdzono delecje; stanowią one 60%–65% wszystkich mutacji (KOENIG i współaut. 1987, DEN DUNNEN i współaut. 1987, FORREST i współaut. 1987, DARRAS i współaut. 1988, GILLARD i współaut. 1989) i często obejmują duże fragmenty genu. Duplikacje w locus DMD/BMD wykazano u około 5% pacjentów; obejmują one zarówno sekwencje wewnątrzgenowe, jak i położone w bezpośrednim sąsiedztwie genu. Pozostałe mutacje (około 30%) to prawdopodobnie mutacje punktowe. Zarówno delecje, jak i duplikacje oraz mutacje punktowe prowadzą do zmian w strukturze dystrofiny i w rezultacie do zaburzeń funkcji tego białka.

Współczesna diagnostyka chorób nerwowo-mięśniowych powinna uwzględniać wyniki badań klinicznych, biochemicznych i molekularnych. W wielu krajach u chorych z klinicznymi objawami dystrofii Duchenne'a lub Beckera i wykazujących podwyższoną aktywność kinazy kreatynowej wykonuje się już rutynowo badania molekularne. W naszym kraju badania molekularne są wykonywane w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN (Poznań), Instytucie Psychiatrii i Neurologii (Warszawa) i Centrum Zdrowia Dziecka (Warszawa). Materiałem do badań może być genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej, z fibroblastów lub kosmków łożyska, a w przypadku diagnostyki prenatalnej z fibroblastów płodu. Podstawową metodą badawczą zmian strukturalnych genu dystrofiny była do niedawna hybrydyzacja genomowego DNA pacjentów z radioaktywnymi sondami molekularnymi. Nowszą metodą wykrywania delecji jest amplifikacja *in vitro* (PCR) eksonów genu *DMD*. Reakcja PCR zrewolucjonizowała diagnostykę DMD i wielu chorób, umożliwiając znacznie szybsze przeprowadzenie analizy i uzyskanie wyniku bez konieczności stosowania radioizotopów.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wdrożenia diagnostyki molekularnej DMD, poznania częstości delecji i regionów najbardziej podatnych na delecje u badanych chorych oraz analizy transkryptów genu *DMD*.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były DNA i RNA wyizolowane z limfocytów krwi obwodowej pacjentów kierowanych do Zakładu Genetyki Człowieka z Kliniki Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej w Poznaniu, Wojewódzkiej Poradni Neurologii Dziecięcej w Olsztynie i Kliniki Neurologii Akademii Medycznej w Katowicach. Ponadto 20 prób DNA otrzymano z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Ogółem wykonano badania u 60 chorych. DNA izolowano z 10 ml krwi obwodowej metodą MILLERA (1988).

Primerami w reakcjach PCR typu multiplex i w cDNA-PCR były syntetyczne oligonukleotydy, których sekwencje przedstawiono w pracy NIEMAN-SEYDE i współautorów (1992). DNA każdego z pacjentów poddawano reakcji łańcuchowej polimeryzacji w miejscach szczególnie łamliwych (1987). W jednej reakcji stosowano jednocześnie kilka par primerów. Sekwencje amplifikowano w 50 μ l mieszaniny zawierającej 0,1–0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 1 x w buforze firmy Amersham, i 25 pmoli każdego z primerów. Na próbki nawarstwiano 30 μ l oleju parafinowego. Po denaturacji DNA przez 7 min w 95°C dodawano do każdej z prób 2,5 jedn. polimerazy (z firmy, z której pochodził bufor) i przeprowadzano 30–35 cykli reakcji. Produkty PCR badano metodą elektroforezy w 1,5% żelach agarozowych.

Sekwencje regionów pERT87-15 i pERT87-8, wykazujących naturalny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, amplifikowano w trzech reakcjach PCR. Mieszanina reakcyjna (50 μ l) zawierała 0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 10% DMSO, 1 x w buforze firmy Amersham i 30 pmoli każdego z primerów: XmnI — P1, P2, BamHI — P1, P2 i TagI — P1, P2. Po amplifikacji 1/10 objętości mieszaniny reakcyjnej sprawdzano metodą elektroforezy w 1,8% żelach agarozowych. Następnie produkty poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Do trawienia pobierano 8 μ l mieszaniny reakcyjnej po amplifikacji, 8 μ l H₂O, 2 μ l buforu do trawienia oraz od 5–10 jednostek enzymu restrykcyjnego.

Sekwencje minisatelitarne locus DXS52 amplifikowano w 50 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,5 μ g DNA, 200 μ M dNTP, 30 pM primera DXS52F, 30 pM primera DXS52R, 1 x w buforze firmy Amersham. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym.

RNA izolowano metodą CHOMCZYNSKIEGO i SACCHI'EGO (1987) z własnymi modyfikacjami. Do syntezy cDNA na matrycy całkowitego RNA limfocytów pobierano 5–20 μ g całkowitego, komórkowego RNA i 200 ng primera specyficznego dla genu DMD (ROBERTS i współaut. 1990).

WYNIKI

Badanie DNA wykonano łącznie dla 60 osób, w tym 26 rodzin. DNA probanda był dostępny do badań w 58 przypadkach DMD i w 2 przypadkach BMD. Dla 20 pacjentów uzyskano informację o rozmiarach delekcji określonych techniką Southern blotting w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. W tabeli 1 przedstawiono informacje o chorych kierowanych na badania.

Tabela 1

Informacje o pacjentach skierowanych na badania DNA do Zakładu Genetyki Człowieka PAN

Nr DNA	Inicjały	Rok urodzenia	Ośrodek	Rozpoznanie
1001	P.A.	NU	Poznań	NU
1002	J.A.	NU	Poznań	NU
1003	S.R.	NU	Poznań	NU
1004	K.P.	NU	Poznań	NU
1005	M.B.	1985	Poznań	DMD
1006	K.K.	1985	Poznań	DMD
1007	Z.K.	1983	Poznań	DMD
1008	S.K.	1982	Poznań	DMD
1009	B.P.	1977	Poznań	DMD
1010	B.W.	1978	Poznań	DMD
1011	B.M.	1979	Poznań	DMD
1012	N.M.	1986	Poznań	DMD
1013	D.G.	NU	Warszawa	DMD
1014	H.R.	NU	Warszawa	DMD
1015	K.J.	NU	Warszawa	DMD
1016	M.P.	NU	Warszawa	DMD
1017	M.B.	NU	Warszawa	DMD
1018	P.A.	NU	Warszawa	DMD
1019	R.J.	NU	Warszawa	DMD
1020	S.M.	NU	Warszawa	DMD
1021	Z.M.	NU	Warszawa	DMD
1022	Z.G.	NU	Warszawa	DMD
1023	D.J.	1977	Poznań	DMD
1024	D.G.	1976	Poznań	DMD
1025	J.M.	1975	Poznań	DMD
1026	G.D.	1980	Poznań	DMD
1027	B.A.	NU	Warszawa	DMD
1028	D.K.	NU	Warszawa	DMD
1029	H.S.	NU	Warszawa	DMD
1030	K.G.	NU	Warszawa	DMD
1031	K.L.	NU	Warszawa	DMD
1032	M.G.	NU	Warszawa	DMD
1033	M.L.	NU	Warszawa	DMD
1034	P.M.	NU	Warszawa	DMD
1035	S.A.	NU	Warszawa	DMD
1036	U.R.	NU	Warszawa	DMD
1037	T.M.	1079	Olsztyn	NU
1038	B.D.	1973	Olsztyn	NU

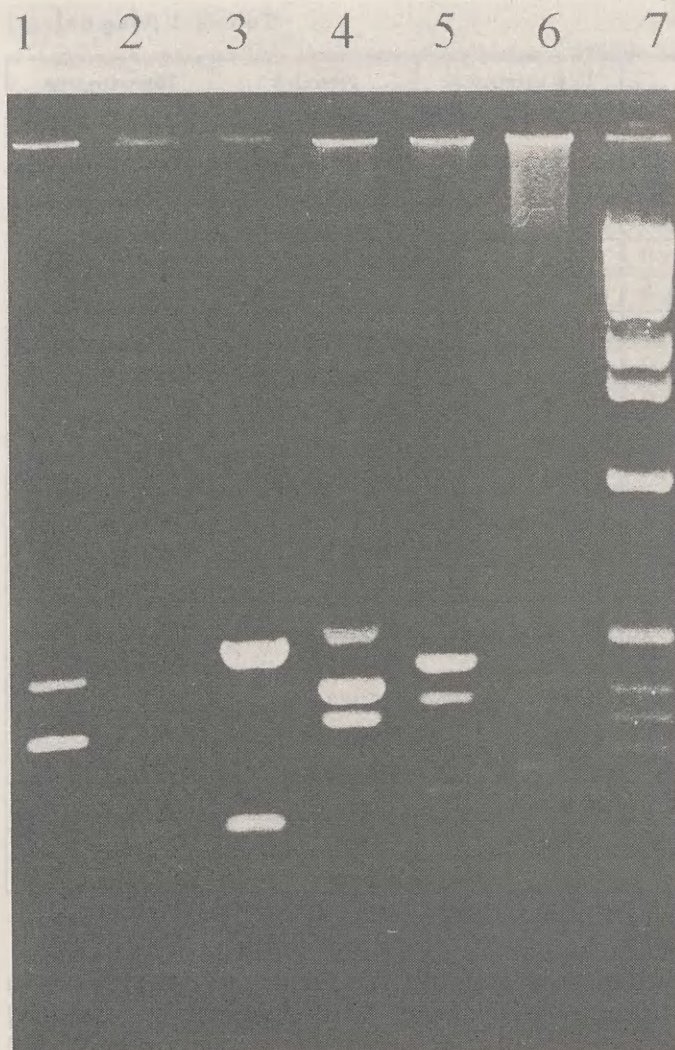
Tabela 1 (ciąg dalszy)

Nr DNA	Inicjały	Rok urodzenia	Ośrodek	Rozpoznanie
1039	L.M.	1977	Olsztyn	NU
1040	W.L.	1981	Olsztyn	NU
1041	G.M.	1979	Poznań	DMD
1042	K.P.	1981	Poznań	DMD
1043	S.M.	1985	Poznań	DMD
1044	K.G.	NU	Poznań	DMD
1045	J.R.	NU	Katowice	DMD
1046	D.P.	NU	Poznań	DMD
1047	D.M.	NU	Poznań	DMD
1048	G.L.	1979	Katowice	DMD
1049	D.M.	1979	Katowice	DMD
1050	S.P.	1985	Katowice	DMD
1051	W.J.	1985	Olsztyn	DMD
1051	L.G.	1984	Olsztyn	DMD
1053	B.P.	1984	Katowice	DMD
1054	K.R.	1986	Katowice	DMD
1055	P.L.	1985	Poznań	DMD
1056	S.M.	1986	Katowice	DMD
1058	Z.G.	1987	Katowice	DMD
1059	B.M.	1988	Katowice	DMD
1060	S.W.	1949	Poznań	FSH
1061	K.P.	1988	Poznań	DMD

NU — informacji o pacjencie nie udzielono; DMD — dystrofia mięśniowa Duchenne'a; FSM — dystrofia twarzowo-łopatkowo-ramieniowa.

Reakcje PCR typu multiplex wykonano u 60 chorych, przy czym w 7 przypadkach analiza obejmowała również rodziny chorych. W rutynowej analizie DNA pacjentów zastosowano 20 par primerów. Na rycinach od 1–3 przedstawiono warianty wykonywanych reakcji multiplex PCR. Zastosowanie reakcji multiplex w badaniach przesiewowych (screening) genu *DMD* wykazało występowanie mutacji w 22 z 40 (55%) przypadków, skierowanych przez oddziały i kliniki neurologiczne. W reakcji PCR stosowano we wszystkich badanych DNA 20 par primerów obejmujących sekwencje kodujące oraz flankujące nukleotydy intronów. W dwóch przypadkach, dla eksonów 52 i 60 produkty PCR stanowiły wyłącznie sekwencje kodujące. Na rycinie 3 przedstawiono przykłady delecji występujących w badanej grupie pacjentów. W tabeli 2 przedstawiono wyniki molekularnej analizy genu *DMD*. W tabeli 3 zebrano wszystkie 42 delecje i odniesiono je do cDNA dystrofiny.

U 18 z 40 przypadków skierowanych do Zakładu Genetyki Człowieka PAN delecji nie zaobserwowano. Po przebadaniu 60 przypadków okazało się, że 36 delecji wystąpiło w regionie 5' genu, a 5 w regionie 3'. Nie wykazano delecji, które obejmowałyby cały gen dystrofiny, natomiast w 28 przypadkach delecje obejmo-



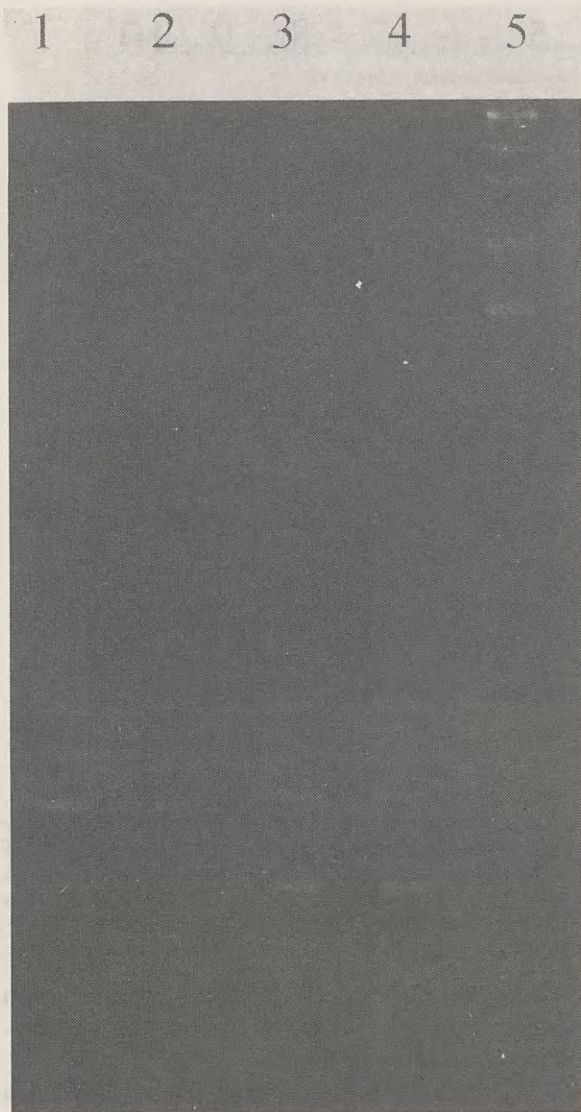
Ryc. 1. Reakcja multiplex PCR dla 20 eksonów genu DMD.

Reakcję wykonywano w 1992 roku zastępując rozdziel w żelu poliakrylamidowym rozdziałem w 1,5% żelu agarozowym o wymiarach 10 x 10 cm. Na żel nakładano 1/5 produktu PCR. Tor 1 — produkty PCR zawierające promotor (535 pz) i eksony 49 (439 pz), 12 (331 pz), 52 (113pz); tor 2 — produkty PCR zawierające eksony: 4 (196 pz), 60 (139pz); tor 3 — produkty PCR zawierające eksony: 48 (506 pz), 50 (271 pz), 6 (202 pz), 46 (140pz); tor 4 — produkty PCR zawierające eksony: 45 (547 pz), 17 (416 pz), 43 (357 pz); tor 5 — produkty PCR zawierające eksony: 19 (459 pz), 51 (388 pz), 13 (238 pz), 47 (181 pz); tor 6 — produkty PCR zawierające eksony: 3 (410 pz), 8 (360 pz), 44 (268 pz); tor 7 — marker wielkości — KBL (GIBCO).

wały więcej niż 1 ekson. Bardzo często delecje rozpoczynały się między eksonem 44 a 45 (33%). Tylko w jednym przypadku stwierdzono delecję eksonu 60. Nie wykazano delecji promotora genu dystrofiny. U pacjentów z delecjami najczęściej dochodziło do usunięcia eksonów 45–50 (30%).

Stosując 20 par primerów ustalono dokładne granice delecji dla 25 z 42 przypadków z delecjami (60%). Włączenie do badań dodatkowej pary primerów dla eksonu 46 pozwoliło na określenie miejsca pęknięć nici DNA u 13 chorych z DMD.

W jednej rodzinie zaobserwowano aberracyjny fragment restrykcyjny stosując blotting Southerna i hybrydyzację z sondą cDNA. Aberracyjny prążek występował u chorego dziecka i jednej z jego sióstr. Druga siostra odziedziczyła prawidłowe fragmenty DNA od obydwu rodziców. Wyniki autoradiografii przedstawiono na rycinie 4.

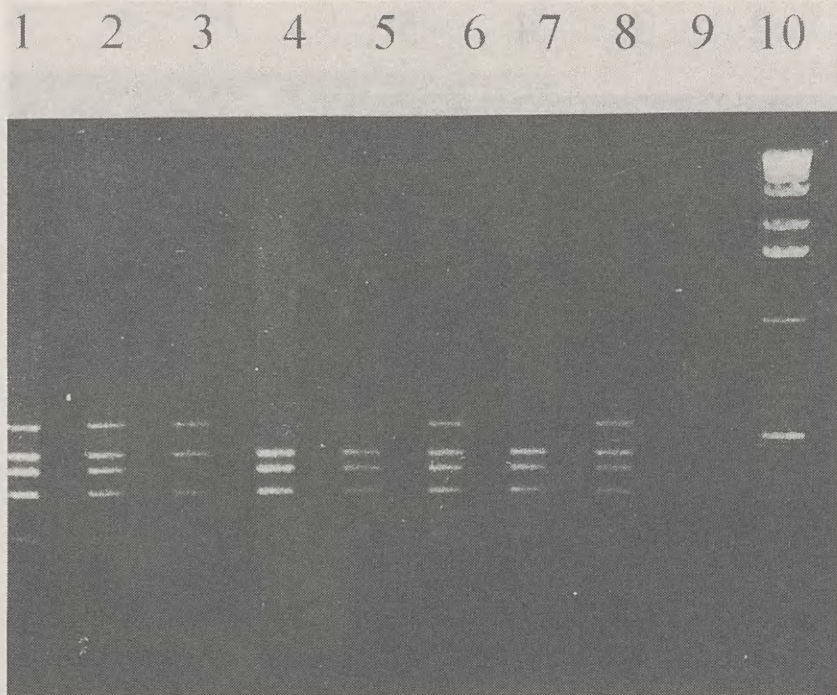


Ryc. 2. Reakcja multiplex PCR dla 17 eksonów w dwóch mieszaninach reakcyjnych.

Reakcję wykonywano w 1993 roku. 1/5 mieszaniny reakcyjnej nakładano na żele zawierające mieszaninę agarozy i hydroksyetylocelulozy (0,8% agaroz, 1% HEC), o wymiarach 10 x 10 cm. Rozdział prowadzono w buforze TBE. Tor 1 — kontrolny DNA; tor 2 — DNA pacjenta 1057; tor 3 — kontrolny DNA; tor 4 — DNA pacjenta 1058; tor 5 — marker wielkości KBL (GIBCO).

W 25 z 42 przypadków z delecjami analiza multiplex PCR pozwoliła na dokładne oznaczenie eksonów, które uległy delecji i jednocześnie określenie powstałych w ten sposób aberracyjnych cDNA. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Poznanie miejsc złamań DNA było przydatne również do określenia nosicielstwa wykonywanego później na podstawie badań RNA, gdyż umożliwiło dobór primerów zarówno do syntezy cDNA, jak i dalszych reakcji PCR. Na dokładne określenie delecji wpłynęło również włączenie do analizy oznaczania eksonu 46.

Z 25 przypadków, dla których oznaczono rozmiar delecji 21 (86%) było zgodne z hipotezą Monaco dotyczącą przesunięcia ramy odczytu w DMD. Z kolei dla 10 przypadków możliwe było poznanie tylko jednego z końców delecji, przy czym te wszystkie przypadki obejmowały określenie 5' końca delecji. W 27 przypadkach



Ryc. 3. Wykrywanie delecji genu *DMD* u pacjentów z dystrofią mięśniową.

Reakcję wykonywano dla 5 eksonów: 45 (547 pz), 19 (459 pz), 17 (416 pz), 8 (360 pz), 44 (268 pz). Nakładano 1/5 produktu PCR i rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym 10 x 10 cm w buforze TBE przy napięciu 70 V. Tor 1 — DNA pacjenta 1001; tor 2 — DNA pacjenta 1002; tor 3 — DNA pacjenta 1005 (delecja eksonu 17); tor 4 — DNA pacjenta 1006 (delecja eksonów 44 i 45); tor 5 — DNA pacjenta 1007 (delecja eksonu 45); tor 6 — DNA pacjenta 1009; tor 7 — DNA pacjenta 1008 (delecja eksonu 45); tor 8 — kontrola pozytywna; tor 9 — kontrola negatywna; tor 10 — marker wielkości KBL (GIBCO).

określono 5' i 3' koniec delecji. Po uwzględnieniu przypadków, dla których poznano obydwa końce delecji lub jeden z końców, pozostało jeszcze 5 przypadków o nie ustalonych miejscach początku i końca delecji.

Analizę transkryptów genu *DMD* wykonano u 8 chorych. Ze względu na ograniczenia materiałowe i na złożoność metod badania były ograniczone dla regionu obejmującego eksony 43–55. Rycina 5 przedstawia analizę transkryptu genu *DMD*, wskazującą na powstanie mutacji *de novo*.

Nosicielstwo nieprawidłowego allelu w grupie rodzin, w których wykazano delecje w genie *DMD* określano stosując reakcję PCR-RFLP. W pierwszym etapie amplifikowano polimorficzny region pERT genu *DMD*, po czym produkty PCR trawiono enzymem restrykcyjnym, rozpoznającym polimorfizm alleli. Produkty PCR z regionu pERT 87-8 trawiono restryktazą TagI, z regionu pERT 87-15 restryktazą XmnI lub BamHI (ryc. 6). Określenie nosicielstwa przeprowadzono dla 7 rodzin. W 5 przypadkach wykazano, że siostry chorych są nosicielkami nieprawidłowego genu. U jednej z analizowanych rodzin (5 osób) wykazano, że obydwie siostry odziedziczyły zmutowany allel. Wielkość analizowanych pro-

Tabela 2

Minimalna wielkość delecji genu *DMD* u pacjentów skierowanych na badania DNA w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

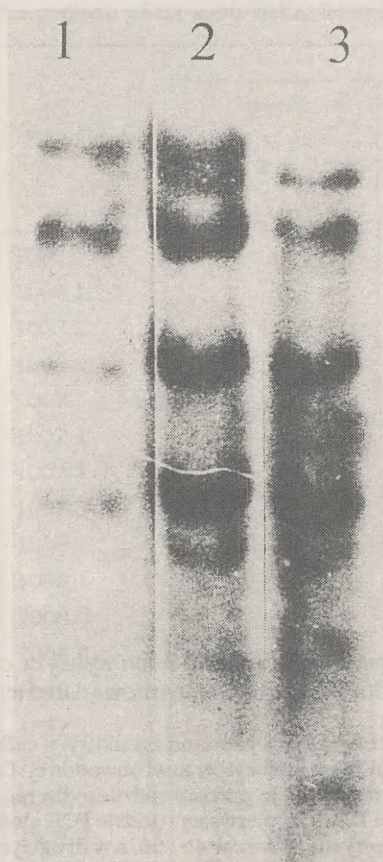
Primery wg Chamberlaina (literary) Primery wg Beggsa (liczby) Rozpoznanie

PCR	1	2	I	3	A	G	4	B	C	5	D	E	11	6	F	7	8	H	9	10
Eksony	P	3	4	6	8	12	13	17	19	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	60
Delecji nie wykryto																				
1001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1002	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1014	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1038	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1041	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1043	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1049	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1051	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1052	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1053	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1056	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1057	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1058	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
Delecja jednego eksonu																				
1023	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1024	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1037	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1005	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1027	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1008	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1018	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	DMD
1054	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	DMD
1048	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	DMD
1026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	DMD

Tabela 2 (ciąg dalszy)

Minimalna wielkość delecji genu *DMD* u pacjentów skierowanych na badania DNA w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

[illegible]



Ryc. 4. Aberracyjny fragment DNA występujący w rodzinie z DMD.

Genomowy DNA pacjenta i dwóch jego siostr trawiono enzymem restrykcyjnym HindIII, rozdzielano elektroforetycznie i hybrydizowano według Southerna z sondą cDNAIII (4–5a). Tor 1 — siostra 1 pacjenta; tor 2 — siostra 2 pacjenta; tor 3 — pacjent z DMD. Z połączonych obliczeń wartości dla kinazy kreatynowej i położenia prążków hybrydyzacyjnych obliczono ryzyko wystąpienia DMD w badanej rodzinie, stosując program statystyczny „Linkage”. Zakładając, że u matki wystąpiła mutacja de novo ryzyko wystąpienia nosicielstwa DMD u siostry 1 wynosi 0,9%, a u siostry 2 — 86%. Zakładając, że ta mutacja jest przypadkiem rodzinnym, dla siostry 1 ryzyko nosicielstwa wynosił 1, a u siostry 2 — 99%.

Tabela 3
Rozkład delecji genu DMD u pacjentów skierowanych na badania DNA w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN

Delecja eksonu	Liczba przypadków
Nie wykryto	20
2	2
4	1
17	1
44	1
45	5
46	1
49	1
50	1
47–48	1
49–50	2
45–47	2
48–50	2
45–48	2
46–49	1
47–50	1
49–52	4
44–48	1
46–50	1
48–52	1
45–50	2
46–51	1
47–52	1
46–52	1
3–19	1
45–52	1
46–60	1
44–52	1



Ryc. 5. Mutacja *de novo* wykryta u pacjenta z dystrofią mięśniową Duchenne'a.

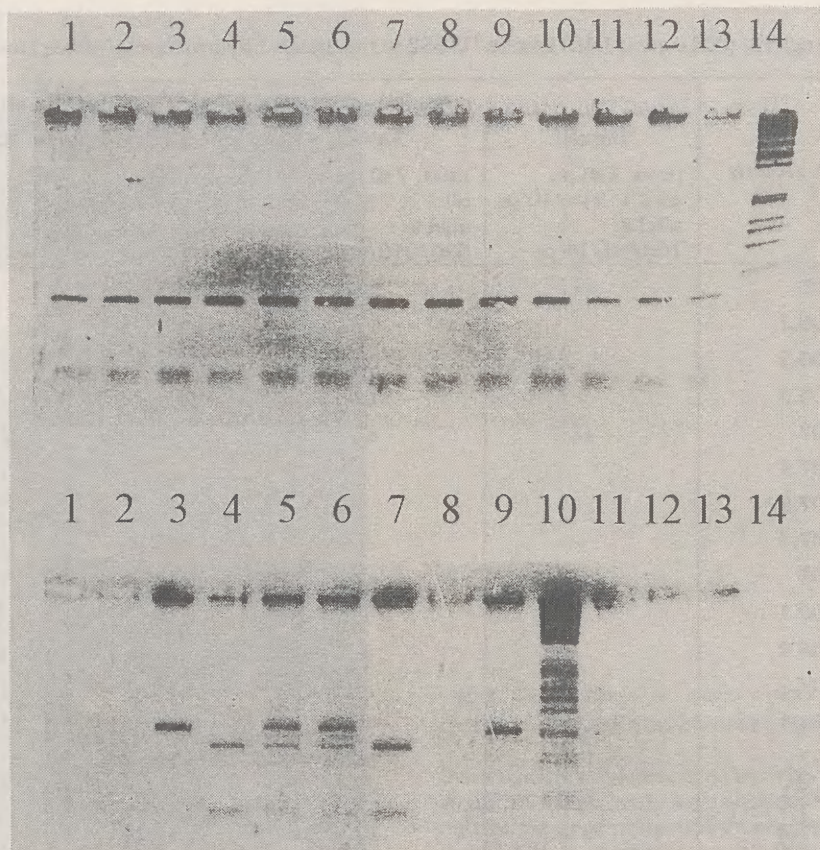
Syntezę cDNA wykonana na matrycy całkowitego mRNA z limfocytów krwi obwodowej. Odwrotną transkrypcję przeprowadzono dla regionu 3' genu DMD. W pierwszej rundzie PCR stosowano primery dla eksonów 43 i 55, a w drugiej rundzie dla eksonów 44 i 51. Prawidłowa wielkość fragmentu transkryptu DNA wynosi 959 zasad. Fragment prawidłowy występował w próbie kontrolnej (tor 2), u matki pacjenta (tor 3) i ojca pacjenta (tor 4). U pacjenta (1028) występował prążek wielkości 562 pz z delecją eksonów 48-50 (tor 5). Tor 1, marker wielkości — KBL (GIBCO).

duktów PCR, wielkość fragmentów uzyskanych po działaniu enzymem restrykcyjnym oraz genotypy badanych osób przedstawiono w tabeli 4. Z tabeli wynika, że najbardziej informatywne było stosowanie polimorfizmu Tag I w regionie pERT 87.-8, dlatego obecnie ustalanie nosicielstwa rozpoczyna się od tego regionu. Na 7 ocenianych rodzin 6 informatywnych wyników uzyskano poprzez analizę regionu pERT 87.-8. Przy ustalaniu nosicielstwa można również korzystać z analizy techniką Southerna. Przykład takiej analizy przedstawiono w części dotyczącej aberracyjnego fragmentu genu DMD. Technika uzupełniająca ustalanie nosicielstwa może być analiza minisatelitarnych regionów chromosomu X. Wyniki analizy locus DXS52 przedstawiono w tabeli 4 i na rycinie 7.

Tabela 4

Analiza regionu pERT genu *DMD* i locus DXS52 w rodzinach z dystrofią mięśniową Duchenne'a

Lp.	Nr rodziny	Analiza pERT			Analiza VNTR
		BamHI prod. 226 pz allel 1: 216/10 pz allel 2: 166/50/10 pz	XmnI prod. 740 pz allel 1: 730/10 pz allel 2: 520/210/10 pz	TagI prod. 155pz allel 1: 145/10pz allel 2: 74/71/10 pz	DXS52 700-3000 pz
1.	1006	n.i.	2	n.i.	
	1006.1		1		
	1006.2		2/2		
	1006.3		1/2		
2.	1007	n.i.	n.i.	2	3
	1007.1			1	1
	1007.2			1/2	2/3
	1007.3			1/2	1/2
3.	1008	n.i.	n.i.	1	1
	1008.1			1	2
	1008.2			1/2	1/3
	1008.3			1/2	1/2
	1008.4			1/2	1/2
4.	1037	1	1	1	
	1037.1	2	2	2	
	1037.2	1/2	1/2	1/2	
	1037.3	1/2	1/2	1/2	
5.	1044	n.d.	n.d.	1	
	1044.1			2	
	1044.2			1/2	
	1044.3			1/2	
	1044.4			2	
6.	1045	n.d.	2	n.d.	
	1045.1		2		
	1045.2		1/2		
	1045.3		1/2		
7.	1055	n.d.	n.d.	2	
	1055.1			2	
	1055.2			1/2	
	1055.3			1/2	
	1055.4			2	

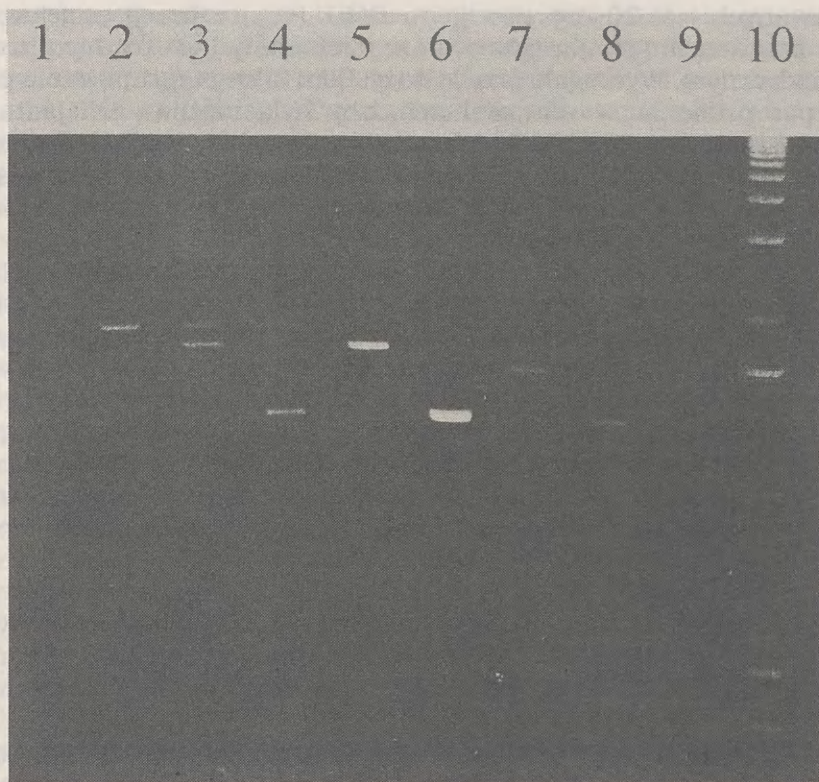


Ryc. 6. Wykrywanie nosicielstwa DMD z wykorzystaniem naturalnego polimorfizmu regionu pERT 87.15-BamHI.

DNA pacjentów i ich rodzin poddano amplifikacji obejmującej fragment regionu pERT genu *DMD*. Warunki reakcji podano w rozdziale *Materiał i metody*. Produkty PCR trawiono restryktazą BamHI i rozdzielano w 6% żelu PAA. Zdjęcie górne — produkt PCR regionu pERT 87.15 o wielkości 216 pz po trawieniu enzymem BamHI. Tor 1–4 — rodzina pacjenta 1006 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tory 5–8 — rodzina pacjenta 1007 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tory 9–13 — rodzina pacjenta 1008 w kolejności: pacjent, ojciec, matka, siostra 1 i siostra 2; tor 14 — marker wielkości — KBL. Zdjęcie dolne — produkt PCR regionu pERT 87.15 o wielkości 216, 166 i 50 pz po trawieniu enzymem BamHI. Tory 3–6 — rodzina pacjenta 1037 w kolejności: pacjent, ojciec, matka i siostra; tor 7 — kontrola (DNA z placenty); tor 8 — kontrola negatywna; tor 9 — kontrola nie trawiona (DNA z placenty); tor 10 — marker wielkości — KBL (GIBCO); tory 1, 2, 11–14 wolne.

DYSKUSJA

Opracowanie reakcji PCR i jej szybkie rozpowszechnienie się w diagnostyce znalazło swoje odbicie przede wszystkim w badaniach genu *DMD*. Wprowadzenie tej reakcji znacznie skróciło czas wykonywania analizy i jednocześnie skłoniło wiele ośrodków do wprowadzenia nowych wersji reakcji PCR opartych o jedno-



Ryc. 7. Wykrywanie nosicielstwa DMD z wykorzystaniem sekwencji minisatelitarnej locus DXS52.

DNA pacjentów i ich rodzin poddano amplifikacji obejmującej region minisatelitarny DXS52. Warunki reakcji podano w rozdziale Materiały i metody. Produkty PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym. Tor 1–4 — rodzina pacjenta 1008 w kolejności: ojciec, pacjent, siostra i matka; tory 5–8 — rodzina pacjenta 1007 w kolejności: ojciec, pacjent, siostra i matka; tor 9 — kontrola negatywna (bez DNA); tor 10 — marker wielkości — KBL (GIBCO).

czesną amplifikację kilku fragmentów genu *DMD*. To nowatorskie podejście metodyczne zaproponował CHAMBERLAIN dla 6 fragmentów genu *DMD* (1988, 1989). Właściwie co rok ukazywały się prace wzbogacające początkową reakcję multiplex-PCR. W 1991 roku BEGGS i współpracownicy donieśli o osiągnięciu prawie 100% wykrywalności delecji poprzez stosowanie 19 par primerów pokrywających region promotora i dwa podstawowe regiony, w których najczęściej występują delecje. W trakcie realizacji pracy stosowano właściwie wszystkie kombinacje primerów, o których donosiło piśmiennictwo. Powodowało to, że dla wielu próbek DNA analiza była wykonywana kilkakrotnie, aż do pełnego przebadania w 19 regionach. Do badań rutynowych włączono również parę primerów dla eksonu 46, co jeszcze zwiększyło wykrywalność delecji i przyczyniło się do poznania składowania mRNA dystrofiny.

Na podstawie własnych obserwacji należy stwierdzić, że w rutynowych badaniach najlepsze wyniki uzyskuje się wykonując 5 reakcji PCR, w których

amplifikowanych jest 20 regionów genu *DMD*. Przy realizacji niniejszej pracy dobranie poszczególnych par primerów w mieszaniny było trudnym rozwiązaniem metodycznym. Wymagało przede wszystkim takiego zgrupowania poszczególnych par primerów w mieszaninach, aby była możliwa ich jednoczesna amplifikacja, jak i rozdział elektroforetyczny zamplifikowanych fragmentów. Wykonano cały szereg badań, w których zmniejszono lub zwiększono stężenie primerów, aby w końcowym efekcie uzyskać równą intensywność produktów PCR. Z doniesień literaturowych wynika, że jest możliwe wykonanie reakcji multiplex dla genu *DMD* w dwóch reakcjach i analiza w żelu poliakryloamidowym. Własne obserwacje wskazują jednak, że tak zestawione mieszaniny nie nadają się do badań rutynowych. Znacznie dogodniejsze jest proponowane w niniejszej pracy wykonywanie trzech reakcji PCR i rozdział produktów w żelach agarozowych. Uzupełnienie elektroforezy o modyfikowane podłoże zawierające agarozę i celulozę dodatkowo zwiększa rozdzielczość i ułatwia interpretację wyników. Na podstawie własnych wyników stosowanie mieszanin agarozowo-celulozowych jest bardzo przydatne, gdyż w wyniku tak prowadzonej elektroforezy zmniejsza się dyfuzja najmniejszych produktów PCR przy jednoczesnym zwiększeniu rozdzielczości.

W niniejszej pracy delecje genu *DMD* zaobserwowano u 55% pacjentów. Wartość ta różni się nieco od danych literaturowych wskazujących na występowanie delecji u 60% pacjentów. Jest jednak zbliżona do wyników uzyskanych we współpracy w Instytucie Genetyki Człowieka w Getyndze. Wyniki tych badań wskazały, że częstość mutacji w populacji niemieckiej wynosiła 60%. Istotną różnicą jest zaobserwowanie w badanej grupie występowania znacznej liczby mutacji w regionie 3' genu. W regionie tym wystąpiło blisko 85% mutacji. Być może jest to wynik zbyt małej liczby pacjentów chociaż grupy pacjentów *DMD/BMD* liczniejsze niż 50 są zaliczane raczej do dużych grup. Najmniejsze delecje obejmowały tylko jeden ekson i występowały głównie w regionie 3' genu *DMD*, natomiast delecje duże przekraczające kilkanaście eksonów występowały w obydwu podatnych na mutacje regionach genu. Dane literaturowe wskazują, że duże delecje mogą obejmować znaczne regiony genu *DMD* przekraczające nawet połowę genu, jednak nie zaobserwowano dotychczas delecji, które obejmowałyby cały gen.

Z badań przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że za pomocą reakcji multiplex PCR obejmującej 20 eksonów można było ustalić dokładne rozmiary delecji w 60% przypadków, w których stwierdzono delecje. Dla 84% przypadków zaobserwowano zgodność z hipotezą Monaco, zakładającą wystąpienie przesunięć ramki odczytu w przypadkach *DMD*. Dotychczasowe doniesienia literaturowe obejmowały analizę 19 eksonów przy czym zakładano, że wykrywalność delecji jest zbliżona prawie do 100%. W niniejszej pracy włączono do badań zaproponowany przez R. Słomskiego zestaw primerów dla eksonu 46. Włączenie do badań eksonu 46 umożliwiło, jak już wspomniano, poznanie delecji dodatkowo w 13 przypadkach, natomiast ta sama analiza przeprowadzona bez eksonu 46 skuteczna byłaby dla 12 przypadków.

Analiza transkryptów genu *DMD* może być wykonana na materiale biopsyjnym lub w limfocytach krwi obwodowej. Materiał biopsyjny nie jest w przypadkach *DMD* ogólnie dostępny i wymagałby wezwania pacjenta i rodziny celem

dokonania biopsji mięśni. W trakcie realizacji niniejszej pracy pojawiły się doniesienia o możliwościach wykorzystania w celach diagnostycznych zjawiska nieuprawnionej transkrypcji. Najważniejszym warunkiem jest przygotowanie preparatów RNA w taki sposób, aby w dalszych etapach badań mogły być stosowane w reakcji odwrotnej transkrypcji i PCR. Wprawdzie metody izolacji RNA są znane już od wielu lat, jednak w połączeniu z syntezą cDNA nie zawsze można było je analizować. W przypadku genu *DMD* zasadniczym czynnikiem ograniczającym jest wielkość transkryptu przekraczająca 14 kb. Wykorzystując wcześniejsze doświadczenia Słomskiego, izolację RNA prowadzono w ten sposób, aby była ona maksymalnie szybka nawet kosztem czystości preparatu. Odbiałczanie preparatu prowadzono więc jednostopniowo. Stosowana metoda izolacji była na tyle skuteczna, że możliwe było wykonanie reakcji PCR dla całego transkryptu. Zapoczątkowanie syntezy cDNA było przeprowadzone z zastosowaniem specyficznych oligomerów. Próby zastosowania oligo-dT jako startera reakcji zakończyły się niepowodzeniem, choć dla innych nieuprawnionych transkryptów osiągnięto pozytywne rezultaty.

W chorobie genetycznej diagnostyka molekularna dotyczy nie tylko poznania defektu genu, lecz również określenia jego nosicielstwa w badanej rodzinie. W początkowym okresie nie wpływały zgłoszenia na określenie nosicielstwa. Od 1992 roku praktycznie wszystkie rodziny, w których wystąpiło rodzeństwo płci żeńskiej, zgłosiły chęć uzyskania informacji o nosicielstwie. W niniejszej pracy zastosowano jedną z rutynowo stosowanych form ustalania nosicielstwa — RFLP-PCR regionu pERT. W 1989 roku ROBERTS i współpracownicy opisali zastosowanie reakcji PCR do ustalania nosicielstwa. W niniejszej pracy wykorzystano to doniesienie do przygotowania primerów i opracowania własnych warunków reakcji. Najbardziej przydatne okazało się badanie regionu pERT-Tag I, które było informatywne dla 6 z 7 analizowanych rodzin. Z doniesień literaturowych wynika, że w wielu przypadkach wykonanie trzech reakcji dla regionu pERT może nie wyjaśnić nosicielstwa i dlatego w dalszym ciągu poszukuje się nowych rozwiązań, które mogą poprawić ustalanie nosicielstwa. Jednym z możliwych badań będzie oznaczanie sekwencji mikrosatelitarnych zlokalizowanych wewnątrz genu *DMD*. Z dotychczasowego stanu wiedzy o sekwencjach mikrosatelitarnych wiadomo, że dotyczą one głównie powtórzeń (CA) $_n$ przy wielkości allelu 100–200 pz. Rozdział alleli różniących się tylko jednym powtórzeniem jest możliwy tylko na żelach sekwencyjnych, co stanowi duże utrudnienie w stosowaniu w rutynowej diagnostyce. Zachodzi również konieczność ustalenia ewentualnych sprzężeń między sekwencjami mikrosatelitarnymi, a kodującymi regionami genu *DMD*. Znacznie łatwiejsza wydaje się analiza sekwencji minisatelitarnych, różniących się powtórzeniem motywu o długości kilkudziesięciu nukleotydów. Dla chromosomu człowieka opisano marker ST14 (DXS52) wykonywany głównie w hemofilii. W badaniu tego markera występowały trudności techniczne zgłaszane przez ośrodki zamierzające stosować go rutynowo. W niniejszej pracy opracowano warunki PCR zapewniające powtarzalność wyników. Wyniki własnych badań wskazują, że trudności w innych laboratoriach polegały na zbyt krótkich czasach poszczególnych etapów PCR opublikowanych przez Richardsa. Własne doświadczenia potwierdzają to i dlatego po kilku nieudanych próbach zastosowano własne parametry reakcji PCR i zaobserwo-

wano, że występuje korelacja między wynikami uzyskanymi dla ustalenia nosicielstwa przez badanie regionu pERT i badanie locus DXS52. W świetle uzyskanych wyników potwierdzających polimorfizm tego locus może on być wykorzystany również w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku potomstwa płci żeńskiej.

Badania genu *DMD* nadal trwają i obejmują coraz szerszą grupę zjawisk. Główne kierunki diagnostyki molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a są już sprecyzowane i w najbliższych latach będą obejmować zarówno bezpośrednie badanie genu, jak i produktu genu. Rutynowa analiza będzie rozpoczynać się od próby wykrycia delekcji w genomowym DNA i oceny ekspresji dystrofiny w mięśniu. Najlepszą metodą wykrycia delekcji jest zastosowana w niniejszej pracy metoda PCR dla 20 eksonów. Ocena ekspresji dystrofiny będzie możliwa dwiema metodami — metodą immunofluorescencji z wykorzystaniem przeciwciał przeciw dystrofynie i biopsji mięśnia oraz metodą western blotting, w której etap detekcji dystrofiny przeciwciałem jest poprzedzony frakcjonowaniem w żelu poliakryloamidowym. Bezpośrednia ocena ekspresji dystrofiny wiąże się jednak z pobraniem materiału biopsyjnego. Sytuację komplikuje również wykrywanie coraz to nowych białek należących do dużego kompleksu glikoprotein, które mogą krzyżowo reagować z przeciwciałami. Duże znaczenie w diagnostyce molekularnej dystrofii mięśniowej ma analiza transkryptów genu, która stała się możliwa po wykryciu nieuprawnionej transkrypcji zachodzącej w limfocytach. Ta analiza może być z powodzeniem stosowana nie tylko do wykrywania delekcji lecz również nosicielstwa. Najbardziej kontrowersyjne są poszukiwania innych mutacji niż delekcje, które muszą występować u około 30% pacjentów. Wykrycie pojedynczej mutacji w tak dużym genie jak *DMD* nie musi oznaczać, że powstanie zdefektowane białko. Dotychczas doniesiono o nielicznych mutacjach punktowych, z których w zasadzie tylko takie, które powodują przedwczesną terminację translacji możnaby zaliczyć do uzasadnionych. Na opisane powyżej zjawiska nakłada się alternatywny splicing genu *DMD*, który może powodować, że niektóre mutacje punktowe lub małe delekcje nie zmieniają fenotypu. Badania genu *DMD* są więc nadal kontynuowane i dostarczają coraz to nowych obserwacji o znaczeniu poznawczym i praktycznym.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF DUCHENNE/BECKER MUSCULAR DYSTROPHY

Summary

The main method for detection of deletions which are responsible for approximately 60% of all mutations of *DMD* gene, is multiplex PCR. Deletions were detected mainly in 3' region of *DMD* gene. The smallest deletions involving only 1 exon were detected in 14 patients. The remaining group of deletions was heterogeneous and some of them involved more than 9 exons. With the use of multiplex PCR for 20 regions of *DMD* gene it was possible to establish the precise size of deletions in 60% of the cases with deletions. Approximately in 84% of the analysed cases the results were in agreement with the hypothesis of Monaco. Analysis of RNA was performed for 9 patients and their family members, and one novel mutation was observed. By analysis of polymorphism of *DMD* gene, mutant allele were detected in 7 families.

LITERATURA

- BECKER P. E., KIENER F. 1955. *Eine neue X-chomosomale Muskeldystrophie*. Arch. Psychiatr. Neurol. 193, 427–448.
- BEGGS A. H., KOENIG M., BOYCE F. M., KUNKEL L. M., 1990. *Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction*. Hum. Genet. 86, 45–48.
- CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., RANIER J. E., NGUYEN P. N., CASKEY C. T., 1988. *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res. 16, 11141–11156.
- CHAMBERLAIN J. S., GIBBS R. A., RANIER J. E., CASKEY C. T., 1989. *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy*. W: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (red. INNIS M., GELFAND D., SNINSKI J., WHITE T.). Academic Press, San Diego, 272–281.
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N., 1987. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal. Biochem. 162, 156–159.
- DARRAS B. T., BLATNER P., HARPER J. F., SPIRO A. J., ALTER S., FRANKE U., 1988. *Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: Location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations*. Am. J. Hum. Genet. 43, 620–629.
- DEN DUNNEN J. T., GROOTSCHOLTEN P. M., BAKKER E., BLONDEN L. A. J., GINJAAR H. B., WAPENAAAR M. C., VON PAASSEN H. M. B., VON BROECKHOVEN C., PEARSON P. L., VAN OMMEN G. J. B., 1989. *Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications*. Am. J. Hum. Genet. 45, 835–847.
- DEN DUNNEN J. T., BAKKER E., KLEIN BRETELIER E. G., PEARSON P. L., VAN OMMEN G. J. B., 1987. *Direct detection of more than 50% of the DMD-mutation by field inversion gels*. Nature 329, 640–642.
- DUCHENNE G. B. A., 1861. W: *De l'électrisation localisée et son application à la pathologie et à la thérapeutique* (red. BAILLIERE), Paris.
- DUCHENNE G. B. A., 1868. *Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*. Arch. Gen. Med. 11.
- EMERY A. E. H., 1987. *Duchenne Muscular Dystrophy*. Oxford Monographs in medical genetics, Oxford University Press, Oxford.
- EMERY A. E. H., 1991. *Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — a world survey*. Neuromuscular Disorders 1, 19–29.
- FORREST S. M., CROSS G. S., THOMAS N. S. T., HARPER P. S., SMITH T. J., READ A. D., MOUNTFORD R. C., 1987. *Effective strategy for prenatal prediction of Duchenne Becker muscular dystrophies*. Lancet 2, 1294–1297.
- GILLARD E. F., CHAMBERLAIN J. S., MURPHY E. G., DUFF C. L., SMITH B., BURGHESE A. H. M., THOMPSON M. W., 1989. *Molecular and phenotypic analysis of patients with deletions within the deletion-rich region of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene*. Am. J. Hum. Genet. 45, 507–520.
- GOWERS W. R., 1879. W: *Pseudo-hypertrophic muscular paralysis - A clinical lecture* (red. CHURCHILL J. I A.).
- HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ J., 1992. *Dystrofie mięśniowe postępujące*. Post. Psychiatr. Neurol. 1, 117–124.
- HOFFMAN E. P., BROWN R. H., KUNKEL L. M., 1987. *Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell 51, 919–928.
- HOFFMAN E. P., FISCHBECK K. H., BROWN R. H., JOHNSON M., MEDORI R., LOIKE J. D., HARRIS J. B., WATERSON R., BROOKE M., SPECHT L., KUPSKY W., CHAMBERLAIN J., CASKEY C. T., SHAPIRO F., KUNKEL L. M., 1988. *Dystrophin characterization in muscle biopsies from Duchenne and Becker muscular dystrophy patients*. N. Engl. J. Med. 318, 1363–1368.
- HOFFMAN E. P., HUDECKI M., ROSENBERG P., POLLINA C. M., KUNKEL L. M., 1988. *Cell and fiber-type distribution of dystrophin*. Neuron 1, 411–420.
- KOENIG M., HOFFMAN E. P., BERTELSON C. J., MONACO A. P., FEENER C., KUNKEL L. M., 1987. *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals*. Cell 50, 509–517.
- KOENIG M., BEGGS A. H., MOYER M., SCHERPF S., HEINRICH K., BETTECKEN T., MENG G., MILLER C. R., LINDLF M., KAARIAINEN H., CHAPPELLE A., KIURU A., SAVONTAUS M. L., GILGENKRANTZ H., RECAN D., CHELLY J., KAPLAN J. C., COVONE A. E., ARCHIDIACONO N., ROMEO G., LIECHTI-GALLATI S., SCHNEIDER V., BRAGA

- S., MOSER H., DARRAS B. T., MURPHY P., FRANCKE U., CHEN J. D., MORGAN G., DENTON M., GREENBERG C. R., WROGEMANN K., BLONDEN L. A. J., VON PAASSEN H. M. B., VON OMMEN G. J. B., KUNKEL L. M., 1989. *The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: Correlation of severity with type of deletion*. Am. J. Hum. Genet. 45, 498-506.
- KOENIG M., MONACO A. P., KUNKEL L. M., 1988. *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. Cell 53, 219-228.
- MILLER S. A., DYKES D. D., POLESKY H. F., 1988. *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Res. 16, 1215.
- MONACO A. P., KUNKEL L. M., 1988. *Cloning of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus*. W: Advances in Human Genetics (red. H. HARRIS, K. HIRSCHORN), vol. 17. New York, Plenum Publishing.
- MONACO A. P., NEVE R. L., COLLETTI-FEENER C., BARTELSON C. J., KURNIT D. M., KUNKEL L. M., 1986. *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene*. Nature 323, 646-650.
- MOSER H. 1984. *Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention*. Hum. Genet. 66, 17-40.
- NIEMANN-SEYDE S., SLOMSKI R., RININSLAND F., ELLERMAYER U., KWIATKOWSKA J., REISS J., 1992. *Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum. Genet. 90, 65-70.
- ROBERTS R. G., COLE C. G., HART K. A., BOBROW M., BENTLEY D. R., 1989. *Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Nucleic Acids Res. 17, 811.
- ROBERTS R. G., BENTLEY D. R., BARBY T. F. M., MANNERS E., BOBROW M., 1990. *Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA*. Lancet 336, 1523-1526.
- SCHLOESSER M., SLOMSKI R., WAGNER M., BERG L. P., KAKKAR V. V., COOPER D. N., REISS J. 1990. *Characterization of pathological dystrophin transcripts from the lymphocytes of a muscular dystrophy carrier*. Mol. Biol. Med. 7, 519-523.
- VAN OMMEN G. J. B., BERTELSEN C., GINJAAR H. B., DEN DUNNEN J. T., BAKKER E., CHELLY J., MATTON M., VAN ESSEN A. J., BARTLEY J., KUNKEL L. M., PEARSON P. L., 1987. *Long range genomic map of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: Isolation and use of J66 (DXS268), a distal intragenic marker*. Genomics 1, 329-336.
- ZAREMBA J., 1992. *Genetyka chorób nerwowo-mięśniowych*. Post. Psychiatr. Neurol. 1, 147-151.

MICHAŁ WITT

*Zakład Genetyki Człowieka PAN
w Poznaniu*

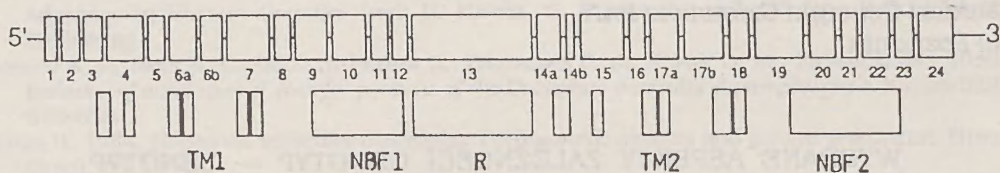
WYBRANE ASPEKTY ZALEŻNOŚCI GENOTYP — FENOTYP W MUKOWISCYDOZIE

WSTĘP

Mukowiscydoza (ang. cystic fibrosis, CF) jest najczęstszą chorobą recesywną autosomalną rasy białej. Jej częstość waha się w dość szerokich granicach, jednak średnio występuje u jednego noworodka na 2500 urodzeń (TSUI 1992). Choroba charakteryzuje się postępującymi zmianami obturacyjnymi drzewa oskrzelowego, z towarzyszącymi licznymi infekcjami oraz ogólnym niedożywieniem, spowodowanym uszkodzeniem funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki i wynikającym stąd upośledzeniem wchłaniania jelitowego, w szczególności tłuszczów (dokładny przegląd genetyki, patofizjologii i kliniki mukowiscydozy patrz: MAZURCZAK i współaut. 1992, SKIBIŃSKA i WITT 1992).

Gen powodujący CF zmapowano do chromosomu 7 w 1985 roku, by w cztery lata później gen ten sklonować i dokładnie scharakteryzować. Nadano mu nazwę *CFTR* (ang. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), która odzwierciedlała lokalizację komórkową i ciągle jeszcze wtedy spekulatywną funkcję jego produktu białkowego. W białku tym wyróżnić można dwa fragmenty transbłonowe (TM1, TM2), zakotwiczone białko w błonie komórkowej, dwa fragmenty wiążące wysokoenergetyczne nukleotydy (NBF1, NBF2), bezpośrednio związane z funkcją *CFTR* jako kanału chlorkowego oraz domenę regulatorową (R), mającą — zgodnie z nazwą — znaczenie regulatorowe (ryc. 1). Najczęstszą mutacją genu *CFTR* jest delecja trójki nukleotydów w eksonie 10, zwana $\Delta F508$, powodująca wypadnięcie fenyloalaniny w pozycji 508 białka *CFTR*. W skali światowej 67% chromosomów CF zawiera tę właśnie mutację (TSUI 1992). Opracowano stosunkowo proste metody molekularnej detekcji $\Delta F508$, nadające się do użycia nawet na masową skalę (WITT i współaut. 1993). Konsekwencją mutacji genu *CFTR* jest zaburzenie transportu jonów chlorkowych w poprzek nabłonków wydzielniczych różnych organów, manifestujące się wzmożoną lepkością odwodnionej wydzieliny drzewa oskrzelowego, zacopowaniem kanalików wyprowadzających trzustki czy zwiększeniem stężenia chlorków w pocie (WELSH i SMITH 1993). W sensie swej prezentacji klinicznej mukowiscydoza jest chorobą bardzo heterogenną. Do tej

pory (maj 1994) zidentyfikowano ponad 400 różnych mutacji genu *CFTR* powodujących CF; ostatnio istnienie mutacji genu *CFTR* wykazano również w kilku innych jednostkach chorobowych. Wszystkie te przyczyny sprawiają, że relacje genotyp — fenotyp w przypadku genu *CFTR* są niezwykle różnorodne i złożone.



Ryc. 1. Wzajemna zależność domen (odcinków funkcjonalnych) białka CFTR i kodujących je fragmentów genu *CFTR*: TM1 i TM2 — domeny transbłonowe; NBF1 i NBF2 — domeny wiążące ATP; R — domena regulatorowa. Cyframi oznaczono eksony genu *CFTR* (według L.-C. Tsui 1992, zmienione).

ZABURZENIA ZE STRONY UKŁADU POKARMOWEGO W CF

Większość chorych na mukowiscydozę charakteryzuje się niewydolnością zewnątrzwydzielniczą trzustki (pancreatic insufficiency, PI), co pociąga za sobą takie typowe objawy tej choroby, jak wydalanie tłuszczów w kale („tłuste stolce”, *steatorrhea*) oraz opóźnienie wzrostu i przyrostu wagi, często znacznego stopnia. Uszkodzenie funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki nierzadko manifestuje się już wewnątrzłonowo, w 5%–10% przypadków CF powodując niedrożność smółkową (*meconium ileus*, MI). Zaledwie u 10%–15% chorych na mukowiscydozę enzymy trzustkowe są produkowane we właściwej ilości i ci pacjenci (pancreatic sufficiency, PS) nie wymagają doustnej suplementacji tychże enzymów, co dla pozostałych 85%–90% chorych CF jest codzienną rutyną, towarzyszącą każdemu posiłkowi.

Stopień wydolności trzustki jest z reguły zgodny pomiędzy rodzeństwem z CF (COREY i współaut. 1989), jak i tym bardziej pomiędzy bliźniętami z CF (SANTIS i współaut. 1992), co jednoznacznie dowodzi bezpośredniego wpływu czynników genetycznych na funkcjonowanie tego organu. Zaraz po odkryciu genu *CFTR* zaobserwowano, że homozygoty $\Delta F508/\Delta F508$ zawsze należą do grupy pacjentów z daleko posuniętą niewydolnością trzustkową (PI), podczas gdy chorzy z jedną tylko kopią $\Delta F508$ i drugą nie znaną mutacją genu *CFTR* lub w ogóle z dwoma nie zidentyfikowanymi mutacjami, mogą być trzustkowo wydolni (PS) (KEREM i współaut. 1989b). Wysłunięto hipotezę, że — nie znane jeszcze wtedy konkretnie — „łagodne mutacje” (allele PS) warunkują zachowanie pewnej rezydualnej czynności zewnątrzwydzielniczej trzustki i są dominujące względem „ciężkich mutacji” (allele PI), które warunkują całkowity zanik wydzielania enzymów

trzustkowych. Hipoteza ta została wkrótce potwierdzona w badaniach innych autorów, prowadzonych na populacjach o znacznie większej różnorodności genotypów prowadzących do podobnych obrazów klinicznych w zakresie wydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki (BORGO i współaut. 1990a).

Obecnie wiadomo, że większość znanych mutacji genu *CFTR* to allele PI; do tej grupy należą wszystkie rodzaje mutacji (delekcje, mutacje nonsensowne, przesunięcia fazy odczytu, mutacje zmiany sensu, mutacje zaburzające splicing) (KRISTIDIS i współaut. 1992). Grupa alleli PS („mutacje łagodne”) jest znacznie mniej liczna i w jej skład wchodzi wyłącznie mutacje zmiany sensu (R117H, P205S, R334W, T338I, R347P, A455E, S549N, G551S, P574H) oraz nieliczne mutacje zaburzające splicing (1898+3A → G, 3849+10 kbC → T) (za HAMOSH i CUTTING 1993). Również lokalizacja mutacji w genie *CFTR* wydaje się podlegać pewnej ogólniejszej zasadzie; allele PI definiowane są na ogół przez mutacje w obrębie domen NBF, podczas gdy „łagodne mutacje”, prowadzące do powstania alleli PS, dotyczą głównie domen TM.

Opisano również przypadki wyłamujące się z opisanej tu reguły. Znani są, na przykład, chorzy na mukowiscydozę homozygotyczni pod względem mutacji $\Delta F508$, u których czynność zewnątrzwydzielnicza trzustki jest zachowana (KOPPELMAN i ROZEN 1990, LANNG i współaut. 1991, HAMOSH i współaut. 1993). Sprzeczne dane dotyczą również wydolności trzustki towarzyszącej paru innym mutacjom, jak na przykład G85E (CHALKEY i HARRIS 1991, GASPARINI i współaut. 1993) czy R117H (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993). Przyczyn tych niejasności może być kilka; pierwszy to niewątpliwie niemożność przeprowadzenia właściwej, precyzyjnej diagnostyki funkcji trzustki u wszystkich pacjentów, ze względu na dość znaczne obciążenia towarzyszące tym procedurom diagnostycznym. Kolejnym czynnikiem jest wiek badanych chorych. Wiadomo, że w miarę rozwoju choroby następuje progresja od stanu pełnej lub częściowo tylko ograniczonej wydolności trzustki do stanu pełnej niewydolności funkcjonalnej tego organu (BORGO i współaut. 1990b, KRISTIDIS i współaut. 1992). Nie można również wykluczyć istnienia genetycznych czynników modyfikujących: postuluje się, że, na przykład, mutacja V1212I, występując w jednym chromosomie z $\Delta F508$, może pełnić rolę czynnika modulującego fenotypowy efekt tej ostatniej (MACEK i współaut. 1993).

Jak już wspomniano, rezultatem niewydolności trzustki zaistniałej wewnątrzłonowo może być niedrożność smółkowa (MI). Zasadniczo dochodzi do niej wyłącznie u noworodków obarczonych allelami PI (KRISTIDIS i współaut. 1992). Wyniki ostatnich badań wskazują, że niedrożność smółkowa pojawia się u chorych z wieloma różnymi genotypami, z wyłączeniem pacjentów o genotypie R117H/ $\Delta F508$. Częstość MI na tle różnych genotypów wygląda różnie i waha się w granicach od 6% (W1282X/ $\Delta F508$) do 24% (G542X/ $\Delta F508$); u homozygot $\Delta F508/\Delta F508$ wynosi 14,5% (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993). Częstość MI u noworodków z tym ostatnim genotypem w badaniach innych autorów kształtuje się na wyższym poziomie: 18% (KRISTIDIS i współaut. 1992) lub 24% (HAMOSH i współaut. 1992).

U starszych pacjentów CF sporadycznie dochodzi do rozwoju wtórnej cukrzycy, jednak nietolerancja glukozy wydaje się zjawiskiem stosunkowo częstym w tej jednostce chorobowej (BOAT i współaut. 1989). Wykazano, że zaburzenie

funkcji wewnątrzwydzielniczej trzustki jest zjawiskiem niezależnym od homo- lub heterozygotyczności $\Delta F508$ (LANNG i współaut. 1991).

ZABURZENIA ZE STRONY UKŁADU ODDECHOWEGO W CF

Zaburzenia układu oddechowego stanowią zasadniczą przyczynę wysokiej śmiertelności w mukowiscydozie. W tym przypadku, w przeciwieństwie do zaburzeń funkcjonalnych trzustki czy poziomu chlorków w pocie (WITT i współaut. 1991), korelacja z odpowiednimi mutacjami genu *CFTR* jest znacznie trudniejsza do wykazania. Dość trudno wystandaryzować tu model badawczy; trudnymi do wyeliminowania są takie zmienne, jak etap rozwoju choroby zależny od wieku oraz wpływ stosowanego leczenia. Najlepszym wykładnikiem zaburzenia funkcji płuc dla celów tego typu badań wydaje się, wyrażone procentowo, zmniejszenie wartości natężonej pojemności wydechowej pierwszosekundowej (przewidywany % FEV₁) w stosunku do wartości odpowiedniej dla danego wieku, płci, wysokości i masy ciała. Wartość ta z reguły jest podobna u rodzeństwa z CF, co wyraźnie wskazuje na komponentę genetyczną wpływającą na jej wielkość (SANTIS i współaut. 1990). Wykazano również zasadniczą zgodność wartości przewidywanego % FEV₁ pomiędzy bliźniętami CF, jedno- i dwujajowymi (SANTIS i współaut. 1992). Wydolność trawienna wydaje się w sposób zasadniczy wpływać na stan układu oddechowego u pacjentów z CF. Wykazano, że u pacjentów z mutacjami PS wydolność układu oddechowego jest lepsza niż u pacjentów PI (KEREM i współaut. 1990). Podobnie, pacjenci z prawidłową absorpcją jelitową tłuszczów charakteryzują się znacząco lepszymi parametrami funkcjonalnymi płuc od pacjentów z jej zaburzeniami (GASKIN i współaut. 1992).

Korelacje funkcji układu oddechowego z poszczególnymi mutacjami genu *CFTR* nie są jednoznaczne; na przykład niektórzy autorzy donoszą o gorszej funkcji płuc u homozygot $\Delta F508$ w stosunku do heterozygot (JOHANSEN i współaut. 1991), podczas gdy inni zależności takiej zaprzeczają (AL-JADER i współaut. 1992). U homozygot $\Delta F508$ wcześniej dochodzi do epizodów obturacji drzewa oskrzelowego (MOHON i współaut. 1993). Co ciekawe, homozygoty oraz złożone heterozygoty z mutacjami nonsensownymi (np. G542X/G542X, R553X/R553X, R1162X/R1162X, S1255X/G542X, W1316X/R553X) charakteryzują się słabiej zaznaczonymi objawami ze strony drzewa oskrzelowego, niż homozygoty $\Delta F508$ (HAMOSH i CUTTING 1993). Kilka mutacji nonsensownych, sklasyfikowanych jako „ciężkie” z punktu widzenia wpływu na czynność trzustki, jest uważanych za „mutacje łagodne” w sensie ich manifestacji płucnej. Przyczyny, dla których mutacje powodujące przedwczesne zakończenie syntezy produktu białkowego powodują silniejsze skutki negatywne w układzie pokarmowym niż w układzie oddechowym, nie są znane. Ekspresja genu *CFTR* w tkance płucnej utrzymuje się na stosunkowo niskim poziomie (BREMER i współaut. 1992) i bardzo niewielka ilość jego prawidłowego transkryptu wystarczy dla utrzymania funkcji *CFTR* na poziomie tkankowym (CHU i współaut. 1992). W komórkach organizmów homozygotycznych pod względem mutacji genu *CFTR* transkrypt taki pojawiać się może, na przykład, w wyniku działania mechanizmu alternatywnego dojrzewania transkryptu (alternative splicing) i procesu tak zwanego omijania eksonów

(exon skipping) (DIETZ i współaut. 1993). Inną możliwością jest istnienie tkanowo-specyficznych mechanizmów komórkowych, powodujących substytucję funkcji białka CFTR podczas jego nieobecności (fizycznej lub funkcjonalnej).

Znanym jest również fakt znacznego zróżnicowania objawów płucnych w grupach chorych o tych samych genotypach (GASPARINI i współaut. 1992, SHOSHANI i współaut. 1992), co wyraźnie sugeruje wpływ innych czynników genetycznych i/lub środowiskowych na ich ekspresję. Przypuścić można, że duża anatomiczna dostępność drzewa oskrzelowego i tkanki płucnej dla czynników środowiskowych, powoduje — większą niż w przypadku trzustki — wrażliwość na ich działanie.

Analizowano również zależność między podatnością układu oddechowego na infekcje bakteryjne a genotypem. Osobnicy homozygotyczni $\Delta F508$ wykazują większą skłonność do przewlekłego zakażenia *Pseudomonas aeruginosa*, niż heterozygoty złożone z $\Delta F508$ (JOHANSEN i współaut. 1991). Stwierdzono również, analogicznie jak dla funkcji płuc, zależność skłonności do kolonizacji przez *Pseudomonas* od stanu funkcjonalnego trzustki; skłonność ta była znamienne niższa u osobników PS w stosunku do osobników PI. Jednocześnie wykazano, że wraz z wiekiem skłonność ta rośnie najszybciej u osobników homozygotycznych pod względem mutacji $\Delta F508$ lub mutacji nonsensownych zlokalizowanych w NBF1 (KUBESH i współaut. 1993). Częstość przypadków kolonizacji pałeczkami *Pseudomonas aeruginosa* waha się w szerokich granicach: od 30% (dla genotypu R117H/ $\Delta F508$) do 82% (dla W1282X/ $\Delta F508$); homozygoty $\Delta F508$ wykazywały kolonizację *Pseudomonas* w 56% badanych przypadków (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993).

INNE ZABURZENIA ZWIĄZANE Z MUTACJAMI GENU CFTR — OBJAWY CF CZY ODDZIELNE JEDNOSTKI CHOROBEWE?

Obustronna agenezja nasieniowodów (congenital bilateral absence of vas deferens, CBAVD) jest jednym z istotnych kryteriów diagnostycznych mukowiscydozy, gdyż występuje u 97% pacjentów CF płci męskiej. Izolowany CBAVD stanowi 1%–2% przypadków niepłodności męskiej (*Editorial*, Lancet 1992). Analiza molekularna przypadków izolowanego CBAVD wykazała, że u 64% chorych występują mutacje genu CFTR (ANGUIANO i współaut. 1992). Niektórzy z badanych pacjentów byli heterozygotami złożonymi, z mutacją $\Delta F508$ w jednym i jedną z kilku innych znanych mutacji genu CFTR w drugim chromosomie pary 7. Do tych ostatnich należą W1282X, R75Q, G551D, R553X, G576A i przede wszystkim R117H (HAMOSH i CUTTING 1993). Wydaje się, że właśnie R117H jest najczęstszą mutacją związaną z CBAVD, występująca aż w 10% przebadanych przypadków (OATES i AMOS 1993). Z tych oraz podobnych badań (HANDELIN i współaut. 1992) wynika, że R117H występuje u heterozygot złożonych reprezentujących trzy zupełnie różne fenotypy: u chorych CF z zachowaną funkcją zewnątrzwydzielniczą trzustki (CF-PS), u chorych z izolowanym CBAVD oraz u osobników zdrowych. Są wysuwane sugestie, że manifestacja fenotypowa jednej i tej samej mutacji zależeć może od kontekstu molekularnego, w jakim ona się pojawia; w przypadku R117H czynnikiem takim może być długość odcinka

polipirymidynowego (5T lub 7T), występującego w kierunku 3' od samej mutacji, który zmieniać może wydajność splicingu eksonu 9 genu *CFTR* (KIESEWETTER i współaut. 1993).

Najczęstszym genotypem związanym z CBAVD jest $\Delta F508/R117H$; prawie wszystkie znane heterozygoty złożone z tą jednostką chorobową mają jedną z tych dwóch mutacji. Aż w 62% badanych przypadków CBAVD udało się zidentyfikować jedną mutację genu *CFTR*, w 14% zidentyfikowano mutacje obu kopii tego genu (HAMOSH i CUTTING 1993). Jak dotąd nie znaleziono ani jednego przypadku CBAVD homozygotycznego pod względem mutacji genu *CFTR* — taki genotyp prawdopodobnie może być związany wyłącznie z CF. Nie wiadomo również, czy izolowany CBAVD zawsze jest związany z mutacjami genu *CFTR*. Ze wszystkich tych danych wynika, że w grupie chorych z CBAVD występuje pewien określony zestaw mutacji genu *CFTR* — ponieważ jednak wszystkie zidentyfikowane tu genotypy występować mogą zarówno w CBAVD, jak i w CF muszą istnieć jeszcze jakieś inne czynniki modyfikujące ekspresję fenotypową tych mutacji. Narzucające się w tym momencie pytanie: czy CBAVD jest samodzielną jednostką chorobową, czy też genitalną formą mukowiscydozy, pozostaje ciągle bez ostatecznej odpowiedzi. Ewentualnym potwierdzeniem drugiej z tych możliwości byłby postępujący z czasem rozwój objawów płucnych i/lub trzustkowych u pacjentów z CBAVD.

Okazuje się, że również w przypadku jednostronnej agenezji nasieniowodu (unilateral absence of vas deferens, UAVD) 43% badanych nie płodnych mężczyzn było heterozygotycznych pod względem $\Delta F508$, R117H lub R75Q, a jeden z nich miał dwóch braci z CBAVD (MICKLE i współaut. 1993). Znane są również dane mówiące o podwyższonej częstości niektórych mutacji genu *CFTR* w niepłodności męskiej, spowodowanej asteno-, oligo- lub teratozoospermia; jeden z przebadanych przypadków azoospermii był heterozygotą złożoną R117H/G551D (VANDER VEN i współaut. 1993). Wynikałoby z tego, że gen *CFTR* również może wpływać na różnicowanie się najądrza oraz na funkcjonowanie nabłonka plemnikotwórczego.

Warto w tym miejscu również wspomnieć kilka pulmonologicznych jednostek chorobowych. Przewlekła obturacyjna choroba płuc (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) jest powodowana przez chroniczne zapalenia oskrzeli lub rozedmę płuc; często elementem współlistniejącym są tu rozstrzenia oskrzeli. Wiadomo, że w patogenezie tego schorzenia udział swój ma gen α -1-antytrypsyny (KUEPPERS 1992). Badania pod kątem występowania mutacji genu *CFTR* u chorych z COPD wykazały, że mamy tu do czynienia z istotnie zwiększoną częstością występowania niektórych ze znanych mutacji: $\Delta F508$, R117H, R1066C, R75Q i kilku innych (GERVAIS i współaut. 1993b; PIGNATTI i współaut. 1993). Prawie wszystkie z tych mutacji są zlokalizowane we fragmentach genu kodujących odcinki transbłonowe białka *CFTR* (domeny TM). Niektóre z tych mutacji stwierdzono również u chorych z łagodną postacią mukowiscydozy oraz z obustronną agenezją nasieniowodów (patrz wyżej). Związek z mutacjami genu *CFTR* (heterozygota złożona $\Delta F508/R347H$, nosiciele $\Delta F508$) wykazano również w przypadku uczuleniowej postaci grzybicy kropidlakowej płuc (allergic broncho-pulmonary aspergillosis, ABPA); zależności takiej nie wykryto natomiast w przewlekłym zapaleniu oskrzeli powodowanym przez pałeczki *Pseudomonas* (chronic *Pseudomonas* bronchitis, CPB) (MILLER i współaut. 1993).

Występowanie polipów nosa należy do stosunkowo częstych objawów mukowiscydozy. Badania pacjentów z izolowaną polipowatością nosa wykazały obecność takich mutacji genu *CFTR*, jak G551D, $\Delta F508$ i R553X, z wyraźną przewagą pierwszej z nich (BURGER i współaut. 1991). U pacjentów z mukowiscydozą polipy nosowe występują w powiązaniu ze wszystkimi badanymi genotypami, zarówno PI jak PS, z częstością wahającą się od 14% (heterozygoty złożone 1717-1G $\rightarrow$ A/ $\Delta F508$) do 40% (W1282X/ $\Delta F508$); jeśli chodzi o homozygoty $\Delta F508$ polipy nosowe występują tu z częstością 16% (*Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium* 1993).

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych powyżej wyrywkowych danych, obraz fenotypów mających związek z genem *CFTR* jawi się jako zestaw różnorodnych manifestacji klinicznych jednej choroby, albo też jako grupa kilku różnych jednostek chorobowych, mających ze sobą pewne wspólne cechy. Pod względem ogólnej ciężkości przebiegu klinicznego poszczególnych form choroby (lub chorób), zauważyć tu można pewne kontinuum: od najcięższych postaci mukowiscydozy z niewydolnością trzustkową i niedrożnością smółkową (CF-PI, CF-MI), przez lżejsze postacie mukowiscydozy (CF-PS), polipowatość nosa, po izolowaną obu- lub jednostronną agenezję nasieniowodów (CBAVD, UAVD) i niepłodności męskie oraz przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (COPD) i uczuleniową grzybicę krocidlakową płuc (ABPA). Nie można wykluczyć, że przynajmniej niektóre z tych chorób związanych z genem *CFTR* są współczesną formą ujawniania się przewagi heterozygot, na którym to mechanizmie najprawdopodobniej jest oparta tak wysoka częstość mukowiscydozy w populacji (HANNSON 1988, ROMEO i współaut. 1989).

SELECTED ASPECTS OF GENOTYPE — PHENOTYPE RELATIONSHIP IN CYSTIC FIBROSIS

Summary

A review of a current knowledge on the relationship of various clinical symptoms of cystic fibrosis (CF) and genotype of CF patients with regard to *CFTR* gene mutations is presented. In the case of pancreatic disease two groups of *CFTR* alleles can be discerned, corresponding to the relative severity of the disease, PI (pancreatic insufficient) and PS (pancreatic sufficient). In pulmonary disease such a relationship can hardly be observed and it is much more difficult to define. Several disorders which can be either treated as separate entities or as CF-related syndromes have been described; their common feature is a dependence on *CFTR* gene mutations: congenital bilateral absence of vas deferens, unilateral absence of vas deferens, chronic obstructive pulmonary disease, allergic broncho-pulmonary aspergillosis, nasal polyposis and azoospermias. The dependence of these disorders on individual *CFTR* mutations is discussed.

LITERATURA

- AL-JADER L. N., MEREDITH A. L., RYLEY H. C., CHEADLE J. P., MAGUIRE S., OWEN G., GOODCHILD M. C., HARPER P. S., 1992. *Severity of chest disease in cystic fibrosis patients in relation to their genotypes*. J. Med. Genet. 29, 883-887.

- ANGUIANO A., OATES R. D., AMOS J. A., DEAN M., GERRARD B., STEWART C., MAHER T.A., WHITE M. B., MILUNSKY A., 1992. *Congenital bilateral absence of the vas deferens — a primarily genital form of cystic fibrosis*. JAMA 267, 1794-1797.
- BOAT T. F., WELSH M. J., BEAUDET A. L., 1989. *Cystic fibrosis*. [W:] The Metabolic Basis of Inherited Diseases, (red. SCRIVER C. L., BEAUDET A. L., SLY W. S., VALLE D.), McGraw-Hill, New York, 2649-2680.
- BORGIO G., MASTELLA G., GASPARINI P., ZORZANELLO A., DORO R., PIGNATTI P. F., 1990a. *Pancreatic function and gene deletion $\Delta F508$ in cystic fibrosis*. J. Med. Genet. 27, 665-669.
- BORGIO G., MASTELLA G., GASPARINI P., PIGNATTI P. F., 1990b. *Genotype analysis and pancreatic function classification in cystic fibrosis*. Lancet 335, 1601.
- BREMER S., HOOF T., WILKE M., BUSCHE R., SHOLTE B., RIORDAN J. R., MAASS G., TÜMMLER B., 1992. *Quantitative expression of multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) and differentially spliced CFTR mRNA transcripts in human epithelia*. Eur. J. Biochem. 206, 137-149.
- BURGER J., MACEK M., STUHRMANN M., 1991. *Genetic influences in the formation of nasal polyps*. Lancet 337, 974.
- CHALKEY G., HARRIS A., 1991. *A cystic fibrosis patient who is homozygous for the G85E mutation has very mild disease*. J. Med. Genet. 28, 875-877.
- CHU C.-S., TRAPNELL B. C., CURRISTIN S. M., CUTTING G. R., CRYSTAL R. G., 1992. *Extensive posttranscriptional deletion of the coding sequences for part of nucleotide-binding fold 1 in respiratory epithelial mRNA transcripts of the CFTR gene is not associated with the clinical manifestations of CF*. J. Clin. Invest. 90, 785-790.
- COREY M., DURIE P., MOORE D., FORSTNER G., LEVISON H., 1989. *Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis*. J. Pediatr. 115, 274-277.
- Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium*, 1993. *Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis*. N. Engl. J. Med. 329, 1308-1313.
- DIETZ H., KENDZIOR R., ELADAH Z., 1993. *Nonsense mutations act in cis to alter splice-site selection: verification in a heterologous expression system*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 675.
- Editorial*, 1992. *Congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis*. Lancet 339, 1328-1329.
- GASKIN K., GURVITZ D., DURIE P., COREY M., LEVISON H., 1992. *Improved respiratory prognosis in patients with cystic fibrosis with normal fat absorption*. J. Pediatr. 100, 857-862.
- GASPARINI P., BORGIO G., MASTELLA G., BONIZATTO A., DOGNINI M., PIGNATTI P. F., 1992. *Nine cystic fibrosis patients homozygous for the CFTR nonsense mutation R1162X have mild or moderate lung disease*. J. Med. Genet. 29, 558-562.
- GASPARINI P., MARIGO C., BISCEGLIA G., NICOLIS E., ZELANTE L., BOMBIERI C., BORGIO G., PIGNATTI P. F., CABRINI G., 1993. *Screening of 62 mutations in a cohort of cystic fibrosis patients from North-Eastern Italy: their incidence and clinical features of defined genotypes*. Hum. Mutat. 2, 389-394.
- GERVAIS R., LAFITTE J.-J., DUMUR V., KESTELOOT M., LALAU G., HOUDRET N., ROUSSEL P., 1993b. *Sweat chloride and delta F508 mutation in chronic bronchitis or bronchiectasis*. Lancet 342, 997.
- HAMOSH A., CUTTING G. R., 1993. *Genotype/phenotype relationships in cystic fibrosis*. [W:] *Current Topics in Cystic Fibrosis*, (red. DODGE J. D., BROOK D. J. H., WIDDICOMPE J.W.) John Wiley & Sons, New York, 69-92.
- HAMOSH A., KING T. M., ROSENSTEIN B. J., COREY M., LEVISON H., DURIE P., TSUI L.-C., MCINTOSH I., KESTON M., BROCK D. J. H., MACEK M. J. R., ZEMKOVA D., KRASNICANOVA H., VAVROVA V., MACEK M. Sr., GOLDER N., SCHWARTZ M. J., SUPER M., WATSON E. K., WILLIAMS C., BUSH A., O'MAHONEY S. M., HUMPHRIES P., DE ARCE M. A., REIS A., BURGER J., STUHRMANN M., SCHMIDTKE J., WULBRAND U., DÖRK T., TÜMMLER B., CUTTING G. R., 1992. *Cystic fibrosis patients bearing both the common missense mutation Gly Asp at codon 551 and the delta F508 mutation are clinically indistinguishable from delta F508 homozygotes, except for decreased risk of meconium ileus*. Am. J. Hum. Genet. 51, 245-250.
- HAMOSH A., MACEK M., NASH E., CURRISTIN S. M., ROSENSTEIN B. J., CUTTING G. R., 1993. *Mutation analysis in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency, pancreatitis, borderline sweat chloride concentrations or isolated congenital bilateral absence of the vas deferens*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 1169.
- HANDELIN B., WITT D., SKOLETSKY J., SHUBER A., 1992. *Unexpected prevalence of R117H and G551D CF mutations in a randomly screened population*. Am. J. Hum. Genet. 51 (suppl. 4), 858.
- HANNON G., 1988. *Cystic fibrosis and chloride secreting diarrhoea*. Nature 333, 711.
- JOHANSEN H. K., NIR M., HOIBY N., KOCH C., SCHWARTZ M., 1991. *Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation*. Lancet 337, 631-634.

- KEREM B. S., ROMMENS J., BUCHANAN J., MARKIEWICZ D., COX T., CHAKRAVARTI A., BUCHWALD M., TSUI L-C., 1989. *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science 245, 1073-1080.
- KEREM E., COREY M., KEREM B. S., ROMMENS J., MARKIEWICZ D., LEVISON H., TSUI L-C., 1990. *The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis — analysis of the most common mutation (delta F508)*. N. Engl. J. Med. 323, 1517-1522.
- KIESEWETTER S., MACEK M., DAVIS C., CURRISTIN S. M., CHU C-S., GRAHAM C., SHRIMPTON A. E., CASHMAN S. M., TSUI L-C., MICKLE J., AMOS J., HIGSMITH W. E., SHUBER A., WITT D. R., CRYSTAL R. G., CUTTING G. R., 1993. *A mutation in CFTR gene produces different phenotypes depending on chromosomal background*. Nature Genetics 5, 274-278.
- KOPELMAN H., ROZEN R., 1990. *Genetic analysis and pancreatic function in cystic fibrosis*. Lancet 335, 1601.
- KRISTIDIS P., BOZON D., COREY M., MARKIEWICZ D., ROMMENS J., TSUI L-C., DURIE P., 1992. *Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis*. Am. J. Hum. Genet. 50, 1178-1184.
- KUBESH P., DÖRK T., WULBRAND U., KALIN N., NEUMANN T., WULF B., GEERLINGS H., WEISSBRODT H., VON DER HARDT, TUMMLER B., 1993. *Genetic determinants of airways colonization with Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. Lancet 341, 189-193.
- KUEPPERS F., 1992. *Chronic obstructive pulmonary disease*. [W:] *The Genetic Basis of Common Diseases* (red. KING R., ROTTER J., MOTULSKY A.). Oxford University Press, Oxford, 222-239.
- LANGG S., SCHWARTZ M., THORSTEINSSON B., KOCH C., 1991. *Endocrine and exocrine pancreatic function and the delta F508 mutation in cystic fibrosis*. Clin. Genet. 40, 345-348.
- MACEK M. JR., VAVROVA V., DAVIS C., HAMOSH A., MACEK M., CUTTING G. R., 1993. *Two delta F508 homozygote siblings with delayed onset of pancreatic insufficiency carry a second cystic fibrosis gene mutation in one allele*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 83.
- MAZURCZAK T., BAL J., NOWAKOWSKA A., 1992. *Mukowiscydoza (Cystic Fibrosis)*. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa. 1992.
- MICKLE J., OATES R., COLIN A., MAHER T. A., MILUNSKY A., AMOS J. A., 1993. *Increased frequency of cystic fibrosis mutations in males with unilateral absence of the vas deferens (UAVD)*. Am. J. Hum. Genet. 53 (Suppl.3), 1204.
- MILLER P., MACEK M. JR., HAMOSH A., WALDEN S., LOURY M. C., CUTTING G. R., 1993. *Identification of CFTR mutations in adult patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis and chronic Pseudomonas bronchitis*. Pediatr. Pulmonol. 15 (suppl. 9), 128.
- MOHON R., WAGENER J., ABMAN S., SELTZER W., ACCURSO F., 1993. *Relationship of genotype to early pulmonary function in infants with cystic fibrosis identified through neonatal screening*. J. Pediatr. 122, 550-555.
- OATES R., AMOS J., 1993. *Congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. A genetic commonality*. World J. Urol. 11, 82-88.
- PIGNATTI P. F., BOMBIERI C., MARIGO C., LUISETTI M., 1993. *Cystic fibrosis gene mutations found in chronic obstructive pulmonary disease patients*. Am. J. Hum. Genet. 53 (suppl. 3), 1213.
- ROMEO G., DEVOTO M., GALIETTA L. J. V., 1989. *Why is the cystic fibrosis gene so frequent?* Hum. Genet. 84, 1-5.
- SANTIS G., OSBORNE L., KNIGHT R., HODSON M., 1990. *Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis*. Lancet 336, 1081-1084.
- SANTIS G., OSBORNE L., KNIGHT R., SMITH M., DAVISON T., HODSON M., 1992. *Genotype-phenotype relationship in cystic fibrosis: results from the study of monozygotic and dizygotic twins with cystic fibrosis*. Pediatr. Pulmonol. 14 (suppl. 8), 239.
- SHOSHANI T., AUGARTEN A., GAZIT E., BASHAN N., YAHAV Y., RIVLIN Y., TAL A., YAAR L., KEREM E., KEREM B-S., 1992. *Association of a nonsense mutation W1282X, the most common mutation in the Ashkenazi Jewish cystic fibrosis patients in Israel, with presentation of severe disease*. Am. J. Hum. Genet. 50, 222-228.
- SKIBIŃSKA A., WITT M., 1992. *Molekularne podstawy mukowiscydozy*. Post. Biol. Kom. 19, 263-273.
- TSUI L-C., 1992. *The spectrum of cystic fibrosis mutations*. Trends Genet. 8, 392-398.
- VAN DER VEN K., RAHMAN A., VAN DER VEN H., HEILMAN S., JEYENDREN R. S., OBER C., 1993. *CFTR mutations in men with impaired sperm function (ISF) and azoospermia without congenital absence of the vas deferens (CBAVD)*. Am. J. Hum. Genet. 51 (suppl. 31), 1246.
- WELSH M., SMITH A., 1993. *Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis*. Cell 73, 1251-1254.

- WITT M., ERICKSON R. P., OBER C., HOWATT W. F., FARBER R., 1991. *Correlation of phenotypic and genetic heterogeneity in cystic fibrosis: variability in sweat electrolyte levels contributes to heterogeneity and is increased with the XV2c/KM19 haplotype*. Am. J. Med. Genet. 39, 137-143.
- WITT M., JARUZELSKA J., KUCZORA I., MATUSZAK R., CICHY W., BORSKI K., 1993. *A simplified method of detection of the mutations predominantly causing cystic fibrosis and phenylketonuria in Polish families*. Clin. Genet. 44, 44-45.

JERZY BAL, DOROTA MACIEJKO

*Instytut Matki i Dziecka**Zakład Genetyki**Kasprzaka 17a, 01-211 Warszawa*

MUKOWISCYDOZA — OD GENU DO TERAPII

WSTĘP

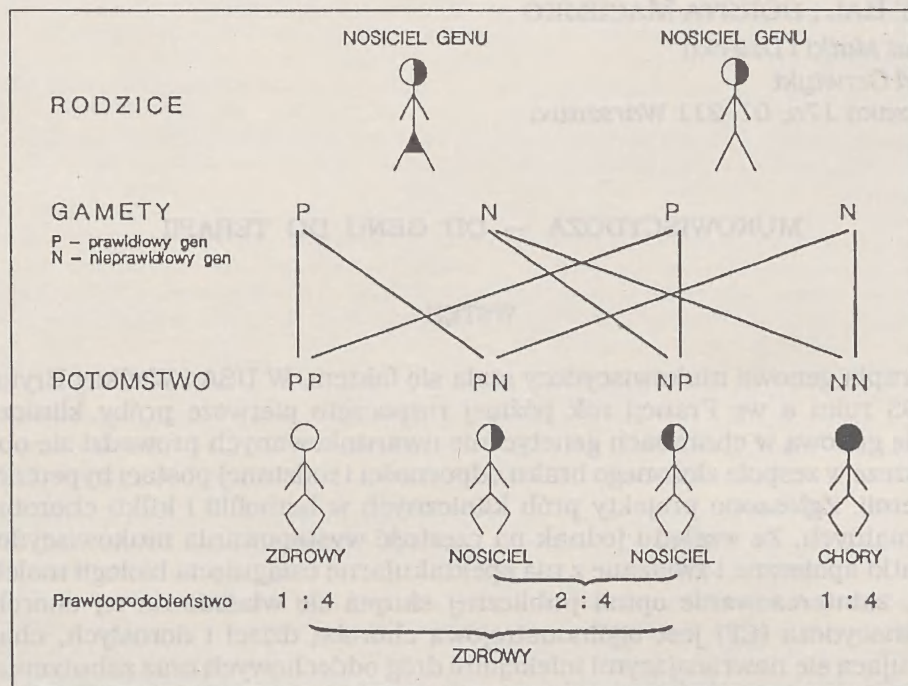
Terapia genowa mukowiscydozy stała się faktem. W USA i Wielkiej Brytanii w 1993 roku a we Francji rok później rozpoczęto pierwsze próby kliniczne. Terapię genową w chorobach genetycznie uwarunkowanych prowadzi się obecnie jeszcze w zespole złożonego braku odporności i rodzinnej postaci hypercholesterolemii. Zgłoszono projekty prób klinicznych w hemofilii i kilku chorobach lizosomalnych. Ze względu jednak na częstość występowania mukowiscydozy, jej skutki społeczne i związane z nią spektakularne osiągnięcia biologii molekularnej, zainteresowanie opinii publicznej skupia się właśnie na tej chorobie. Mukowiscydoza (CF) jest ogólnoustrojową chorobą dzieci i dorosłych, charakteryzującą się nawracającymi infekcjami dróg oddechowych oraz zaburzeniami procesów trawienia. Patologiczne wytwarzanie gęstego śluzu stanowi w przypadku zalegania w drogach oddechowych podłoże dla infekcji bakteryjnych i jest przyczyną blokowania przewodów wyprowadzających gruczoły wydzielania zewnętrznego. Sukcesem opieki medycznej jest obserwowane przedłużenie życia chorych na mukowiscydozę. Staje się ona nie tylko chorobą dzieci, a także dorosłych.

Mukowiscydoza jest chorobą znaną od setek lat. Informacje o chorobie, występowaniu której towarzyszy słony pot — jedna z cech charakterystycznych dla mukowiscydozy, można odnaleźć już w piśmiennictwie epoki średniowiecza. Dopiero jednak lata trzydzieste XX wieku przyniosły dokładniejszy opis choroby, a ostatnie osiągnięcia genetyki stwarzają nadzieję na skuteczną terapię. W Polsce mukowiscydoza bywa opisywana jako torbielowate zwyrodnienie trzustki. W piśmiennictwie anglosaskim jest znana pod nazwą cystic fibrosis.

ZASADY DZIEDZICZENIA

Mukowiscydoza jest chorobą genetycznie uwarunkowaną, dziedziczącą się w sposób klasyczny, zgodnie z prawami Mendla. Za wystąpienie choroby są

odpowiedzialne mutacje w genie *CFTR*, zlokalizowanym w chromosomie siódmym. Mukowiscydoza ujawnia się wyłącznie u tych osób, u których mutacje występują w obu kopiach genu *CFTR*. Osoby z jedną kopią genu o nie zmienionej sekwencji (tak zwaną gen dziki) i jedną kopią genu *CFTR* z mutacją nie wykazują



Rys. 1. Dziedziczenie autosomalne recesywne.

objawów choroby, ponieważ gen dziki dominuje nad genem z mutacją. Osoby o takim genotypie „przenoszą” jedynie zmutowany gen *CFTR*.

Fakt wystąpienia choroby u dziecka określa daną rodzinę jako grupę ryzyka genetycznego, a prawdopodobieństwo urodzenia kolejnego dziecka z mukowiscydozą wynosi 25%. Zarówno ojciec, jak i matka są bowiem nosicielami zmutowanego genu *CFTR*. Na kilkadziesiąt tysięcy przebadanych w świecie rodzin, w których wystąpiła mukowiscydoza tylko raz wykazano, że choroba była spowodowana przez nowo powstałą mutację. We wszystkich pozostałych przypadkach chore dziecko odziedziczyło zmutowane kopie genu *CFTR* od swoich rodziców. Zdarza się jednak (do 1994 roku opisano dwa takie przypadki), że obie kopie zmutowanego genu *CFTR* pochodzą tylko od jednego z rodziców — od matki.

EPIDEMIOLOGIA

Mukowiscydoza jest jedną z najczęstszych chorób monogenowych wśród rasy białej, gdzie występuje z częstością około 1 na 2500 żywych urodzeń. 4%–5% tej

populacji to nosiciele mutacji w genie *CFTR*. W innych populacjach mukowiscydoza jest chorobą rzadko spotykaną. Wśród Murzynów w USA występuje z częstością 1 na 17 tys., a wśród Azjatów spotyka się ją jeszcze rzadziej, bo 1 na 90 tys.

Szacuje się, że w roku 1994 żyje na świecie ponad 50 000 ludzi, głównie dzieci, chorych na mukowiscydozę. W Polsce rodzi się rocznie około 200 dzieci dotkniętych tą chorobą. Około dwóch milionów Polaków, w równym stopniu mężczyzn i kobiet, jest nosicielami zmutowanego genu *CFTR*.

GEN *CFTR* — JEGO FUNKCJA I STRUKTURA

W 1985 roku dość przypadkowo określono w długim ramieniu chromosomu 7 przybliżone położenie genu, którego defekt jest odpowiedzialny za wystąpienie mukowiscydozy. W cztery lata później gen ten — już o nazwie *CFTR* — został dokładnie zbadany i opisany. Poznano częściowo jego strukturę, określono przybliżoną funkcję kodowanego w nim białka, znaleziono mutacje odpowiedzialne za jego nieprawidłowe działanie.

Sklonowaniu genu *CFTR* towarzyszyła bardzo silna konkurencja dwóch ośrodków: amerykańskiego i brytyjskiego. Angolicy zakończyli współzawodnictwo falstartem. Zespoły naukowców kierowane przez Lap-Chi Tsui z Toronto i Francisa Collins z Michigan zostali nie koronowanymi, póki co, zwycięzcami.

FUNKCJA GENU *CFTR*

Gen *CFTR* koduje białko złożone z 1480 aminokwasów o masie cząsteczkowej około 170 kilodaltonów (kD). Angielska nazwa tego polipeptydu (cystic fibrosis transmembrane regulator, CFTR) nawiązuje do funkcji, jaka pierwotnie była mu przypisywana. Obecnie wiadomo, że białko CFTR pełni rolę kanału chlorkowego w komórkach nabłonkowych dróg oddechowych i gruczołów wydzielania zewnętrznego.

W strukturze białka CFTR wyróżnia się szereg charakterystycznych fragmentów, tak zwanych domen. Pozycję centralną zajmuje domena regulacyjna. Po obu stronach znajdują się domeny wewnątrzblonowe i domeny wiążące nukleotydy. Domeny wewnątrzblonowe zakotwiczą białko w strukturze błony komórkowej, a domeny wiążące nukleotydy i domena regulacyjna są odpowiedzialne za otwieranie i zamykanie kanału, przy czym domena regulacyjna działa jak korek zasłaniający wejście do kanału.

STRUKTURA GENU *CFTR*

Gen *CFTR* jest jednym z większych genów człowieka. Liczy około 250 tysięcy nukleotydów. Dwukrotnie przewyższa go swoją wielkością gen *SCA1*, którego defekt jest odpowiedzialny za ataksję rdzeniowo-mózdkową, a prawie dziesięciokrotnie większy jest gen *DMD*, mutacje którego wywołują dystrofię mięśniową typu Duchenne'a i Beckera.

Budowa genu *CFTR* jest podobna do większości genów ludzkich. W sekwencji nukleotydów genu wyodrębnia się tak zwane eksony i introny. W swej strukturze

gen *CFTR* ma 27 eksonów o wielkości zróżnicowanej od 38 do 724 nukleotydów. Wielkości intronów wahają się natomiast od 1,1 tysiąca do 40 tysięcy nukleotydów. mRNA *CFTR* czyli matryca, z której jest produkowane białko (odzwierciedla gen złożony jedynie z eksonów) stanowi jedynie około 2,5 % całego genu *CFTR*.

Warto może w tym miejscu przypomnieć, że za rozszyfrowanie „nieciągłego” sposobu zapisu informacji genetycznej Sharp i Roberts otrzymali w 1994 roku Nagrodę Nobla.

Typ budowy białka *CFTR* (dwie domeny wewnątrz błonowe, dwie domeny wiążące nukleotydy) sugeruje, że sam gen powstał w wyniku podwojenia fragmentu DNA. Świadczyć o tym może również i to, że w przypadku eksonów kodujących domeny wiążące nukleotydy obserwuje się bardzo wysoką zgodność w sekwencji.

MUTACJE I WARIANTY POLIMORFICZNE GENU *CFTR*

Do końca 1994 roku w genie *CFTR* opisano blisko 500 różnych mutacji odpowiedzialnych za modyfikację lub brak jego funkcji. Większość z nich to mutacje punktowe, zmieniające sens zapisu informacji genetycznej. Oznacza to, że w polipeptydzie, w miejscu odpowiadającym wystąpieniu mutacji, jest wbudowany inny niż normalnie aminokwas. Inny typ mutacji punktowych, również często występujący w genie *CFTR*, tak zwane mutacje nonsens, zatrzymują powstawanie pełnego polipeptydu.

Mutacje typu zmiany sensu stanowią około 45% wszystkich znanych mutacji w genie *CFTR*, mutacje nonsens około 18%, małe insercje/delecje (wstawienie/ubytek) około 23%, a mutacje na złączach intron/ekson, w wyniku których błędnie są wycinane introny, około 14%. W genie *CFTR*, w odróżnieniu do wspomnianego wyżej genu *DMD*, wielkie delecje stanowią rzadkość. Największa znana delecja, około 40 tysięcy nukleotydów obejmuje eksony od 11 do 18.

Rozkład mutacji w genie nie jest równomierny. Większość mutacji koncentruje się w eksonach kodujących domeny wiążące nukleotydy i w domenie regulacyjnej.

Oprócz mutacji w genie *CFTR* opisano szereg tak zwanych wariantów polimorficznych. W ten sposób są określane zmiany w sekwencji nukleotydów, których wystąpienie nie pociąga za sobą zmian w sekwencji aminokwasów. Może tak się zdarzyć, gdyż większość aminokwasów wchodzących w skład białek jest kodowanych przez kilka różnych trójek nukleotydów, stanowiących podstawową jednostkę informacji genetycznej. Różne typy zmian polimorficznych są wykrywane również w sekwencjach genu nie kodujących informacji o białku, na przykład w intronach.

MUTACJA $\Delta F508$

Najczęściej występującą mutacją w genie *CFTR* jest trójnukleotydowa delecja w eksonie 10. W wyniku tej mutacji z sekwencji nukleotydów zostaje usunięty kodon CTT, a w konsekwencji i aminokwas fenylalanina w pozycji 508 łańcucha polipeptydowego *CFTR*. Powstający produkt jest krótszy tylko o jeden aminokwas, ale białko nie posiada już zdolności do osiągnięcia w komórce odpowiedniej dla niego lokalizacji.

Mutacja $\Delta F508$ jest odpowiedzialna średnio za około 70% wszystkich mutacji w genie *CFTR*. W częstości jej występowania obserwuje się jednak znaczne różnice geograficzne. Przykładowo częstość występowania delecji $F508$ wśród Turków określono na 30%, a u Duńczyków na blisko 90%. Obserwowany w Europie malejący gradient częstości występowania mutacji $\Delta F508$ z północnego zachodu na południowy wschód stał się podstawą do określenia dróg rozprzestrzenienia się tej mutacji. Uważa się, że mutacja $\Delta F508$ „rozchodziła” się w Europie wraz migracją ludów przybyłych ze wschodu lub z centrum kontynentu.

Badania genu *CFTR* przeprowadzone u Basków, najstarszej powstałej w paleolicie populacji europejskiej wskazują, że mutacja ta istniała już wtedy w tej populacji. Szacuje się, że mutacja $\Delta F508$ powstała nie później niż 53000 lat temu. Takie określenie czasu powstania mutacji jest możliwe na podstawie prześledzenia rodzaju i tempa zmian mutacyjnych i polimorficznych w danej sekwencji nukleotydów w DNA.

Większość z pozostałych blisko 500 mutacji opisanych dla genu *CFTR* to mutacje rzadkie, specyficzne dla danej rodziny. Pewnym wyjątkiem są mutacje, charakterystyczne dla grupy etnicznej populacji, to znaczy występujące w niej z dużo większą częstością niż gdzie indziej. Swoiste mutacje, których częstość występowania przekracza 5%, stwierdzono u Francuzów z Quebecu, Żydów Aszkenazyjskich, czy populacji pochodzenia celtyckiego w Irlandii i Szkocji.

CZĘSTOŚĆ MUTACJI W GENIE *CFTR* W POLSCE

Badania molekularne w kierunku mukowiscydozy w Polsce są prowadzone zasadniczo w dwóch ośrodkach: w Instytucie Matki i Dziecka w Warszawie i w Zakładzie Genetyki Człowieka w Poznaniu. W obu tych ośrodkach rutynowo identyfikuje się najczęściej występujące mutacje w genie *CFTR*. Przeprowadzone do tej pory badania dla ponad 300 chorych na mukowiscydozę wskazują, że obecnie jest możliwa identyfikacja niespełna 70% wszystkich mutacji w tym genie (mutacja $\Delta F508$ jest w Polsce odpowiedzialna za 54% defektów w genie *CFTR*).

GENOTYP A FENOTYP

Zaproponowany ostatnio podział mutacji w genie *CFTR* obejmuje zarówno rodzaj zmiany molekularnej, jak i spodziewane konsekwencje komórkowe. Pierwsza kategoria mutacji to te, które wpływają na produkcję białka. Zalicza się do nich głównie mutacje typu nonsens, w wyniku których obserwuje się całkowity brak białka lub też obecność jedynie fragmentu polipeptydu kodowanego w genie *CFTR*. Kategoria druga, to mutacje zakłócające zdolność do właściwej lokalizacji białka w komórce. Kategoria trzecia to mutacje zmieniające regulację, a kategoria czwarta zmieniające specyficzność kanału chlorkowego.

Spśród opisanych wyżej klas mutacji wydzielono mutacje „silne” i „łagodne”. Mutacje „silne” koncentrują się w eksonach kodujących domeny wiążące nukleotydy i przeważnie zaliczają się do kategorii mutacji decydujących o produkcji białka lub jego właściwej lokalizacji w komórce (na przykład mutacja $\Delta F508$). Towarzyszące im ostre objawy kliniczne ze strony trzustki i dróg oddechowych

decydują o szczególnie ciężkim przebiegu choroby. Grupa mutacji „łagodnych” skupia z reguły mutacje zmieniające specyficzność działania kanału chlorkowego. Towarzyszą im niewielkie zmiany płucne, a choroba z reguły jest wykrywana w późniejszym wieku.

Jak zaznaczono wcześniej, mukowiscydoza jest uwarunkowana wystąpieniem mutacji w obu kopiach genu *CFTR*. Badania prowadzone w ponad 100 ośrodkach w wielu krajach świata umożliwiają obecnie stwierdzenie, że w układzie mutacja „silna”/mutacja „łagodna” efekt tej drugiej jest dominujący.

Na przedstawiony wyżej obraz ekspresji poszczególnych mutacji nakładają się również inne mechanizmy molekularne. Okazuje się bowiem, że nie bez znaczenia jest „tło genetyczne”, na jakim występuje określona mutacja. Poprzez „tło” określa się zmiany polimorficzne występujące w otoczeniu danej mutacji. Podkreśla to złożoność korelacji fenotyp — genotyp.

NIETYPOWE FORMY MUKOWISCYDOZY

Jedną z cech klinicznych, charakterystycznych dla mukowiscydozy, jest bezpłodność mężczyzn. Z pewnym zaskoczeniem przyjęto wyniki badań molekularnych, prowadzonych w klasyfikowanym jako oddzielna jednostka chorobowa, wrodzonym braku nasieniowodów. Okazało się bowiem, że u ponad 60% mężczyzn z tym zespołem stwierdza się występowanie mutacji typu $\Delta F508$, z czego u 1/10 wykryto równocześnie inną mutację (z kategorii „łagodnych”) w drugiej kopii genu *CFTR*.

Występowanie mutacji w genie *CFTR* opisano również dla kilku innych zespołów. Być może jest zasadne klasyfikowanie wszystkich tych zespołów jako mukowiscydozy z różnym stopniem nasilenia określonych objawów klinicznych.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA

Obraz kliniczny decyduje o rozpoznaniu mukowiscydozy. Różne typy testów trzustkowych, ocena zmian płucnych, czy określanie stężenia chlorków w pocie są w dalszym ciągu podstawowymi kryteriami diagnostycznymi. Pamiętać jednak należy, że poszczególne objawy, jak chociażby słony pot towarzyszą i innym schorzeniom, na przykład mukopolisacharydozom, hypotyroidyzmowi czy dysplazji ektodermalnej oraz, że opisano szereg przypadków mukowiscydozy, gdzie stężenie elektrolitów nie odbiegało od normy.

ANALIZA DNA W DIAGNOSTYCE

Szczególne miejsce w rozwoju technik biologii molekularnej, przypada technice łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. polymerase chain reaction, PCR), która swojemu wynalazcy Ch. Mullis'owi przyniosła w 1994 roku Nagrodę Nobla. Dzięki reakcji PCR istnieje możliwość analizy DNA, źródłem którego jest, na przykład, pojedyncza komórka włosa czy fragmenty znumifikowanych tkanek.

Przy identyfikacji mutacji w genie *CFTR* stosuje się różne metody badawcze. We wszystkich tych technikach pierwszym etapem jest jednak zawsze powielenie specyficznego fragmentu DNA w reakcji PCR.

WERYFIKACJA ROZPOZNANIA KLINICZNEGO

Tak jak i w innych chorobach dziedzicznych pełna weryfikacja rozpoznania klinicznego jest możliwa tylko na poziomie molekularnym. W mukowiscydozie taką weryfikację zapewnia identyfikacja mutacji w obu kopiach genu *CFTR*. W populacji polskiej weryfikacja rozpoznania możliwa jest dla około połowy diagnozowanych przypadków. Wynika to ze stosunkowo niskiej, poniżej 70%, częstości wykrywania mutacji w genie *CFTR*.

BADANIE NOSICIELSTWA MUTACJI W GENIE *CFTR*

Oprócz weryfikacji rozpoznania klinicznego analiza DNA umożliwia ustalanie nosicielstwa zmutowanego genu. Pierwszym etapem badania nosicielstwa jest zawsze próba identyfikacji mutacji. W przypadku jednak, gdy nie udaje się zidentyfikować mutacji, jest możliwe tak zwane badanie rodzinne. W analizie tej korzysta się z markerów genetycznych, którymi z reguły są zmiany polimorficzne zlokalizowane blisko lub wewnątrz genu *CFTR*. Metoda zakłada wspólne dziedziczenie (sprzężenie) danego markera z mutacją w genie *CFTR*. Prześledzenie sposobu dziedziczenia się analizowanych markerów zarówno od strony matki, jak i ojca chorego „przekłada” się na sposób dziedziczenia zmutowanego genu, co stwarza możliwość ustalenia nosicielstwa w badanej rodzinie. Ten typ analizy DNA nie weryfikuje rozpoznania klinicznego, ponieważ na nim właśnie bazuje. Analiza sprzężonych z genem markerów może być wykorzystywana również w diagnostyce prenatalnej choroby.

DIAGNOSTYKA PRENATALNA

Do czasu wprowadzenia do diagnostyki mukowiscydozy analizy DNA przeprowadzenie badania prenatalnego było możliwe dopiero w trzecim trymestrze ciąży. Wykorzystywano w nich wykazaną korelację pomiędzy obecnością mukowiscydozy u płodu a obniżeniem poziomu niektórych enzymów jelitowych w płynie owodniowym, uzyskanych drogą amniopunkcji. Po wprowadzeniu technik molekularnych metoda ta, obarczona dość dużym błędem, została prawie całkowicie zaniechana.

Badanie molekularne, zarówno identyfikacja mutacji, jak i analiza markerów polimorficznych, jest możliwe już w pierwszym trymestrze ciąży. Ryzyko poronienia związane z pobraniem materiału jest porównywalne do amniopunkcji i wynosi 1%–2%. Badania prenatalne w mukowiscydozie są wykonywane w Polsce bardzo rzadko. Przykładowo na przestrzeni ostatnich pięciu lat analizę DNA w badaniu prenatalnym wykonano jedynie w 11 przypadkach.

Możliwości jakie dają techniki biologii molekularnej wydają się być nieograniczone. Opisano, na przykład, diagnostykę preimplantacyjną mukowiscydozy, podczas której wykonano identyfikację mutacji $\Delta F508$ analizując DNA wyizolowany z pojedynczej komórki czterokomórkowego ludzkiego zarodka.

LECZENIE

Leczenie mukowiscydozy wymaga działań kompleksowych i jest w dalszym ciągu leczeniem typu objawowego. Do leczenia typu podstawowego należy zaliczyć przede wszystkim stosowanie diety wysokoenergetycznej, zabezpieczającej organizm przed wyniszczeniem. W przypadku niedoboru enzymów trzustkowych podaje się odpowiednie preparaty enzymatyczne, a w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych jest stosowana antybiotykoterapia. Ważne miejsce przypada fizykoterapii, która obejmuje terapię inhalacyjną i drenaż oskrzeli, w czasie którego usuwa się zalegającą w drogach oddechowych wydzielinę. Przeszczep płuc czy też płuco-serca, stosowany w zasadzie wyłącznie w USA w bardzo zaawansowanych przypadkach mukowiscydozy, trudno zaliczyć do metod rutynowych.

NOWE KONCEPCJE TERAPEUTYCZNE

Zasługujące na uwagę nowe koncepcje farmakologiczne koncentrują się przede wszystkim na upłynnianiu śluzu, zalegającego drogi oddechowe chorych na mukowiscydozę. Również na tym polu można mówić o osiągnięciach inżynierii genetycznej. Jednym z głównych składników śluzu jest DNA, pozostałość po leukocytach zaangażowanych w zwalczanie infekcji bakteryjnych. Od niedawna stosowany enzym DNaza, fragmentując DNA nawet do pojedynczych nukleotydów przyczynia się do zmniejszenia lepkości i łatwiejszego wydalania śluzu. Preparat ten podaje się chorym donosowo, w postaci aerozolu. Otrzymuje się go w procesie biotechnologicznym, w którym pierwszym etapem było wyodrębnienie ludzkiego genu. Innym bioproduktem, znajdującym zastosowanie w leczeniu chorych na mukowiscydozę, jest ludzka α_1 -antytrypsyna, zmniejszająca stan zapalny dróg oddechowych. Upłynnianie śluzu osiąga się również na drodze podawania diuretyku, jakim jest amylorid. Blokując pobieranie jonów sodowych przyczynia się on do większego uwodnienia śluzu.

Opisane wyżej nowe sposoby terapii nie przynoszą pełnego powrotu do zdrowia i są niestety bardzo drogie. Przykładowo roczne leczenie preparatem DNAzy, poprawiające usuwanie śluzu z dróg oddechowych, kosztuje ponad 10000 dol. USA. Fakty te dodatkowo zintensyfikowały zainteresowanie i nadzieje, jakie łączy się z terapią genową mukowiscydozy.

SOMATYCZNA TERAPIA GENOWA

Sklonowanie genu *CFTR* stało się sygnałem dla podjęcia prób w kierunku terapii genowej mukowiscydozy. Szybko wykazano, że „sztuczny” gen (dokładniej cDNA genu *CFTR* — czyli sekwencja genu pozbawiona intronów, odpowiadająca jego mRNA) jest zdolny do ekspresji białka CFTR w hodowlach tkankowych oraz, że tylko 6%–8% normalnego poziomu mRNA wystarcza do pełnego zrekompensovania skutków mutacji. Sprzyjającą okolicznością była również możliwość podawania genu bezpośrednio do tkanek nabłonkowych dróg oddechowych, na przykład poprzez inhalację odpowiednio przygotowaną mieszaniną aerozolu.

Opisywana w tym artykule terapia genowa mukowiscydozy jest typem leczenia zachowawczego. „Naprawie” nie ulegają bowiem linie płciowe, będące źródłem komórek rozrodczych. Kobiety (mężczyźni z mukowiscydozą są niepłodni) mogą przekazywać więc zmutowane geny *CFTR* następnemu pokoleniu. Faktyczny efekt wyleczenia mukowiscydozy można by osiągnąć w tak zwanej terapii germinalnej (tj. manipulacji genetycznych w komórkach rozrodczych lub pierwszych stadiach zarodka). W wielu krajach ten typ manipulacji genetycznych jest jednak zabroniony.

Od samego początku eksperymentów z somatyczną terapią genową ukształtowały się dwie koncepcje podawania genu. Francuzi i Amerykanie zaproponowali użycie jako nośnika odpowiednio zmodyfikowanego adenowirusa wykorzystując jego naturalne powinowactwo do komórek nabłonkowych wyściełających drogi oddechowe. Pomysł Brytyjczyków polegał na wykorzystaniu jako nośnika liposomów. Zanim przystąpiono do prób klinicznych, wykonano jednak szereg eksperymentów na zwierzętach.

MODEL ZWIERZĘCY

Niektóre ze znanych u ludzi chorób genetycznych mają swoje naturalne odpowiedniki wśród zwierząt. Tak zwany królik Watanabe to królik z hypocholesterolemią rodzinną (defekt genu kodującego receptor *LDL*). Setter irlandzki z defektem genu kodującego czynnik VIII to model dla hemofilii A.

Mukowiscydoza nie ma swojego naturalnego modelu zwierzęcego, należało go więc skonstruować. Gen *cfr* u myszy sklonowano wkrótce po sklonowaniu genu człowieka. Około 80% sekwencji obu genów okazało się być identyczne, a w niektórych eksonach zgodność przekraczała 90%. Kolejnym etapem w konstrukcji modelu zwierzęcego mukowiscydozy było wprowadzenie mutacji do mysiego genu *cfr*. Doświadczenia tego typu wykonano w kilku różnych laboratoriach. Okazało się, że w zależności od zastosowanej techniki unieczynniania genu, myszy różniły się cechami klinicznymi. Dominującą cechą u myszy z defektem obu kopii genu *cfr* były objawy ze strony przewodu pokarmowego. Objawy płucne, tak niebezpieczne dla życia ludzi, u myszy prawie zupełnie nie występowały. Niemniej stworzony został model zwierzęcy dla eksperymentalnej terapii genowej.

Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że gen *CFTR*, podany drogą inhalacyjną do komórek nabłonkowych ulega pełnej ekspresji oraz że zarówno wirusy, jak i liposomy nie stanowią zagrożenia dla człowieka. Jedynym utrudnieniem, charakterystycznym dla obu nośników była konieczność podawania nowego preparatu genu *CFTR* w odstępach kilkutygodniowych, gdyż był naturalnie eliminowany z organizmu wraz ze złuszcżającym się nabłonkiem.

PRÓBY KLINICZNE

Pierwsze podanie genu *CFTR* osobie chorej na mukowiscydozę miało miejsce w USA w kwietniu 1993 roku. Po uzyskaniu zgody amerykańskiego Narodowego Instytutu Zdrowia (NIH) w zespole R. Crystala wprowadzono w adenowirusie funkcjonalny gen *CFTR* 23-letniemu mężczyźnie z zaawansowaną mukowiscydozą, u którego wykryto dwie mutacje $\Delta F508$. W tym samym roku Brytyjczycy

podali liposomy z genem *CFTR* grupie dziewięciu chorych. Pierwsze próby kliniczne koncentrują się na określeniu dawki genu i bezpieczeństwa terapii. Zarówno w przypadku terapii, gdzie nośnikiem genu *CFTR* jest adenowirus, jak i w przypadku liposomów nie stwierdzono żadnych skutków ubocznych. Wstępne wyniki badań elektrochemicznych wskazują na wzrost przewodnictwa jonów chlorkowych. Brak jest informacji przesądzających o powodzeniu lub też niepowodzeniu tak prowadzonej terapii genowej.

Próby kliniczne z terapią genową w mukowiscydozie prowadzi kilka zespołów amerykańskich, jedna grupa w Wielkiej Brytanii i jedna we Francji (od 1994 r.). Rozwijane są nowe typy nośników wirusowych dla genu *CFTR*. Myśli się jednak i o innych typach leczenia. Jeden z projektów przewiduje podawanie chorym w liposomach nie genu a samego białka *CFTR*.

ZAKOŃCZENIE

Wiedza o podłożu molekularnym mukowiscydozy stała się podstawą do wprowadzania terapii genowej w leczeniu tej choroby. Nie znaczy to jednak, że wszystkie zagadki zostały rozwiązane. Bez odpowiedzi pozostaje na przykład pytanie, jaki czynnik selekcyjny doprowadził do tak wysokiej częstości występowania w populacji ludzkiej mutacji w genie *CFTR*? Najbardziej przekonująca z teorii próbuje łączyć nosicielstwo mutacji w tym genie z odpornością na biegunki wywoływane przez bakterie jelitowe, na przykład niektóre szczepy *Escherichia coli*. Główną przyczyną śmiertelności powodowaną przez biegunki jest odwodnienie organizmu. Nosiciele mutacji, u których wpływ jonów chlorkowych wraz z wodą jest znacznie obniżony, byłiby więc na te biegunki bardziej odporni niż osoby, u których obie kopie genu *CFTR* funkcjonują normalnie. Dlaczego jednak wysoka częstość mutacji w genie *CFTR* jest cechą jedynie populacji białej trudno w dalszym ciągu wyjaśnić.

Dzięki osiągnięciom biologii molekularnej stale powiększa się grupa chorób genetycznie uwarunkowanych, których leczenie staje się możliwe. Również w profilaktyce tych chorób, w której do niedawna jedyną możliwością była rezygnacja z prokreacji, obserwuje się znaczący postęp. Przykładem profilaktyki pierwotnej, to znaczy zapobiegającej wystąpieniu danej wady, jest podawanie kobietom w okresie przedkoncepcyjnym i po zajściu w ciążę wysokich dawek kwasu foliowego. Jak wykazano w około 70% przypadków redukuje to możliwość wystąpienia u płodu wady cewy nerwowej.

Typem działań profilaktycznych są badania przesiewowe umożliwiające identyfikację nosicieli zmutowanego genu. Jak się okazuje, fakt ustalenia nosicielstwa danej mutacji w połączeniu z nowoczesnymi możliwościami diagnostycznymi może przynieść zaskakujący rezultat. Zainicjowane w 1970 roku badania przesiewowe w chorobie Tay-Sachsa i β -talasemii po 20 latach przyniosły 20-krotną redukcję występowania obu chorób w populacjach objętych badaniami.

W mukowiscydozie badania przesiewowe w kierunku nosicielstwa mutacji w genie *CFTR* są w pełni możliwe i opłacalne w populacjach, dla których poziom wykrywalności mutacji jest wysoki. W pozostałych, w tym w Polsce, społeczność

naukowa apeluje o prowadzenie tego typu badań, przynajmniej w rodzinach ryzyka genetycznego.

W wielu krajach rodziny ryzyka genetycznego skupiają się w Towarzystwach Chorych na Mukowiscydozę. Towarzystwa te popularyzują wiedzę o chorobie, metodach jej leczenia i diagnostyki, wydają własne czasopisma i informatory, organizują pomoc socjalną. W krajach zachodnich, szczególnie w USA, Towarzystwo Rodzin CF stanowi niebagatelną grupę nacisku na administrację lokalną i federalną, finansując w znacznym stopniu również badania naukowe. W Polsce, w Rabce od kilku lat działa towarzystwo o podobnym profilu. Działa również Polska Grupa Robocza Mukowiscydozy skupiająca lekarzy różnych specjalności, rehabilitantów i biologów zajmujących się między innymi diagnostyką molekularną tej choroby.

Chcielibyśmy bardzo serdecznie podziękować Panu Docentowi Tadeuszowi Mazureczakowi oraz Kolegom z Zakładu Genetyki Instytutu Matki i Dziecka za cenne uwagi, którymi służyli nam w czasie pisania tego artykułu.

CYSTIC FIBROSIS FROM GENE TO THERAPY

Summary

The aim of this presentation is to summarize the recent knowledge about cystic fibrosis, one of the most common autosomal recessive genetic disorders which occurs in Caucasians. Molecular basis of the disease and diagnostic possibilities are presented. The recent trends in the treatment of cystic fibrosis patients including somatic gene therapy are discussed.

LITERATURA

- BAL J., 1991. *Molekularne podłoże mukowiscydozy*. Postępy Biochemii 37, 153–158.
- SKIBIŃSKA A., WITT M., 1992. *Molekularne podstawy mukowiscydozy*. Postępy Biologii Komórki 19, 263–273.
- MIDRO A. T., KULCZYŃSKI L. L., ŚLEDZIEWSKI A., 1993. *Perspektywy zastosowania terapii genowej w mukowiscydozie*. Post. Hig. Med. Doś. 47, 221–230.
- TYRAKOWSKI T., 1993. *Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR — biochemiczna analiza mukowiscydozy*. Postępy Biochemii 39, 25–32.
- BAL J., 1994. *Mukowiscydoza — podstawy wprowadzenia somatycznej terapii genowej*. Postępy Biochemii 40, 86–90.

JADWIGA JARUZELSKA

Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań,

FENYLOKETONURIA — OD GENOTYPU DO KLINIKI

FENYLOKETONURIA (PKU) — GENETYCZNIE UWARUNKOWANY
BLOK METABOLIZMU

Hydroksylaza fenyloalaniny (PAH 4-monooksygenaza fenyloalaninowa EC 1.14.16.1) katalizuje w wątrobie reakcję hydroksylacji fenyloalaniny do tyrozyny przy udziale tetrahydrobiopteryny jako kofaktora. Obniżona aktywność lub brak aktywności tego enzymu prowadzi do hiperfenyloalaninemii — HPA (wzrostu stężenia fenyloalaniny) oraz ketopochodnych fenyloalaniny we krwi. Wysokie stężenie tych związków jest toksyczne dla mózgu i powoduje w konsekwencji głębokie upośledzenie umysłowe. Ten defekt metabolizmu wraz z towarzyszącymi mu objawami klinicznymi został wykryty w 1934 roku (FOELLING 1934) a w późniejszym czasie dokładniej scharakteryzowany biochemicznie pod nazwą fenyloketonuria (PKU), (JERVIS 1953). PKU jest chorobą o autosomalnym i recesywnym typie dziedziczenia (PENROSE 1935), jedną z najczęstszych genetycznie uwarunkowanych wad metabolizmu w populacjach europejskich (1:10000 urodzeń, w Polsce — 1:5000 urodzeń). Opracowanie i upowszechnienie diety ubogiej w fenyloalaninę znacznie złagodziło kliniczne skutki tego bloku metabolicznego (BICKEL i współaut. 1954). Z kolei, wprowadzenie testu przesiewowego, w którym jest oceniane stężenie fenyloalaniny we krwi noworodków, pozwoliło na bardzo wczesne wykrywanie defektu. Dzięki temu wprowadzenie diety ubogiej w fenyloalaninę jest możliwe w pierwszych dwóch tygodniach życia (GUTHRIE i SUSI 1963).

HETEROGENNOŚĆ KLINICZNA PKU

Bardziej szczegółowe badania dzieci z pozytywnym wynikiem testu Guthrie-go wykazały, iż w rzadkich przypadkach HPA nie jest spowodowana niedoborem PAH lecz uszkodzony jest inny enzym zaangażowany w reakcji hydroksylacji. Jest nim najczęściej reduktaza dwuhydropterydyny regenerująca kofaktor PAH (KAUFMAN i współaut. 1975). Niniejszy przegląd dotyczy wyłącznie niedoborów PAH. Wykazano, że HPA spowodowana niedoborem PAH i opisana wcześniej pod

nazwą PKU stanowi grupę zróżnicowanych klinicznie fenotypów o różnym stopniu tolerancji spożywanej z pokarmem fenyloalaniny. Ze względów praktycznych podzielono dzieci z HPA na trzy grupy. Pierwsza grupa to dzieci z PKU klasyczną (classical PKU), u których poziom fenyloalaniny we krwi przekracza 1200 $\mu\text{mol/L}$, tolerancja fenyloalaniny w wieku 5 lat wynosi 10–20 mg/kg/dzień i aktywność PAH jest poniżej 1% poziomu prawidłowego. Do drugiej grupy zaliczono dzieci z łagodną PKU (mild PKU), u których poziom fenyloalaniny we krwi wynosi 600–1200 $\mu\text{mol/L}$, tolerancja fenyloalaniny w wieku 5 lat wynosi 20–50 mg/kg/dzień i aktywność PAH jest od 1% do 3%. Wreszcie trzecia grupa dzieci z tak zwaną HPA przetrwałą (persistent HPA), u których poziom fenyloalaniny we krwi wynosi 600 $\mu\text{mol/L}$ lub mniej, tolerancja fenyloalaniny 50–100 mg/kg/dzień i aktywność PAH waha się w granicach od 3% do 6%. Niezależnie od sposobu klasyfikacji niedoborów PAH jest bardzo istotna trafna ocena, czy dziecko o pozytywnym wyniku testu Guthrieego wymaga diety dla prawidłowego rozwoju. Dieta uboga w fenyloalaninę jest odpowiednia, jeżeli u dziecka przy zachowaniu prawidłowego wzrostu i rozwoju stężenie fenyloalaniny w surowicy wynosi około 300 $\mu\text{mol/L}$. Osiągnięcie tego celu wymaga stałej kontroli przez lekarza prowadzącego i bardzo częstych analiz stężenia fenyloalaniny we krwi (GUETTLER 1984).

PROBLEMY OPIEKI NAD DZIEĆMI Z PKU I POSZUKIWANIA NOWYCH FORM TERAPII

Wprowadzenie i upowszechnienie testu przesiewowego Guthrieego wyeliminowało najpoważniejszy objaw kliniczny PKU, to znaczy głębokie upośledzenie umysłowe dziecka, jednak problem PKU nie został jeszcze w pełni rozwiązany. Pomimo leczenia dzieci obarczonych PKU od pierwszych tygodni życia, ich iloraz inteligencji IQ nie osiąga normy. Ponadto, obserwuje się u tych dzieci trudności w uczeniu się oraz problemy psychologiczne i emocjonalne w okresie dojrzewania. Dlatego obecnie panuje tendencja aby dietę, przynajmniej w części przypadków, stosować do końca życia. Osiągnięcie precyzji w przestrzeganiu diety jest jednak bardzo obciążające dla chorego dziecka oraz jego rodziców. Wreszcie, istotny problem stanowi tak zwana PKU matczyzna (maternal PKU). Dotyczy kobiet z PKU, które, aby urodziły zdrowe dziecko, powinny przed poczęciem ponownie dietę zastosować. Problemy związane z PKU zależą od populacji, w której występuje. Wskazuje na to między innymi zróżnicowana częstość PKU w populacjach europejskich i pozaeuropejskich. W niektórych krajach odbiega ona znacznie od średniej częstości europejskiej (1 : 10000). Na przykład w Turcji częstość występowania PKU wynosi aż 1 : 2600 urodzeń, natomiast w Szwecji 1 : 30000. W Polsce częstość PKU w ostatnich kilku latach wynosiła 1 : 5000 urodzeń (JARUZELSKA i współaut. 1991). Na obecnym poziomie wiedzy trudno wytłumaczyć tak duże różnice częstości. W Turcji jedną z przyczyn wysokiej częstości PKU jest znaczna liczba małżeństw krewniaczych (KONECKI i LICHTER-KONECKI 1991). Częstości poszczególnych fenotypów HPA są różne w różnych populacjach. Częsty w populacjach zachodniej i środkowo-wschodniej Europy jest trudniejszy w leczeniu fenotyp klasyczny, natomiast na południu Europy

przeważa fenotyp łagodny. Zanim bardziej skuteczna metoda leczenia PKU będzie w zasięgu lekarzy kliniki, ważną rolę będą odgrywały nadal działania prewencyjne. Stąd opracowanie masowych, precyzyjnych i jednoznacznych metod oznaczania nosicielstwa u dzieci posiadających rodzeństwo z PKU oraz oznaczania nosicielstwa w populacji wydaje się mieć ważne znaczenie (LEVY 1989).

OCZEKIWANIA WOBEC BADAŃ GENU PAH

Sklonowanie cDNA PAH otworzyło nowy rozdział w historii badań PKU (Woo i współaut. 1983). PAH jest jednym z pierwszych sklonowanych genów warunkujących chorobę genetyczną człowieka. Opis sklonowania genu, jego struktury oraz zastosowanie markerów RFLPs genu w diagnostyce molekularnej PKU przedstawiono w poprzednich przeglądach (JARUZELSKA 1989, JARUZELSKA i SŁOMSKI 1990). Wobec problemów związanych z opieką nad rodzinami z PKU sklonowanie cDNA PAH stwarzało obiecujące perspektywy. Otwierało ono możliwości analizy sekwencyjnej nieprawidłowych alleli. Szerokie pod względem klinicznym i biochemicznym spektrum fenotypów w niedoborach PAH skłoniło do przypuszczeń, że odzwierciedla ono zróżnicowanie na poziomie molekularnym (SCRIVER i współaut. 1988). Oczekiwano, że analiza genu PAH chorych pozwoli odpowiedzieć na następujące pytania: i. Czy identyfikacja mutacji genu może być podstawą wykrywania nosicielstwa w populacji, to znaczy również u osób nie posiadających rodzeństwa z PKU. ii. Czy istnieje bezpośredni związek pomiędzy mutacją, a obserwowanym fenotypem klinicznym.

Innymi słowy, czy mutacja występująca u chorego determinuje przebieg choroby. Jeżeli tak jest, mutacje genu PAH mogłyby mieć znaczenie w prognozowaniu leczenia oraz służyć jako precyzyjne kryterium klasyfikacji HPA. Oczekiwano również, że analiza mutacji powodujących PKU może przyczynić się do lepszego poznania relacji struktura — funkcja genu. Uzyskanie tego rodzaju danych o charakterze podstawowym byłoby szczególnie ważne w perspektywie przyszłej terapii genowej PKU.

STRATEGIA BADAŃ MUTACJI W GENIE PAH

Sekwencjonowanie genu PAH było z początku bardzo czasochłonne ponieważ zawiera on aż 13 eksonów. Utrudnieniem była również znaczna rozpiętość intronów, z których największy ma długość ponad 23 kz (DiLELLA i współaut. 1986b). Identyfikacja dwóch pierwszych mutacji w genie PAH IVS12nt1 oraz R408W wiązała się z zastosowaniem żmudnej strategii opartej na konstrukcji biblioteki cDNA PAH wątroby pacjenta (DiLELLA i współaut. 1986a, 1987). Następnie poprzez screening za pomocą sondy cDNA PAH izolowano kłony zawierające kodujące sekwencje genu i poddawano je sekwencjonowaniu. Metody wykrywania mutacji od momentu sklonowania cDNA PAH do dnia dzisiejszego ewoluowały w szybkim tempie dzięki opracowaniu klonowania DNA przez zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction PCR)

oraz technik pozwalających na wyselekcjonowanie eksonu zawierającego mutację. Najważniejsze z nich to: badanie konformacyjnego polimorfizmu pojedynczej nici (single strand conformational polymorphism SSCP), metoda chemicznego rozłamywania (chemical cleavage method CCM) oraz elektroforeza w żelu zawierającym gradient czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis DGGE). Ponadto znacznym postępowaniem było zastosowanie analizy ektopowych transkryptów. Amplifikację 13 eksonów wraz z fragmentami sąsiadujących intronów przeprowadza się stosując intronowe primery. Uzyskane 13 produktów reakcji poddaje się selekcji, aby zidentyfikować ekson zawierający mutację. W analizie SSCP podstawą tej selekcji jest fakt, iż zmiana pojedynczego nukleotydu zdenaturowanego DNA modyfikuje ruchliwość elektroforetyczną jednoniciowego DNA w niedenaturujących żelach poliakryloamidowych. Detekcję radioaktywnych produktów w żelu przeprowadza się poprzez autoradiografię (LABRUNE i współaut. 1991). W zmodyfikowanej formie stosowano barwienie srebrem jako metodę detekcji rozdzielonych elektroforetycznie produktów PCR (DOCKHORN-DWORNICZAK i współaut. 1991). Technika CCM polega na chemicznej selekcji zmutowanego eksonu. W pierwszym etapie są generowane heterodupleksy pomiędzy radioaktywnie znakowanym fragmentem genu o prawidłowej sekwencji, a nie znakowanym odpowiadającym mu fragmentem genu pochodzącego od pacjenta. Uzyskany heterodupleks poddaje się chemicznej modyfikacji w dwóch niezależnych reakcjach. Działanie hydroksylaminą powoduje modyfikację cytozyny, jeżeli w przeciwnej nici występuje niekomplementarna zasada. Działanie czterotlenkiem osmu powoduje z kolei modyfikację tyminy w podobnej sytuacji. W ten sposób zmodyfikowane heterodupleksy są poddawane z kolei działaniu piperydiny przecinającej podwójną spiralę w miejscu, w którym występuje zmodyfikowana cytozyna lub tymina. Uzyskane produkty są analizowane elektroforetycznie w sekwencyjnych żelach z zastosowaniem markerów długości (COTTON i współaut. 1988, DIANZANI i współaut. 1991). Najbardziej efektywną techniką selekcji zmutowanych fragmentów genu *PAH* jest DGGE. Fragmenty DNA są poddawane migracji w żelach zawierających ciągły, wzrastający gradient denaturujący. W momencie osiągnięcia przez cząsteczkę DNA pozycji, w której czynnik denaturujący topi helikalną strukturę następuje opóźnienie migracji DNA. Obecność około 40-nukleotydowego fragmentu zawierającego GC (GC-clamp), wprowadzonego do badanego fragmentu DNA poprzez PCR powoduje, iż obydwie nici DNA, pomimo stopienia, pozostają z sobą połączone. Rozróżnienie DNA zawierającego zmianę sekwencji od DNA prawidłowego jest możliwe dzięki powstawaniu w PCR heterodupleksów pomiędzy prawidłową nicią a komplementarną nicią zawierającą mutację. Obecność niekomplementarnych nukleotydów w cząsteczce heterodupleksu obniża jego termostabilność w stosunku do odpowiadającej mu cząsteczki homodupleksu. Ze względu na to, że każda substytucja nukleotydu ma swoisty wpływ na termostabilność fragmentu DNA, charakteryzuje ją szczególny obraz w żelu. Wykrywalność mutacji techniką DGGE wynosi ponad 99% (GULDBERG i współaut. 1993, FODDE i LOSEKOOT 1994). Bardzo ważne w badaniach mutacji w różnych genach jest zjawisko tak zwanej „nieuprawnionej transkrypcji” lub innymi słowy „transkrypcji ektopowej”. Po raz pierwszy opisano je dla genu dystrofiny, ulegającemu specyficznej ekspresji w tkance mięśniowej (CHELLY i współaut. 1988). Stwier-

dzono mianowicie obecność niewielkich ilości transkryptu genu dystrofiny w fibroblastach oraz limfoblastach w ilości 1 cząsteczka mRNA/500–1000 komórek. Obecnie wiadomo, że zjawisko „nieuprawnionej transkrypcji” występuje w przypadku wielu genów o tkankowo specyficznej ekspresji. Przyczyna tego zjawiska nie jest dokładnie poznana. Aktywacja niektórych genów w różnicowaniu komórek jest związana z modyfikacjami struktury chromatyny oraz metylacji DNA. Zjawisko „nieuprawnionej transkrypcji” mogłoby mieć miejsce szczególnie w czasie replikacji DNA. Taka zależność pomiędzy nieuprawnioną transkrypcją a replikacją DNA tłumaczyłaby wyższy poziom nieuprawnionych transkryptów występujących w szybko proliferujących limfoblastach w stosunku do limfocytów lub innych komórek w fazie spoczynkowej (CHELLY i współaut. 1989). „Nieuprawnione transkrypty” PAH wykryto w limfocytach krwi obwodowej a zgodnie z oczekiwaniem znacznie większy ich poziom występuje w limfoblastach uzyskanych przez transformację limfocytów krwi obwodowej wirusem Epsteina-Barra (EBV), (ABADIE i współaut. 1993). Daje to możliwość analizy cDNA PAH pacjentów, którego jedynym źródłem były dotychczas biopsaty wątroby. Analiza cDNA pacjenta jest korzystna z tego względu, iż pozwala na identyfikację mutacji nie tylko w eksonach lecz również w intronach. Mutacje w intronach mogą powodować nieprawidłowości w dojrzewaniu pre-mRNA i mieć drastyczny skutek dla ekspresji PAH. Natomiast w tradycyjnym podejściu polegającym na sekwencjonowaniu klonów genomowych mutacje w intronach mogą być niezauważone. Ponadto analiza transkryptów ektopowych jest szczególnie korzystna w PKU ze względu na liczne eksony PAH. Analiza polega na izolacji całkowitego komórkowego RNA z limfoblastów, odwrotnej transkrypcji oraz amplifikacji za pomocą 4 par primerów pozwalających na syntezę cDNA PAH w 4 nachodzących na siebie fragmentach. Uzyskane produkty PCR są poddawane sekwencjonowaniu (ABADIE i współaut. 1993). W sekwencjonowaniu DNA obserwuje się w ostatnich latach znaczny postęp. Przyczyną jest to, iż jest ono podstawowym narzędziem w projekcie dotyczącym poznania ludzkiego genomu (Human Genome Project). Technika ulega stopniowej automatyzacji. Jedną z jej często stosowanych odmian jest automatyczne sekwencjonowanie z zastosowaniem fluorochromowych znaczników. Znajduje ono szerokie zastosowanie w analizie sekwencji genu PAH.

ZMIENNOŚĆ W GENIE PAH

W 1991 roku w Montrealu powstała grupa koordynująca badania genu PAH (Gene Mutation Analysis Consortium). Dysponuje ona stale uzupełnianą bazą danych na temat mutacji oraz polimorfizmów w genie PAH. W ostatnim wydaniu *Newsletter* z grudnia 1993 rejestr zawierał 140 mutacji oraz 4 substytucje nie zmieniające sekwencji aminokwasów. Delecje należą do rzadkich w genie PAH. Zidentyfikowano 16 delecji: 3 obejmują 1 lub 2 eksony, 13 pozostałych to tak zwane mikrodelecje obejmujące od 1 do 20 nukleotydów. Niektóre mikrodelecje powodują przesunięcie ramy odczytu w genie. Zważywszy rzadkość delecji w tym genie interesujące było wykrycie dwóch częściowo nachodzących na siebie delecji w eksonie 11. Jednak na obecnym etapie badań nie można rozstrzygnąć, czy

jest to „gorące miejsce” mutacji (JARUZELSKA i współaut. 1992). Pozostałe 124 mutacje są substytucjami pojedynczych nukleotydów: 12 występuje w końcach 5' lub 3' intronów powodując zaburzenia w dojrzewaniu mRNA PAH, natomiast reszta — 112 to mutacje zmieniające sekwencje pojedynczych aminokwasów (missense mutations). W genie PAH występują ponadto 3 typy polimorfizmów: i. 8 RFLPs w intronach oraz w regionach oskrzydłających 5' i 3' pozostające w ścisłym sprzężeniu z genem. Profil 8 RFLPs w danym allelu nazywa się haplotypem RFLP (JARUZELSKA 1989). ii. Minisatelitarny region warunkujący RFLP wykrywany przez HindIII. Region ten jest bogaty w pary AT (70%) i stanowi typową sekwencję o różnej liczbie tandemowych powtórzeń (variable number of tandem repeats VNTR) o wielkości 30 pz zlokalizowanych w odległości 3 kz od końcowego eksonu 3' genu. Allele tego VNTR segregują w sposób mendlowski a ponadto niektóre z nich występują w sprzężeniu z określoną mutacją powodującą PKU (GOLTSOV i współaut. 1992). iii. Region zawierający sekwencję składającą się z krótkich powtórzeń tandemowych (short tandem repeats STRs). Motywem powtarzającym się jest w niej sekwencja TCTA. Sekwencja ta występuje w odległości 700 pz od końca 3' eksonu 3. Sekwencja STR jest bardzo użytecznym markerem i posiada 9 alleli dziedziczonych w sposób mendlowski. Ten system sprzężeń STR jest korzystny w populacjach charakteryzujących się obecnością jednego haplotypu w ogromnej przewadze (np. w populacjach orientalnych). System ten w znaczny sposób podnosi liczbę informatywnych analiz w rodzinach z PKU. Pomimo postępu w metodach PCR, stosowanych do analizy innych markerów polimorficznych w genie PAH, względnie prosta analiza pojedynczego systemu STR daje w rezultacie wyższy stopień heterozygotyczności niż jakakolwiek kombinacja innych markerów (GOLTSOV i współaut. 1993). Opisano ponadto 3 polimorfizmy (Q232Q, V245V oraz L385L) występujące w sekwencji kodującej (ekson 6, 7 oraz 11), w miejscach rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Jednak ich użyteczność jako markerów PKU jest ograniczona ze względu na ich niezbyt częste występowanie (mniej niż w 20% rodzin z fenylketonurią), (KALAYDJIEVA i współaut. 1991a).

POWSTAWIANIE I ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ MUTACJI W POPULACJACH

Obecność różnych mutacji w genie PAH wskazuje, że niezależne od siebie zaistniałe mutacje spowodowały PKU w różnych regionach świata. W badaniach populacyjnych PKU oceniano: sprzężenie pomiędzy PKU a haplotypem RFLP, częstości poszczególnych mutacji oraz sprzężenie pomiędzy mutacją a najczęstszym haplotypem RFLP. Stwierdzono, że haplotyp 2 jest szczególnie częsty w nieprawidłowych allelach w Europie Centralnej (JARUZELSKA i współaut. 1991, KALAYDJIEVA i współaut. 1991b), haplotyp 3 w Europie Północnej (DILELLA i współaut. 1986a) oraz haplotyp 6 w Europie Południowej (DWORNICZAK i współaut. 1991). Haplotypy te występują niezwykle rzadko w prawidłowych allelach. W rasie kaukaskiej asocjacja mutacja/haplotyp RFLP jest różna w różnych populacjach. Na przykład, znaczna większość haplotypu 2, 3 i 6 w wyżej wymienionych częściach Europy zawiera odpowiednio mutację: R408W (DILELLA i współaut. 1987, JARUZELSKA i współaut. 1991), IVS12nt1 (DILELLA i współaut.

1986a) i IVS10nt546 (DWORNICZAK i współaut. 1991). Natomiast wszystkie nieprawidłowe allele o haplocyocie 2 u kanadyjczyków francuskiego pochodzenia zawierają mutację M1V (LYONNET i współaut. 1992). Chociaż zaproponowano wiele hipotez, aby wytłumaczyć asocjacje pomiędzy mutacjami a haplotypami wydaje się prawdopodobne, że dana mutacja wystąpiła w danym haplocyocie a następnie poprzez efekt założyciela (founder effect) oraz dryft genetyczny uległa rozprzestrzenieniu w innych regionach. Znaczny wzrost częstości niektórych z tych mutacji może być skutkiem przewagi selekcyjnej heterozygot. Jednak natura przewagi selekcyjnej heterozygot nie jest jasna (EISENSMITH i Woo 1992). Asocjacja pomiędzy mutacją a haplotypem RFLP jest cennym elementem w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, dlaczego częstość PKU jest tak wysoka. Biorąc pod uwagę fakt, że do niedawna osobnicy z PKU nie wydawali potomstwa należało oczekiwać, że częstość PKU powinna była maleć. Takiego zjawiska nie obserwowano być może dlatego, że nowe mutacje występowały na tyle często, iż „zastępowały” mutacje wyeliminowane z populacji poprzez brak potomstwa. Ta interpretacja nie jest w pełni przekonująca, ponieważ w takim przypadku dana mutacja występowałaby na różnych haplocyotach RFLP. Przyczyną utrzymywania się wysokiej częstości PKU mogła być wyżej wymieniona selekcyjna przewaga heterozygot. Sugerowano też, że kobiety będące nosicielkami nieprawidłowego allelu PAH mają niższe ryzyko poronienia płodu od ryzyka w populacji (LEVY 1989).

Próbowano również zrozumieć przyczynę występowania danej mutacji w różnych haplocyotach RFLP. Sugerowano powstanie *de novo* tej samej mutacji (recurrent mutation) na innym haplocyocie niż poprzednio. Prawdopodobieństwo wystąpienia tej samej mutacji *de novo* wzrasta w miejscach genu, w których obecny jest dwunukleotyd CpG ulegający spontanicznej dezaminacji w pozycji 5-metylocytozyny. Jest on zatem „gorącym miejscem” mutacji (mutation „hot spot”). Inną przyczyną występowania tej samej mutacji w różnych haplocyotach RFLP może być crossing-over, poprzez który mutacja, sprzężona z jednym haplocyotem, może zostać przeniesiona na inny. Przyczyną może być również konwersja genu (EISENSMITH i Woo 1991).

MUTACJE A STRUKTURA I FUNKCJA GENU PAH

Gen PAH liczący ponad 90 kz zawiera eksony o długości 57–892 nukleotydów o łącznej długości 2,4 kz oraz bardzo długie introny o długości 558 pz–23,5 kz (DILELLA i współaut. 1986b). Białko kodowane przez ten gen jest homopolimerem składającym się z podjednostek o masie 52 kDa. Porównanie struktury pierwszorzędowej PAH innych gatunków pokrewnych hydroksylaz ssaków oraz innych zwierząt wskazuje na wysoki stopień podobieństwa w regionie białka kodowanym przez eksony 4–11. Najwyższy stopień tego podobieństwa (88,5%) dotyczy eksonów 7–9. Przypuszczalnie ten region jest odpowiedzialny za wspólną funkcję tych białek, to znaczy wiązanie tlenu i kofaktora oraz za katalityczną konwersję substratu (EISENSMITH i Woo 1992). Domena wiązania kofaktora jest kodowana w eksonie 7 (JENNINGS i współaut. 1991). Przypuszcza się, że miejsce odpowiedzialne za specyficzną właściwość tych białek — wiązanie substratu leży poza

tym regionem. Ważność tego centralnego regionu dla funkcji białka znajduje wyraz nie tylko w wysokim stopniu podobieństwa, ale również w wysokiej liczbie zidentyfikowanych w nim mutacji. Znamienne jest, że ponad 20% wszystkich znanych mutacji występuje w eksonie 7, natomiast ponad 70% występuje w regionie obejmującym ekson 5–12 (EISENSMITH i WOO 1992). W promotorze genu nie stwierdzono dotychczas żadnych modyfikacji sekwencji.

EKSPRESJA *IN VITRO* GENU PAH

Ekspresja alleli PAH pacjentów przez transfekcję do komórek w hodowli jest bardzo ważnym elementem w zrozumieniu patologii PKU na poziomie molekularnym. Ten system ekspresji PAH jest ważnym narzędziem pozwalającym udowodnić, że zmiana w sekwencji genu, którą zidentyfikowano jest rzeczywiście odpowiedzialna za obserwowany fenotyp kliniczny. Zastosowanie tego narzędzia jest szczególnie ważne w przypadku mutacji punktowych, powodujących substitucje aminokwasów (missense mutations). Nie mają one bowiem ewidentnego negatywnego wpływu na aktywność enzymu. Ponadto większość mutacji występuje u chorych w stanie heterozygotycznym (compound heterozygotes). Badanie ekspresji *in vitro* pozwala ocenić wpływ każdej mutacji z osobna na obserwowany fenotyp kliniczny a zatem ustalić korelację genotyp — fenotyp, jak również zrozumieć relację struktura — funkcja genu. Ogólny schemat badania ekspresji zmutowanych alleli *in vitro* polega na klonowaniu prawidłowego cDNA PAH (phPAH247) w wektorze transfekcyjnym, posiadającym silny promotor. Poprzez ukierunkowaną mutagenezę wprowadza się do cDNA PAH sklonowanego w wektorze transfekcyjnym, mutację, którą uprzednio zidentyfikowano u chorego na PKU. W ten sposób uzyskaną konstrukcją transfekowane są komórki w hodowli. Jednocześnie przeprowadza się kotransfekcję z wektorem zawierającym gen reporter, na przykład gen lucyferazy lub gen kodujący CAT (acetylotransferazę chloramfenikolu) pozwalające ocenić wydajność wnikania DNA do komórek. Po odpowiednim czasie inkubacji (około 2 dni), transfekowane komórki są poddawane lizie a w uzyskanym lizacie ocenia się właściwości białka kodowanego przez zmutowany allel i porównuje z odpowiednią kontrolą. Aktywność PAH, syntetyzowaną na podstawie nieprawidłowego allelu, przedstawia się jako % aktywności białka syntetyzowanego na podstawie prawidłowego allelu. Stosowanymi do transfekcji komórkami gospodarza są komórki *E. coli* (LEDLEY i współaut. 1987) ale znacznie częściej komórki COS (nerki małpy), (OKANO i współaut. 1991) lub linia ludzkich komórek SW613 (raka jelita grubego), (CAILLAUD i współaut. 1991). Badania ekspresji *in vitro* wykazały, że większość mutacji powodujących substitucję aminokwasów prowadzi do tworzenia niestabilnego białka, którego aktywność jest w różnym stopniu obniżona. Większość badanych dotychczas mutacji nonsensownych oraz mutacji powodujących zaburzenia w splicingu prowadzi do klasycznego fenotypu, w którym hydroksylacja fenyloalaniny jest bliska zeru.

BADANIA KORELACJI GENOTYP — FENOTYP I WYKORZYSTANIE DANYCH MOLEKULARNYCH W MEDYCYNIE

Do stwierdzenia korelacji genotypu (mutacji) z fenotypem PKU są potrzebne trzy rodzaje danych. Pierwszy z nich dotyczy fenotypu: stężenie fenyloalaniny we krwi po urodzeniu przed podjęciem diety, stopień tolerancji fenyloalaniny, wyniki badań stężenia fenyloalaniny we krwi po wykonaniu testu obciążenia białkiem oraz aktywność PAH, jeżeli wykonana została biopsja wątroby. Drugi z nich to mutacje w obydwu allelach chorego, natomiast trzeci dotyczy ekspresji *in vitro* wskazującej na stopień niedoboru PAH dla każdej mutacji z osobna. Badania Okano wskazują, że wyniki aktywności PAH *in vitro* są wyższe w stosunku do wyników uzyskanych w biopsjach wątroby. Pomimo tego analiza aktywności alleli PAH hodowanych komórek jest bardzo cenna w badaniach genotyp — fenotyp (OKANO i współaut. 1991). Przeprowadzono dotąd analizę korelacji genotyp — fenotyp dla ponad 20 mutacji punktowych powodujących substytucje aminokwasów w białku. Stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy genotypem a stężeniem fenyloalaniny występującym u dziecka przed podjęciem leczenia, tolerancją fenyloalaniny oraz stężeniem fenyloalaniny w surowicy po wykonaniu obciążenia białkiem. Na przykład, mutacje IVS12nt1, R408W oraz IVS10nt546 w postaci homozygotycznej powodują fenotyp klasyczny, wymagający bardzo ścisłej diety, ubogiej w fenyloalaninę. W przeciwieństwie do nich mutacje Y414C oraz R261Q w postaci homozygotycznej dają fenotyp bardzo łagodny — przetrwała HPA, nie wymagająca diety. Jednak, jak już wyżej wspomniano, większość chorych na PKU w różnych populacjach to tak zwane złożone heterozygoty (compound heterozygotes). W tych wypadkach określano aktywność PAH *in vivo* poprzez obliczenie średniej aktywności *in vitro* produktów dwóch z nieprawidłowych alleli, z których każdy zawierał inną mutację. Stwierdzono korelację pomiędzy oznaczonymi średnimi aktywnościami a aktywnością PAH mierzoną *in vivo* (OKANO i współaut. 1991). Uzyskane wyniki potwierdziły hipotezę, w myśl której różnorodność fenotypowa w niedoborach PAH odzwierciedla różnorodność defektu w genie. Korelacja pomiędzy genotypem a fenotypem nie jest zamkniętym działem badań i jest kontynuowana w badaniach innych mutacji. Uzyskane dotychczas wyniki są wykorzystane do bardziej precyzyjnego diagnozowania fenotypu HPA oraz są pomocne w prognozowaniu leczenia. Ponadto mutacje w genie PAH mogą być wykorzystane jako podstawa klasyfikacji tak bardzo różnorodnych klinicznie niedoborów PAH.

Dane uzyskane z badań molekularnych PKU są związane z korzyściami klinicznymi, jak również są korzystne dla diagnostyki. Chodzi tutaj głównie o możliwości molekularnego testowania nosicielstwa w rodzinach obarczonych PKU oraz w populacji. Średnia częstość nosicielstwa w populacjach europejskich wynosi 1 : 50. Po sklonowaniu genu molekularne oznaczanie nosicielstwa było możliwe jedynie poprzez analizę RFLP. Później analiza sprzężeń została wzbogacona przez analizę sekwencji VNTR w regionie flankującym 3' genu oraz intro nowej sekwencji STR w pobliżu końca 3' eksonu 3. Jednym z celów analizy mutacji w genie PAH było opracowanie strategii oznaczania nosicielstwa

w populacji, to znaczy u każdego osobnika niezależnie od tego, czy posiada rodzeństwo z PKU. Oznaczanie nosicielstwa polegałoby w tym przypadku na testowaniu określonej mutacji lub ich zbioru. Cel ten nie został osiągnięty głównie dlatego, iż mutacji w genie *PAH* jest bardzo wiele (140) i testowanie tak dużej ich liczby jest niewykonalne. Określanie nosicielstwa przez testowanie mutacji ma więc zasięg ograniczony z wyjątkiem populacji, w których określona mutacja występuje szczególnie często. Dotyczy to mutacji IVS12nt1 w północnej Europie, IVS10nt546 w południowej Europie oraz mutacji R408W w Europie Wschodniej. W Polsce ta ostatnia mutacja występuje w ponad 60% nieprawidłowych alleli i stąd jej wartość diagnostyczna jest znaczna (JARUZELSKA i współaut. 1993).

Istnieje wiele metod oznaczania nosicielstwa poprzez testowanie znanej mutacji. Większość z nich polega na analizie zamplifikowanego, za pomocą PCR, fragmentu genu. Dalsze etapy to hybrydyzacja z oligonukleotydowymi sondami ASO (allele specific oligonucleotide — oligonukleotyd specyficzny do allelu), (DILELLA i współaut. 1986a), trawienie enzymem restrykcyjnym w przypadku, gdy mutacja występuje w specyficznym dla niego miejscu rozpoznania. Jeśli w miejscu wystąpienia mutacji brak miejsca restrykcyjnego można je kreować stosując technikę ACRS (amplification created restriction site — miejsce restrykcyjne kreowane przez amplifikację) a produkt PCR poddaje się trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym (EIKEN i współaut. 1991). Stosuje się również technikę ASA (allele-specific amplification — amplifikacja specyficzna dla allelu), w której obecność lub brak produktu PCR po amplifikacji przy użyciu primera specyficznego do allelu zawierającego określoną mutację oraz primera specyficznego dla sekwencji prawidłowej może być uwidocznione w żelu agarozowym (DVORAKOWA i FAJKUSOWA 1993). Znacznym ułatwieniem w molekularnym testowaniu mutacji jest analiza DNA uzyskanego z wysuszonej kropli krwi na bibule przesyłanej pocztą. Może być ona przechowywana w suchym miejscu przez wiele miesięcy. Wykorzystuje się do tego celu materiał wysyłany w tej postaci do ośrodków screeningu PKU w celu wykonania rutynowych oznaczeń fenyloalaniny (WITT i współaut. 1993).

UWAGI KOŃCOWE

Pomimo znacznego postępu w badaniu molekularnych podstaw PKU ostateczny cel tych badań, jakim jest opracowanie alternatywnej formy terapii, widać w dość odległej perspektywie. Na czym ta terapia będzie polegała nie do końca jest jasne. Badania zmierzające do osiągnięcia tego celu postępują dwutorowo: jest opracowywana terapia genowa PKU oraz są prowadzone badania mające na celu lepsze poznanie patogenezы upośledzenia umysłowego spowodowanego tym blokiem. Otrzymanie przed kilku laty poprzez chemiczną mutagenezę myszy z PKU pozwoliło uzyskać niezbędny dla obydwu kierunków badań model zwierzęcy. Stąd dalszy rozwój badań wygląda optymistycznie. Przedstawione w niniejszym przeglądzie dane są przykładem, jak dalece postęp metodyczny w analizie DNA, jaki dokonał się w ostatniej dekadzie, umożliwił poznanie molekularnego mechanizmu choroby genetycznej i jak dalece wiedza na ten

temat zbliżyła genetykę do medycyny. Dlatego znaczenie molekularnych badań fenyloketonurii polega również na tym, iż stanowią one model dla innych chorób genetycznych.

PHENYLKETONURIA — FROM GENOTYPE TO THE CLINIC

Summary

Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disorder that results from a deficiency of the hepatic enzyme phenylalanine hydroxylase (PAH). The various degrees of mental impairment that occur in patients with PKU can be reduced by rigorous implementation of a diet low in phenylalanine. With the introduction of neonatal screening, a spectrum of clinical and biochemical phenotypes has been found among patients, suggesting that the phenotypic heterogeneity of this disorder may reflect an underlying heterogeneity at the molecular level. An application of the tools of molecular biology led to the cloning of the PAH cDNA, and caused a profound increase in our current understanding of the pathogenesis of this disease and resulted in wide clinical applications. With the discovery of RFLP sites in the PAH locus, the molecular carrier testing using these markers became accessible. Furthermore, since with the use of polymerase chain reaction methodologies, many molecular lesions (140 so far) were identified, the PAH genotype of many affected individuals can be determined in some populations. This, combined with the biochemical characterization of mutant PAH proteins by *in vitro* expression analysis, can potentially refine carrier screening in families where RFLP analysis is not informative, and help to define the relationship between PAH genotype and the disease phenotype. So far, such studies have confirmed previous hypotheses that the phenotypic heterogeneity observed in PKU and related hyperphenylalaninemic disorders reflects an underlying heterogeneity of PAH genotypes. Genotype determination also allows many other clinically important issues to be examined. For example, genotype analysis permits prediction of clinical severity of PKU on the basis of the presence of mutant alleles. Genotype determination can also be used to predict the clinical outcome in affected individuals from families that exhibit both PKU and HPA hiperphenylalaninemia phenotypes.

LITERATURA

- ABADIE V., JARUZELSKA J., LYONNET S., MILLASSEAU P., BERTHELON M., REY F., MUNNICH A., REY J., 1993. *Illegitimate transcription of the phenylalanine hydroxylase gene in lymphocytes for identification of mutations in phenylketonuria*. Hum. Molec. Genet., 2, 31-34.
- BICKEL H., GERRARD J., HICKMANS E. M., 1954. *The influence of phenylalanine intake on the chemistry and behaviour of a phenylketonuric child*. Acta Paediatr. Scand., 43, 64-67.
- CAILLAUD C., LYONNET S., REY F., MELLE D., FREBOURG T., BERTHELON M., VILARINHO L., OSORIO R. V., REY J., MUNNICH A., 1991. *A 3-base pair in-frame deletion of the phenylalanine hydroxylase gene results in a kinetic variant of phenylketonuria*. J. Mol. Biol., 266, 9351-9354.
- CHELLY J., KAPLAN J. C., MAIRE P., GAUTRON S., KAHN A., 1988. *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues*. Nature, 333, 858-860.
- CHELLY J., CONCORDET J. P., KAPLAN J. C., KAHN A., 1989. *Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 2617-2621.
- COTTON R. G. H., RODRIGUES N. R., CAMBELL R. D., 1988. *Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4397-4401.
- DIANZANI I., FORREST S. M., CAMASCHIELLA C., SAGLIO G., PONZONE A., COTTON R. G. H., 1991. *Screening for mutations in the phenylalanine hydroxylase gene from Italian patients with phenylketonuria by using the chemical cleavage method: a new splice mutation*. Am. J. Hum. Genet., 48, 631-35.
- DILELLA A. G., MARVIT J., LIDSKY A. S., GUETTLER F., WOO S. L. C., 1986a. *Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria*. Nature, 322, 799-803.
- DILELLA A. G., KWOK S. C. M., LEDLEY F. D., MARVIT J., WOO S. L. C., 1986b. *Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene*. Biochemistry, 25, 743-749.
- DILELLA A. G., MARVIT J., BRAYTON K., WOO S. L. C., 1987. *An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2*. Nature, 327, 333-336.

- DOCKHORN-DWORNICZAK B., DWORNICZAK B., BROEMMELKAMP L., BUELLES J., HORST J., BOECKER W. W., 1991. *Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): A rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria*. Nucleic Acids Res., 19, 2500-25004.
- DVORAKOVA D., FAJKUSOWA L., 1993. *Direct analysis of R408W mutation in phenylalanine hydroxylase gene by allele-specific PCR amplification*. Hum. Mol. Genet., 2, 323.
- DWORNICZAK B., AULEHLA-SCHOLZ C., KALAYDJIEVA L., BARTHOLOME K., GRUDDA K., HORST J., 1991. *Aberrant splicing of phenylalanine hydroxylase mRNA: The major cause for phenylketonuria in parts of Southern Europe*. Genomics, 11, 242-246.
- EIKEN H. G., ODLAND E., BOMAN H., SKJELKVALE L., ENGBRETSSEN L. F., APOLD J., 1991. *Amplification of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations*. Nucleic Acid Res., 19, 1427-1430.
- EISENSMITH R. C., WOO S. L. C., 1991. *Phenylketonuria and the phenylalanine hydroxylase gene*. Mol. Biol. Med., 8, 3-18.
- EISENSMITH R. C., WOO S. L. C., 1992. *Molecular basis of phenylketonuria and related hyperphenylalaninemia: mutations and polymorphisms in the human phenylalanine hydroxylase gene*. Hum. Mut., 1, 13-23.
- FODDE R., LOSEKOOT M., 1994. *Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)*. Hum. Mut., 3, 83-94.
- FOELLING A., 1934. *Ueber Ausscheidung von Phenylbrenztraubensaure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillitaet*. Z.Physiol. Chem., 227, 169-176.
- GOLTSOV A., EISENSMITH R. C., KONECKI D. S., LICHTER-KONECKI U., WOO S. L. C., 1992. *Association between mutations and a VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene*. Am. J. Hum. Genet., 51, 627-636.
- GOLTSOV A. A., EISENSMITH R. C., NAUGHTON E. R., JIN L., CHAKRABORTY R., WOO S. L. C., 1993. *A single polymorphic STR system in the human phenylalanine hydroxylase gene permits rapid prenatal diagnosis and carrier screening for phenylketonuria*. Hum. Molec. Genet., 2, 577-581.
- GUETTLER F., 1984. *Phenylketonuria: 50 years since Foelling's discovery and still expanding our clinical and biochemical knowledge*. Acta Paediatr. Scand., 73, 705-716.
- GULDBERG P., FRIIS HENRIKSEN K., GUETTLER F., 1993. *Molecular analysis of phenylketonuria in Denmark: 99% of the mutations detected by denaturing gradient gel electrophoresis*. Genomics, 17, 141-146.
- GUTHRIE R., SUSI A., 1963. *A simple method for the detection of phenylketonuria in large populations of newborn infants*. Pediatrics, 32, 338-343.
- JARUZELSKA J., 1989. *Analysis of phenylalanine hydroxylase gene in diagnosis of phenylketonuria*. Post. Biol. Kom., 16, 165-175.
- JARUZELSKA J., SLOMSKI R., 1990. *Molecular basis of phenylketonuria*. Post. Bioch., 36, 24-31.
- JARUZELSKA J., FRIIS HENRIKSEN K., GUETTLER F., RIESS O., BORSKI K., BLIN M., SLOMSKI R., 1991. *The codon 408 mutation associated with haplotype 2 is predominant in Polish families with phenylketonuria*. Hum. Genet. 86, 247-250.
- JARUZELSKA J., MELLE D., MATUSZAK R., BORSKI K., MUNNICH A., 1992. *A new 15 bp deletion in exon 11 of the phenylalanine hydroxylase gene in phenylketonuria*. Hum. Mol. Genet., 9, 763-764.
- JARUZELSKA J., MATUSZAK R., LYONNET S., REY F., REY J., FILIPOWICZ J., BORSKI K., MUNNICH A., 1993. *Genetic background of clinical homogeneity of phenylketonuria in Poland*. J. Med. Genet., 30, 232-234.
- JENNINGS I. G., KEMP B. E., COTTON R. G. H., 1991. *Localization of cofactor binding sites with monoclonal anti-idiotypic antibodies: Phenylalanine hydroxylase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5734-5738.
- JERVIS G. A., 1953. *Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidising system*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 82, 514-515.
- KALAYDJIEVA L., DWORNICZAK B., AULEHLA-SCHOLZ C., DEVOTO M., ROMEO G., STURHMAN M., KUCINSKAS V., YURGELAVICIUS V., HORST J., 1991a. *Silent mutations in the phenylalanine hydroxylase gene as an aid to the diagnosis of phenylketonuria*. J. Med. Genet., 28, 686-690.
- KALAYDJIEVA L., DWORNICZAK B., KUCINSKAS V., YURGELAVICIUS V., KUNERT E., HORST J., 1991b. *Geographical distribution gradients of the major PKU mutations and the linked haplotypes*. Hum. Genet., 86, 411-413.
- KAUFMAN S., HOLZMAN N. A., MILSTIEN S., BUTLER I. J., KRUMHOLTZ A., 1975. *Phenylketonuria due to a deficiency of dihydropteridine reductase*. N. Engl. J. Med., 293, 785-790.
- KONECKI D., LICHTER-KONECKI U., 1991. *The phenylketonuria locus: current knowledge about alleles and mutations of the phenylalanine hydroxylase gene in various populations*. Hum. Genet. 87, 377-388.

- LABRUNE P., MELLE D., REY F., BERTHELOM M., CAILLAUD C., REY J., 1991. *Single-strand conformation polymorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria*. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 1115–1120.
- LEDLEY F. D., GRENETT H. E., WOO S. L. C., 1987. *Biochemical characterization of recombinant human phenylalanine hydroxylase produced in Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 262, 2228–2233.
- LEVY H. L., 1989. *Molecular genetics of phenylketonuria and its implications*. *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 667–670.
- LYONNET S., MELLE D., DE BRAEKELEER M., LAFRAMBOISE R., REY F., JOHN S. W. M., BERTHELOM M., BERTHELOT J., JOURNAL H., LE MAREC B., PARNET P., DE PARSCAU L., SAUDUBRAY J. M., ROZEN R., REY J., MUNNICH A., SCRIVER C. R., 1992. *Time and space clusters of the French-Canadian MIV phenylketonuria mutation in France*. *Am. J. Hum. Genet.*, 51, 191–196.
- OKANO Y., EISENSMITH R. C., GUETTLER F., LICHTER-KONECKI U., KONECKI D., TREFZ F. K., DASOVICH M., WANG T., HENRIKSEN K., LOU H., WOO S. L. C., 1991. *Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria*. *New Engl. J. Med.*, 324, 1232–1238.
- PENROSE L. S., 1935. *Inheritance of phenylpyruvic amentia (phenylketonuria)*. *Lancet*, 2, 192–194.
- SCRIVER C. R., KAUFMAN S., WOO S. L. C., 1988. *Mendelian hyperphenylalaninemia*. *Annu. Rev. Genet.*, 22, 301–321.
- WITT M., JARUZELSKA J., KUCZORA I., MATUSZAK R., CICHY W., BORSKI K., 1993. *A simplified method for detection of the mutations predominantly causing cystic fibrosis and phenylketonuria in Polish families*. *Clin. Genet.*, 44, 44–45.
- WOO S. L. C., LIDSKY A. S., GUETTLER F., CHANDRA T., ROBSON K. J. H., 1983. *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. *Nature*, 306, 151–155.

EWA POPOWSKA

Zakład Genetyki Centrum Zdrowia Dziecka
Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

MOLEKULARNE PODŁOŻE ZESPOŁU HUNTERA

WPROWADZENIE

Zespół Huntera należy do grupy dziedzicznych chorób metabolicznych zwanych mukopolisacharydozami, które wynikają z niedoboru enzymów lizosomalnych, rozkładających wielocukry zwane mukopolisacharydami lub glikozaminoglikanami. Nierozłożone lub częściowo zdegradowane glikozaminoglikany, a mianowicie siarczan dermatanu, siarczan heparanu, siarczan keratanu lub siarczan chondroityny są gromadzone w lizosomach komórek i częściowo wydalone z moczem. Obecność dużych ilości mukopolisacharydów w komórkach powoduje progresywne uszkodzenie ich funkcji.

W katabolizmie mukopolisacharydów bierze udział 10 różnych enzymów lizosomalnych o charakterze glikozydaz, sulfataz lub transferaz. W tabeli 1 zestawiono nazwy enzymów, rodzaje rozkładanych cukrów oraz nazwy poszczególnych chorób wywołanych przez niedobór odpowiednich enzymów.

Z klinicznego punktu widzenia mukopolisacharydozy charakteryzują się stopniowo narastającymi objawami powiększenia narządów wewnętrznych, rozsianymi zaburzeniami kostnienia (*dysostosis multiplex*) i charakterystycznymi rysami twarzy. W wielu przypadkach obserwuje się też uszkodzenie słuchu, wzroku, układu krążenia i układu kostno-stawowego. Zespół Hurlera, ciężka forma zespołu Huntera i wszystkie typy zespołu Sanfilippo przejawiają znaczne zahamowanie rozwoju umysłowego. U chorych mogą być obserwowane duże różnice w ostrości przebiegu choroby wywołanej niedoborem tego samego enzymu, a zarazem znaczne podobieństwo niektórych objawów klinicznych dla różnych typów mukopolisacharydoz. Typ mukopolisacharydozy rozpoznaje się na podstawie oceny klinicznej, testu enzymatycznego a ostatnio coraz częściej na podstawie badań genetycznych.

Zespół Huntera (mukopolisacharydoza typu II — MPS II) występuje w dwu formach:

- MPS A — ciężka postać choroby — przejawiająca się głębokim, szybko narastającym upośledzeniem umysłowym, upośledzeniem słuchu, znacznymi zmianami w układzie kostno-stawowym i układzie krążenia, powiększeniem wątroby i zgonem przed 15 rokiem życia;

— MPS II B — łagodna postać choroby — przejawiająca się prawidłowym rozwojem umysłowym, mniej nasilonymi zmianami w narządzie ruchu i układzie krążenia, dłuższym okresem przeżycia i możliwością posiadania potomstwa.

U wielu pacjentów obserwuje się pośrednie postacie choroby.

Tabela 1

Klasyfikacja mukopolisacharydoz (według NEUFELDA i MUENZERA 1989)

Typ choroby	Nazwa choroby	Nazwa uszkodzonego enzymu	Rodzaj rozkładanego cukrowca
MPS I H	Hurler	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS I S	Scheie	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS I H/S	Hurler-Scheie	α -L-iduronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS II (Forma A)	Hunter (Forma A)	sulfataza α -L-iduronianu	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS II (Forma B)	Hunter (Forma B)	sulfataza α -L-iduronianu	siarczan dermatanu siarczan heparanu
MPS IIIA	Sanfilippo A	N-sulfataza heparanu	siarczan heparanu
MPS IIIB	Sanfilippo B	α -N-acetyloglukozaminidaza	siarczan heparanu
MPS IIIC	Sanfilippo C	acetylotransferaza acetylo-CoA: α -glukozamid	siarczan heparanu
MPS IIID	Sanfilippo D	6-sulfataza N-acetylo - glukozaminy	siarczan heparanu
MPS IVA	Morquio A	6-sulfataza galaktozy	siarczan keratanu 6-siarczan chondroityny
MPS IVB	Morquio B	β -galaktozydaza	siarczan heparanu
MPS VI	Maroteaux-Lamy	4-sulfataza-N-acetylo- galaktozaminy (arylosulfataza B)	siarczan dermatanu
MPS VII	Sly	β -glukoronidaza	siarczan dermatanu siarczan heparanu 4-, 6-siarczany chondroityny

BIOCHEMICZNE PODŁOŻE ZESPOŁU HUNTERA

Zespół Huntera wynika z niedoboru sulfatazy α -L-iduronianu (EC 3.1.6.13). Enzym ten katalizuje odszczepienie reszty siarczanowej w pozycji 2' kwasu L-iduronowego, występującego na nieredukującym końcu siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu. Jest to pierwszy etap katabolizmu mukopolisacharydów. Na rysunku 1 przedstawiono strukturalną budowę obu wielocukrów a strzałkami oznaczono kolejne etapy ich rozkładu.

BUDOWA BIAŁKA ENZYMATYCZNEGO

Sulfataza iduronianu (IDS) występuje w różnych tkankach w bardzo niewielkich ilościach, co przez długi czas utrudniało izolację czystych preparatów enzymatycznych i zbadanie ich właściwości fizyko-chemicznych. Po kilku próbach w roku 1990 udało się wyizolować z wątroby, nerek, płuc i łożyska preparaty białkowe, które po 500000-krotnym oczyszczeniu posiadały specyficzną aktywność sulfatazy iduronianu (BIELICKI i współaut. 1990) i występowały w dwu formach A i B.

Aktywność obu form enzymu zależała w dużym stopniu od środowiska reakcji, to jest pH roztworu, siły jonowej, obecności różnych kationów i anionów, rodzaju substratu i obecności innych białek.

Sulfataza iduronianu, podobnie jak pozostałe enzymy biorące udział w katabolizmie mukopolisacharydów, jest hamowana przez produkty katalizowanej przez nią reakcji. Prawdopodobnie wszystkie te enzymy są zlokalizowane blisko siebie na błonach lizosomalnych, tworząc wspólny kompleks, działający szybko i sprawnie bez potrzeby transportu produktów pośrednich od jednego enzymu do drugiego.

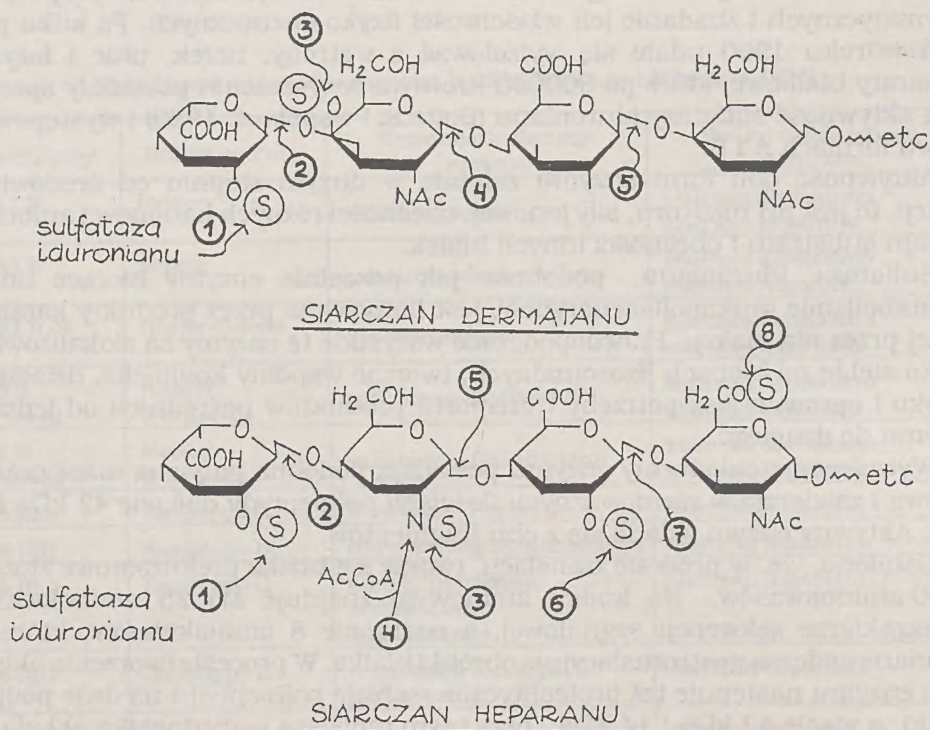
Wyizolowane obie formy enzymu posiadają podobną natywną masę cząsteczkową i zawierają w równoważnych ilościach polipeptydy o masie 42 kDa i 14 kDa. Aktywny enzym składa się z obu fragmentów.

Ustalono, że w procesie translacji tworzy się białko prekursorowe złożone z 550 aminokwasów. Na końcu aminowym znajduje się 25 aminokwasów o charakterze sekwencji sygnałowej, a następnie 8 aminokwasów, które są wycinane podczas postranslacyjnej obróbki białka. W procesie tworzenia aktywnego enzymu następuje też proteolityczne rozbiecie polipeptydu na dwie podjednostki o masie 42 kDa i 14 kDa, przy czym mniejsza podjednostka składa się z 95 aminokwasów, stanowiących koniec karboksylowy białka. Białko enzymatyczne posiada kilka potencjalnych miejsc N-glikozylacji, jednak nie ustalono jeszcze, które z nich są wykorzystywane.

Sulfataza iduronianu posiada sekwencję aminokwasową podobną do sekwencji innych sulfataz ludzkich, jak glukozamino-6-sulfataza i arylosulfataza A, B i C. Wysoki stopień homologii jest obserwowany szczególnie w N-końcowych fragmentach białek, zawierających grupy aminokwasów konserwatywnych, a dla

* Geny eukariotyczne składają się z eksonów, niosących informację o sekwencji aminokwasów w kodowanym białku oraz z intronów rozdzielających poszczególne eksony. Powstający podczas transkrypcji pierwotny mRNA posiada sekwencję odpowiadającą całemu genowi. W procesie składania genu (ang. mRNA splicing), zwanego też dojrzewaniem mRNA, następuje wycięcie sekwencji intronowych i wzajemne powiązanie sekwencji eksonowych. Przy końcu 5' intronu występuje specyficzna sekwencja nukleotydów stanowiących donorowe miejsce, a przy końcu 3' intronu specyficzna sekwencja nukleotydów stanowiących akceptorowe miejsce. Nukleotydy te są rozpoznawane przez splicosom, to jest kompleks enzymatyczny biorący udział w składaniu genu. Dojrzały mRNA niesie informację genetyczną w postaci trójnukleotydowych kodonów, które warunkują włączanie odpowiednich aminokwasów do syntetyzowanego w procesie translacji polipeptydu. cDNA stanowi łańcuch dezoksyrybonukleotydowy komplementarny do sekwencji rybonukleotydowej w dojrzałym mRNA.

IDS i arylosulfatazy C także w centralnych fragmentach polipeptydów. Prawdopodobnie wszystkie sulfatazy pochodzą ze spokrewnionej rodziny genów, które w funkcjonalnie ważnych rejonach białka uległy niewielkim zmianom w toku ewolucji.



Rys. 1. Degradacja siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu.

Strzałki z cyframi oznaczają kolejne etapy rozkładu obu mukopolisacharydów.

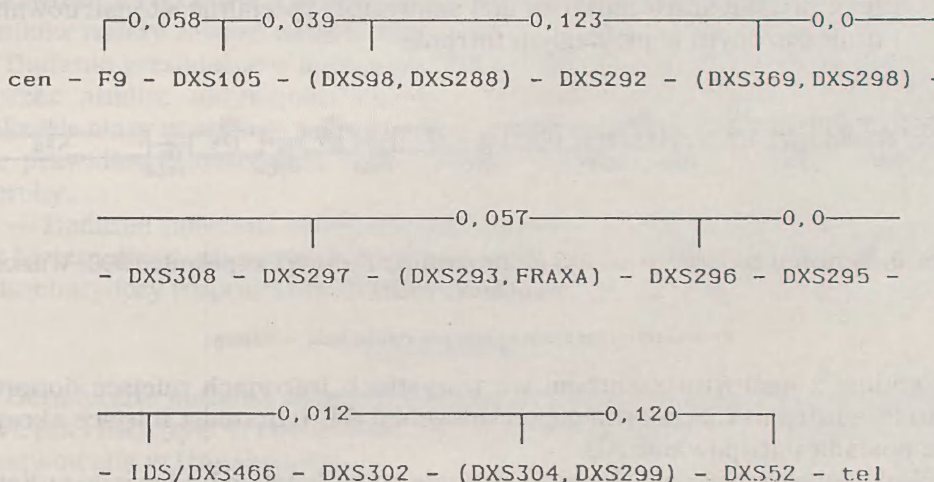
Każda sulfataza posiada też rejony unikalne, charakterystyczne tylko dla danego enzymu. Sulfataza iduronianu posiada dwa takie inserty. Nie wiadomo, jaki jest ich wpływ na działanie enzymu. Przypuszcza się, że jeden z nich może być odpowiedzialny za wiązanie IDS z błoną lizosomalną a drugi może stanowić sygnał dla wewnątrzpeptydowej proteolizy oddzielającej podjednostki 14 kDa i 42 kDa lub może decydować o specyficznym działaniu enzymu.

GENETYCZNE UWARUNKOWANIE ZESPOŁU HUNTERA

Gen kodujący sulfatazę iduronianu jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu X w rejonie q28. Prawdopodobne uszeregowanie markerów polimorficznych w rejonie lokalizacji genu *IDS* przedstawiono na rysunku 2.

W roku 1990 ustalono sekwencję całego transkryptu łącznie z rejonem promotorowym przy końcu 5' genu oraz rejonem nietranslacyjnym przy końcu

3' (WILSON i współaut. 1990). Stwierdzono, że 33 nukleotydy przed pierwszym nukleotydem wchodzącym w skład cDNA znajduje się miejsce startowe transkrypcji. Sekwencja promotorowa nie zawiera sekwencji nukleotydowej typu TATA lub CAAT, lecz posiada dwa ugrupowania złożone z nukleotydów GC (CCGCCC i GGGCGG). Ten typ potencjalnej sekwencji promotorowej jest zgodny z rolą genu *IDS*, będącego genem podstawowych przemian o niskim poziomie transkrypcji.



Rys. 2. Kolejność loci polimorficznych w rejonie Xq27-q28 (według SUTHERS i współaut. 1991).

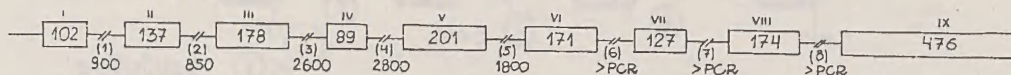
Liczby ułamkowe umieszczone między poszczególnymi loci obrazują częstość rekombinacji w tych rejonach chromosomu.

Sulfataza iduronianu, podobnie jak inne enzymy lizosomalne (np. arylosulfataza A, B i C) jest kodowana przez kilka typów mRNA różniących się długością (5,7, 5,4 i 2,1 kilo-par zasad — kpz). Wynika to z użycia różnych miejsc do poliadenylacji przy końcu 3' transkryptów. W przypadku mRNA o wielkości 2,1 kpz potencjalny sygnał poliadenylacji (AATAAA) pojawia się po 266 nukleotydach zlokalizowanych za kodonem terminalnym, niosącym informację o zakończeniu włączania aminokwasów do białka. Dla transkryptów o wielkości 5,4 i 5,7 kpz rejony nukleotydowe zlokalizowane przy końcu 3', które nie ulegają translacji, są znacznie większe i obejmują ponad 3 kpz.

W roku 1993 ukazały się równocześnie dwa doniesienia, przedstawiające sekwencję i organizację genu *IDS* (FLOMEN i współaut. 1993, WILSON i współaut. 1993). Okazało się, że gen *IDS* obejmuje rejon około 24 kpz i składa się z 9 eksonów i 8 intronów, które schematycznie przedstawiono na rysunku 3. Najmniejszy ekson (IV) jest zbudowany z 89 nukleotydów, a największy (IX) z 476 nukleotydów. Pięć pierwszych intronów (1–5) posiada wielkość od 0,85 kpz do 2,8 kpz, natomiast trzy ostatnie (6–8) są znacznie większe i obejmują łącznie 13 kpz. Nie zbadano dotychczas kolejności nukleotydów w całym genie

IDS, lecz ustalono sekwencje w poszczególnych eksonach i sekwencje graniczne ekson/intron. Poznanie fragmentów sekwencji intronowych było możliwe dzięki zsekwencjonowaniu fragmentów DNA uzyskanych po:

- amplifikacji nie znanych rejonów zawartych między znanymi fragmentami dwu sąsiadujących eksonów i
- amplifikacji nie znanych fragmentów DNA między jednym starterem reakcji PCR (polimerazowej reakcji łańcuchowej) zlokalizowanym w eksonie a drugim starterem o znanej sekwencji, specjalnie skonstruowanym i umieszczonym w przyległym intronie.



Rys. 3. Schemat budowy genu *IDS* (dane według: FLOMEN i współaut. 1993, WILSON i współaut. 1993)

Prostokątami oznaczono eksony, a cienką linią — introny.

Zgodnie z ogólnymi zasadami we wszystkich intronach miejsce donorowe wycinania intronu rozpoczyna się od sekwencji GT, natomiast miejsce akceptorowe posiada ugrupowanie AG.

Białko enzymatyczne *IDS* wykazuje duże podobieństwo budowy do sulfatazy sterydowej, szczególnie dla sekwencji kodowanych przez eksony II, III i VII, jednak ogólna organizacja genu *IDS* całkowicie odbiega od budowy genu sulfatazy sterydowej. Możliwe, że przyczyną tego jest znaczna różnica w specyficzności substratowej obu enzymów.

DIAGNOSTYKA ZESPOŁU HUNTERA

Identyfikacja zespołu Huntera (mukopolisacharydozy II, MPS II) opiera się na rozpoznaniu klinicznym, biochemicznym i genetycznym.

KLINICZNA DIAGNOSTYKA MPS II

Rozpoznanie kliniczne choroby jest prowadzone w oparciu o badania:

- rozwoju fizycznego (wagi, wzrostu, pomiarów antropometrycznych)
- rozwoju umysłowego (badania psychologiczne — współczynnik inteligencji)
- układu krążenia (echa serca i dużych naczyń, wydolności krążenia)
- ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego za pomocą tomografii komputerowej głowy (przewodnictwa nerwów obwodowych, słuchu, wzroku).

BIOCHEMICZNA DIAGNOSTYKA MPS II

Testy biochemiczne obejmują oznaczenie aktywności sulfatazy α -L-iduronianu oraz ocenę poziomu glikozaminoglikanów w moczu.

— Badanie aktywności enzymu IDS przeprowadza się w fibroblastach, cebulkach włosów, leukocytach, a także w osoczu i surowicy krwi. W przypadku badań prenatalnych są stosowane komórki wyizolowane z płynu owodniowego i sam płyn owodniowy — pobierane w 14–16 tygodniu ciąży, lub kosmki trofoblastu — pobierane w 9–10 tygodniu ciąży. Ze względu na mozaicyzm u heterozygotycznych płodów żeńskich, otrzymane próbki materiału biologicznego mogą wykazywać bardzo obniżony poziom enzymu, zbliżony do aktywności obserwowanej u chorych płodów męskich. Aby uniknąć błędów przy interpretacji wyników należy zawsze ustalać płeć płodu.

Badania prenatalne w kierunku MPS II mogą też być prowadzone pośrednio, poprzez analizę aktywności enzymu IDS w surowicy matki. Stwierdzono, że w okresie ciąży następuje podwyższenie poziomu tego enzymu u matki, gdy płód jest prawidłowy, natomiast brak zmiany poziomu, gdy płód jest nosicielem choroby.

— Badanie poziomu siarczanu dermatanu i siarczanu heparanu w moczu jest testem diagnostycznym MPS II, umożliwiającym potwierdzenie typu mukopolisacharydozy rozpoznanej klinicznie oraz wykrycie choroby u członka rodziny.

BADANIA GENETYCZNE

Genetyczne badania diagnostyczne przeprowadza się zarówno na poziomie DNA, jak i RNA (rys. 4) i porównuje się rodzaj wykrytej mutacji w genie z mutacją obserwowaną w transkrypcie.

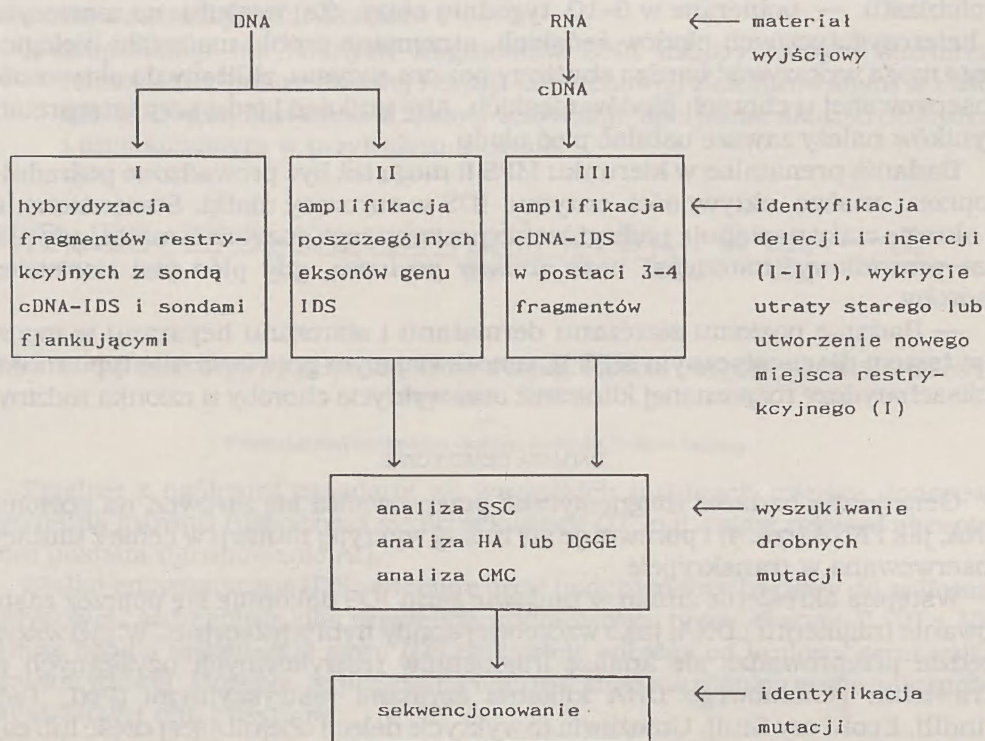
Wstępne określenie zmian w budowie genu *IDS* dokonuje się poprzez zastosowanie fragmentu cDNA, jako wzorcowej sondy hybrydizacyjnej. W pierwszym rzędzie przeprowadza się analizę fragmentów restrykcyjnych uzyskanych po strawieniu genomowego DNA kilkoma enzymami restrykcyjnymi (*Pst*I, *Taq*I, *Hind*III, *Eco*RI czy *Stu*I). Umożliwia to wykrycie delecji obejmującej część lub cały gen *IDS* oraz wykrycie większych lub mniejszych przegrupowań w obrębie genu.

Brak wszystkich fragmentów restrykcyjnych świadczy o delecji całego genu. Zmiana ilości i wielkości fragmentów restrykcyjnych, obserwowana dla kilku enzymów, świadczy o większym przegrupowaniu niż delecja lub duplikacja fragmentu genu. Natomiast zanik jednego lub pojawienie się nowego fragmentu restrykcyjnego dla jednego tylko enzymu może być wynikiem drobnej mutacji, typu kilkunukleotydowej delecji lub insercji lub jednonukleotydowej substytucji, odpowiedzialnej za zanik istniejącego lub tworzenie nowego miejsca restrykcyjnego, specyficznego dla działania badanego enzymu.

W celu określenia zasięgu wykrytej delecji całego genu *IDS* przeprowadza się badania hybrydizacyjne z zastosowaniem markerów zewnątrzgenowych, zlokalizowanych po obu stronach genu *IDS*. Po stronie telomerycznej genu wybiera się markery z locus DXS302, DXS304, DXS299 i DXS52, natomiast po stronie centromerycznej markery z locus DXS296, DXS293, DXS297 i DXS369.

Delecje i insercje w obrębie sekwencji kodujących genu *IDS* są wykrywane w genomowym DNA po amplifikacji poszczególnych eksonów lub w transkrypcie po przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji i amplifikacji cDNA-IDS w postaci 3–4 fragmentów. Porównanie wielkości poszczególnych eksonów lub fragmentów cDNA uzyskanych od chorych z odpowiednimi fragmentami kontrolnymi pozwa-

la na stwierdzenie kilkunastonukleotydowych lub większych delecji i insercji. Całkowity brak jednego lub kilku eksonów, względnie fragmentów cDNA świadczy o delecji części lub całego regionu kodującego IDS.



Rys. 4. Schemat badań genetycznych u chorych z mukopolisacharydozą typu II.

Wyżej opisane badania diagnostyczne pozwalają na wykrycie większych zmian w obrębie genu i dają pozytywny wynik dla około 20% chorych. Dla pozostałych pacjentów (około 80%) choroba jest wynikiem drobnych mutacji, które są wykrywane jedną z kilku opisanych ostatnio metod, jak analiza konformacyjna pojedynczych nici (SSC), analiza heterodupleksów na żelu denaturującym (HA), elektroforeza w gradiencie denaturującym (DGGE), analiza niesparowanych nukleotydów za pomocą RN-azy A lub chemicznej modyfikacji (CMC). Metody te pozwalają na stwierdzenie istnienia fragmentów DNA z kilku — lub nawet jednonukleotydową zmianą w sekwencji nukleotydów. Identyfikację mutacji osiąga się poprzez zsekwencjonowanie zmienionych fragmentów. Analiza kolejności nukleotydów w badanym fragmencie pozwala na wykrycie i dokładną lokalizację każdej zmiany w sekwencji nukleotydów.

Mutacja zidentyfikowana w genie *IDS* jest najlepszym sprawdzianem trafności rozpoznania klinicznego oraz najpewniejszym markerem choroby. Ustalona dla badanego pacjenta mutacja jest jednakowa dla wszystkich chorych członków rodziny i jest przekazywana z pokolenia na pokolenie zgodnie z prawami Mendla.

Przy przeprowadzaniu badań prenatalnych lub ustalaniu nosicielstwa uszkodzonego genu są wybierane takie metody, które specyficznie potwierdzają lub wykluczają obecność znanej dla rodziny mutacji.

Mutację można rozpoznać za pomocą enzymów restrykcyjnych, poprzez stwierdzenie zmiany wzoru restrykcyjnego lub identyfikację zmiany miejsca restrykcyjnego (utrata istniejącego lub pojawienie się nowego) lub poprzez tworzenie sztucznego miejsca restrykcyjnego. Przy identyfikacji mutacji punktowych można zastosować allelo-specyficzną hybrydyzację oligonukleotydową lub ligazową reakcję łańcuchową.

Chromosom X z uszkodzonym genem *IDS* można wykryć u członków rodziny z mukopolisacharydozą II przeprowadzając analizę sprzężeń locus choroby z markerami polimorficznymi i ustalając allele dziedziczące się łącznie z chorobą. Dla locus genu *IDS* są znane dwa dwualleliczne polimorfizmy ujawniane przez enzymy restrykcyjne *StuI* i *TaqI*. Enzym *StuI* tworzy allele polimorficzne o wielkości A1: 17,8 kpz i A2: (15,0+2,8) kpz, a enzym *TaqI* allele polimorficzne o wielkości A1: 5,1 kpz i A2: 3,8 kpz. Zestaw alleli określony dla obu markerów polimorficznych stanowi haplotyp markerowy choroby w rodzinie i może służyć do prześledzenia przekazywania zmutowanego genu *IDS* w rodzinie, natomiast nie daje informacji o naturze uszkodzenia samego genu.

MUTACJE W GENIE *IDS*

Dotychczas opisano około 200 przypadków zespołu Huntera. U 6% przebadanych pacjentów stwierdzono istnienie delecji obejmującej cały rejon genu *IDS* (według FROISSART i współaut. 1993). W niektórych przypadkach zidentyfikowano delecje obejmujące również rejony przyległe do locus genu *IDS*. WILSON i współpracownicy (1991) opisali delecję locus *IDS* i DXS296 u pacjenta wykazującego znaczne zahamowanie rozwoju umysłowego. Autorzy przypuszczają, że obserwowane ciężkie objawy choroby mogą być również wynikiem uszkodzenia przyległych do genu *IDS* regionów, a szczególnie FRAXA sprzężonego z locus DXS296. Znany jest też przypadek delecji obejmującej gen *IDS* i zmapowany dystalnie locus DXS304 (BECK i współaut. 1992). We wszystkich testowanych przypadkach stwierdzono, że locus DXS466 ulega kodelecji łącznie z locus genu *IDS*, co świadczy o ich bardzo bliskim sąsiedztwie lub nawet o lokalizacji DXS466 wewnątrz jednego z intronów genu *IDS*.

Analiza fragmentów restrykcyjnych, uzyskanych po trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi genomowego DNA, umożliwia nie tylko wykrycie delecji obejmującej cały lub część genu, lecz również wykrycie większych lub mniejszych przegrupowań w obrębie genu *IDS*. Ogółem zmiany tego typu obserwuje się u około 20% chorych. U pozostałych pacjentów (około 80%) choroba jest wynikiem drobnych mutacji, nie wykrywanych metodami hybrydyzacyjnymi z zastosowaniem sondy cDNA-*IDS*. Diagnostyka jest w tych przypadkach prowadzona za pomocą nowoczesnych technik genetyki molekularnej, które pozwalają na wykrycie niewielkiej zmiany w sekwencji nukleotydów typu mutacji punktowej lub kilkunukleotydowej delecji i insercji.

W 34% przypadków mukopolisacharydozy II stwierdzono istnienie mutacji punktowych typu podstawienia nukleotydowego (substytucji), powodujących powstanie kodonów o zmienionej informacji i w konsekwencji włączenie nieprawidłowego aminokwasu lub powstanie kodonu terminalnego i w konsekwencji przerwanie włączania aminokwasów do tworzonego białka (BUNGE i współaut. 1993, FLOMEN i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994). Zidentyfikowano też znaczną ilość (około 23%) delecji lub insercji jednego, kilku lub kilkunastu nukleotydów (BUNGE i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994). W niektórych przypadkach insercja była wynikiem duplikacji fragmentu eksonu.

Dużą grupę (około 23%) stanowią mutacje punktowe w rejonie występowania sekwencji specyficznych dla donorowego lub akceptorowego miejsca składania genu. Mutacje tego typu prowadzą do nierozpoznanie miejsca wycinania i usunięcia całego eksonu łącznie z intronem lub wykorzystania nietypowego miejsca wycinania i usunięcia fragmentu eksonu lub wstawienia różnej długości fragmentu intronowego do eksonu (BUNGE i współaut. 1993, FLOMEN i współaut. 1992, POPOWSKA i współaut. 1994).

Spośród mutacji punktowych często jest obserwowane podstawienie T w miejsce C w dwunukleotydowych mostkach CpG, co jest zgodne z wysoką mutagennością tych ugrupowań, wynikającą z deaminacji metylowanej cytydyny. Jedną z najczęściej występujących mutacji tego typu jest substytucja C → T w kodonie 374 (ogółem 6 przypadków), która wprowadza nowe miejsce donorowe składania genu i powoduje delecję 60 końcowych nukleotydów w eksonie VIII. Zmiana nukleotydu powoduje powstanie nowego miejsca restrykcyjnego dla enzymu HphI w genie *IDS*. Inne substytucje C → T mają charakter mutacji wprowadzającej zmienioną informację w kodonie lub wprowadzającej kodon terminalny.

Zidentyfikowane mutacje są zlokalizowane wzdłuż całego genu, przy czym 2/3 znajduje się w eksonach III, V i IX.

Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na wielką różnorodność mutacji w genie *IDS*. Identyczne zmiany wykryto tylko w kilku rodzinach i poza opisaną powyżej substytucją w kodonie 374 dotyczą mutacji w kodonach 172 i 443, wprowadzających w obu przypadkach kodon terminalny do transkryptu. Znane są też przypadki występowania mutacji w tych samych trójnukleotydowych kodonach, na przykład: 86, 135 i 468, jednak różnią się one bądź pozycją nukleotydu, który uległ zmianie, bądź rodzajem samego podstawienia nukleotydowego.

PATOGENEZA ZESPOŁU HUNTERA

Zespół Huntera manifestuje się przy całkowitym braku lub znacznie zredukowanym poziomie aktywności sulfatazy α -L-iduronianu. Całkowity brak białka enzymatycznego lub tworzenie białka o zmienionej strukturze i trwałości może być wynikiem delecji całego lub części genu *IDS* lub może być wynikiem takiej zmiany w obrębie genu, która powoduje tworzenie zmienionego i/ lub niestabilnego transkryptu.

Choroba dziedziczy się w sposób recesywny sprzężony z chromosomem X. Objawy choroby są obserwowane u osobników męskich, posiadających uszkodzony gen *IDS* na obecnym u nich jednym chromosomie X. Kobiety posiadające dwa chromosomy X, zazwyczaj nie rozwijają objawów choroby, a są jedynie nosicielkami uszkodzonego genu. Do chwili obecnej zidentyfikowano kilka przypadków stanowiących odstępstwo od tej reguły. MOSSMAN i współpracownicy (1983) opisali przypadek dziewczynki z klinicznymi objawami MPS II i niedoborem *IDS*, u której stwierdzono istnienie wymiennej translokacji zrównoważonej 46,XX,t(X;5), powodującej rozerwanie chromosomu X w locus genu *IDS*. Ujawniono też przypadki MPS II u dziewcząt nie wykazujących zmian cytogenetycznych (CLARKE i współaut. 1991). Szczegółowe badania stwierdziły istnienie u tych dziewcząt selektywnej (non random) inaktywacji jednego z chromosomów X. Przypuszczać należy, że inaktywacji uległ prawidłowy chromosom, natomiast aktywny pozostał chromosom niosący uszkodzony gen *IDS*.

Oceniono, na podstawie dotychczas zdiagnozowanych przypadków, że mukopolisacharydoza II występuje z częstością $7,5 \times 10^{-6}$ żywo narodzonych chłopców. U Żydów askenazyjskich i marokańskich obserwuje się dwukrotnie większą częstość choroby (14,8 przypadków na 1 milion), co może być wynikiem prenatalnej selekcji faworyzującej chromosom X z uszkodzonym genem *IDS* (ZŁOTOGORAI i współaut. 1991).

ZALEŻNOŚĆ FENOTYP — GENOTYP

W celu określenia zależności między fenotypem a genotypem objawy kliniczne MPS II są klasyfikowane w trzech grupach, obejmujących formę A i B oraz uwzględniających postać pośrednią choroby.

Grupa I — choroba o łagodnym przebiegu — obejmuje pacjentów z normalnym współczynnikiem inteligencji i typowymi, lecz niezbyt ciężkimi zmianami somatycznymi.

Grupa II — choroba o umiarkowanym przebiegu — obejmuje pacjentów z typowymi zmianami somatycznymi i obniżonym stopniem rozwoju umysłowego, który wraz z wiekiem wykazuje tendencje uwsteczniające.

Grupa III — choroba o ciężkim przebiegu — obejmuje pacjentów z ostro zaznaczonymi zmianami somatycznymi i głębokim niedorozwojem umysłowym, objawiającym się między innymi całkowitym brakiem mowy lub znajomością jedynie kilku słów.

Dotychczas przeprowadzone badania genetyczne wykazują wielką różnorodność mutacji w genie *IDS*. Identyczne zmiany w budowie genu wykryto tylko w nielicznych rodzinach dla kilku rodzajów mutacji.

Funkcja poszczególnych fragmentów kodowanego białka enzymatycznego nie jest jeszcze wyjaśniona. Wysoka homologia pewnych obszarów białka *IDS* z budową innych sulfataz lizosomalnych świadczy o funkcjonalnej i strukturalnej ważności tych rejonów, obejmujących ugrupowania tak zwanych aminokwasów konserwatywnych. Stwierdzono, że mutacje dotyczące obszarów konserwatywnych wywołują chorobę o ciężkim lub umiarkowanym przebiegu (BUNGE i współaut. 1993, POPOWSKA i współaut. 1994). Dzieje się to nawet w przypadku

mutacji punktowych, powodujących zmianę jednego prawidłowego aminokwasu na aminokwas o odmiennej strukturze i odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych. Podobnie dość ciężki przebieg choroby obserwuje się u pacjentów z mutacjami zlokalizowanymi w unikalnych rejonach genu o budowie specyficznej tylko dla sulfatazy iduronianu.

U niektórych pacjentów obserwowano mutacje punktowe, powodujące zmianę kodonów informacyjnych w kodony terminalne, co prowadziło do przzerwania włączania aminokwasów do tworzonego białka. Powstanie tego typu zmiany w kodonie 172 warunkowało ciężkie objawy choroby, natomiast w kodonie 443 i 475 umiarkowane objawy choroby. W pierwszym przypadku mutacja wystąpiła w początkowym fragmencie transkryptu, co w konsekwencji przejawiało się całkowitym brakiem aktywnego białka enzymatycznego. W dwu pozostałych przypadkach kodony terminalne powstały w końcowym fragmencie transkryptu, już poza rejonem wysokiej homologii obserwowanej dla różnych sulfataz, co prawdopodobnie powodowało, że tworzone cząsteczki białkowe charakteryzowały się znaczną stabilnością i mniej zredukowaną aktywnością enzymatyczną.

Znaczną zmienność fenotypową manifestują też mutacje zmieniające specyficzność miejsca donorowego lub miejsca akceptorowego składania genu. Ekspresja tych mutacji zależy od ich lokalizacji w genie i wpływu na budowę i strukturę tworzonego białka enzymatycznego. Jedną z takich zmian jest mutacja w eksonie VIII (kodon 374), która wprowadza nowe miejsce donorowe składania genu, nie naruszając przy tym sekwencji nukleotydowej w uprzednio istniejącym miejscu. Nowe miejsce donorowe wykazuje większe powinowactwo do splicingu — kompleksu enzymatycznego zajmującego się wycinaniem intronów i wzajemnym łączeniem eksonów. Stwierdzono, że głównie jest używane nowe miejsce donorowe a w dużo mniejszym stopniu stare miejsce donorowe składania genu co powoduje, że obok zmienionego transkryptu tworzą się też pewne ilości normalnego transkryptu. W konsekwencji powstaje pewna ilość prawidłowego białka a choroba ma przebieg łagodny. U pacjentów z tą mutacją obserwuje się zmniejszoną ruchliwość stawów, zaburzenia słuchu, obniżony wzrost i charakterystyczne rysy twarzy, jednak rozwój umysłowy pozostaje w normie, co pozwala im na podjęcie nauki w normalnej szkole.

Duża heterogenność zmian genetycznych utrudnia opracowanie prostej zależności między obserwowanym fenotypem a genotypem. Ogólnie można stwierdzić, że wszelkie mutacje prowadzące do delecji całego lub fragmentu genu, drobne mutacje typu delecji czy insercji zmieniające ramkę odczytu, mutacje punktowe w rejonach konserwatywnych lub w rejonach unikalnych oraz mutacje punktowe wprowadzające kodon terminalny, szczególnie w początkowym rejonie transkryptu, będą odpowiedzialne za brak lub tworzenie zmienionego, niestabilnego białka całkowicie lub w znacznym stopniu pozbawionego aktywności enzymatycznej i w konsekwencji będą się ujawniały w formie choroby o ciężkim lub umiarkowanym przebiegu. Natomiast mutacje zlokalizowane w mniej ważnych funkcyjnie rejonach białka, nie wywołujące dużych zmian w sekwencji i budowie przestrzennej białka, będą odpowiedzialne za wystąpienie choroby o łagodnym przebiegu.

Badania korelacji między fenotypem a genotypem w spokrewnionych rodzinach skłaniają do twierdzenia, że kondycja fizyczna i umysłowa chorego

z mukopolisacharydozą II zależy głównie od podłoża genetycznego choroby, lecz w pewnym stopniu mają też na nią wpływ uwarunkowania środowiska.

Mukopolisacharydoza II, jako choroba uwarunkowana genetycznie, jest nieuleczalna za pomocą dotychczas stosowanych zabiegów klinicznych i farmakologicznych. Obecnie możliwa jest niewielka poprawa komfortu życia chorego poprzez stosowanie odpowiedniej rehabilitacji ruchowej, treningu umysłowego i doraźnej terapii farmakologicznej.

W latach 70-tych zasygnalizowano osiągnięcie pewnej poprawy ruchliwości stawów u chorych w wyniku przetoczenia dużej ilości plazmy lub leukocytów. Lepsze rezultaty normalizacji wydalania glikozaminoglikanów, zmniejszenia przerostu narządów wewnętrznych i zwiększenia ruchliwości stawów uzyskano po przeprowadzeniu transplantacji szpiku. Niestety, w obu przypadkach osiągnięto jedynie przejściową poprawę stanu zdrowia.

Prawdziwe uleczenie choroby wydaje się bardzo trudne do osiągnięcia, gdyż wiąże się z naprawą uszkodzonego genu we wszystkich komórkach organizmu. Osiągnięcie tego celu jest możliwe jedynie poprzez odpowiednią wymianę materiału genetycznego w zarodku podczas pierwszych podziałów zygoty. Działania tego typu są na razie w stadium pierwszych prób wykonywanych na komórkach zwierzęcych. Zastosowanie ich w terapii człowieka wiąże się z pokonaniem trudności technicznych gwarantujących odpowiednie włączenie prawidłowego genu w specyficznym dla niego locus na chromosomie. Ewentualne wprowadzenie terapii u ludzi wiąże się też z koniecznością ustalenia przepisów prawnych zezwalających na tego typu manipulacje genetyczne.

MOLECULAR BASIS OF THE HUNTER SYNDROME

Summary

Mucopolysaccharidoses (MPS) are a group of inheritable disorders caused by a deficiency of lysosomal enzymes needed for stepwise degradation of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans). To this group of diseases belongs the Hunter syndrome (mucopolisaccharidosis type II, MPS II) caused by absence or reduction of iduronate sulfatase (IDS). This leads to accumulation of the incompletely degraded dermatan and heparan sulfates. Symptoms of the disease include short stature, coarse facial features, skeletal deformities and, sometimes, progressive deafness, mental retardation and greatly shortened life span.

IDS is encoded by a gene located on X chromosome. The IDS gene contains 9 exons and 8 introns.

Many different type of mutations were observed in patients with MPS II. In about 20% of the cases deletions of the whole gene or other major structural alterations were found. The majority of the patients carries small aberrations of the IDS gene, 23% having deletions of one, two or three base pairs, and 57% various point mutations like missense, nonsense or mutations affecting the splice site.

Identification of mutations is based on DNA or RNA analysis. The most useful molecular techniques seem to be restriction fragments analysis, exon and cDNA fragment amplification, single strand conformational polymorphism and heteroduplex analysis, dot-blot hybridization and sequencing. Knowledge of the primary genetic defect allows carrier detection and prenatal diagnosis as well as some insight into the relationship between genotype and phenotype.

LITERATURA

- BECK M., STEGLICH C., ZABEL B., DAHL N., SCHWINGER E., HOPWOOD J. J., GAL A., 1992. *Deletion of the Hunter gene and both DXS466 and DXS304 in a patient with mucopolysaccharidosis*. Am. J. Med. Genet., 44, 100-103.
- BIELICKI J., FREEMAN C., CLEMENTS P. R., HOPWOOD J. J., 1990. *Human liver iduronate-2-sulphatase. Purification, characterization and catalytic properties*. Biochem. J., 271, 75-86.
- BUNGE S., STEGLICH C., BECK M., ROSENKRANZ W., SCHWINGER E., HOPWOOD J. J., GAL A., 1992. *Mutation analysis of the iduronate-2-sulfatase gene in patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Hum. Mol. Genet., 1, 335-339.
- BUNGE S., STEGLICH C., ZUTHER C., BECK M., MORRIS C. P., SCHWINGER E., SCHINZEL A., HOPWOOD J. J., GAL A., 1993. *Iduronate-2-sulfatase gene mutations in 16 patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Hum. Mol. Genet., 2, 1871-1875.
- CLARKE J. T. R., GREER W. L., STRASBERG P. M., PEARCE R. D., SKOMOROWSKI M. A., RAY P. N., 1991. *Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) associated with unbalanced inactivation of the X chromosomes in a karyotypically normal girl*. Am. J. Hum. Genet., 49, 289-297.
- FLOMEN R. H., GREEN E. P., GREEN P. M., BENTLEY D. R., GIANNELLI F., 1993. *Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate (IDS) gene*. Hum. Mol. Genet., 2, 5-10.
- FLOMEN R. H., GREEN P. M., BENTLEY D. R., GIANNELLI F., GREEN E., 1992. *Detection of point mutations and a gross deletion in six Hunter syndrome patients*. Genomics, 13, 543-550.
- FROISSART R., BLOND J.-L., MAIRE I., GUIBAUD P., HOPWOOD J. J., MATHIEU M., BOZON D., 1993. *Hunter syndrome: Gene deletions and rearrangements*. Human Mut., 2, 138-140.
- MOSSMAN J., BLUNT S., STEPHENS R., JONES E. E., PEMBREY M., 1983. *Hunter's disease in a girl: association with X:5 chromosomal disrupting the Hunter gene*. Arch. Dis. Child, 58, 911-915.
- NEUFELD E. F., MUENZER J., 1989. *The mucopolysaccharidoses*. [W:] *The metabolic basis of inherited disease* (red.) SCRIVER C. R., BEANDET A. L., SLY W. S., VALLE D., MCGRAW-HILL, New York 1565-1587.
- POPOWSKA E., RATHMAN M., TYLKI-SZYMAŃSKA A., BUNGE S., STEGLICH C., SCHWINGER E., GAL A., 1994. *Mutations of the iduronate-2-sulfatase gene in 12 Polish patients with mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)*. Human Mut. (w druku).
- SUTHERS G. K., OBERL I., NANCARROW J., MULLEY J. C., HYLAND V. J., WILSON P. J., MCCURE J., MORRIS C. P., HOPWOOD J. J., MANDEL J. L., SUTHERLAND G. R., 1991. *Genetic mapping of new RFLPs at Xq27-q28*. Genomics, 9, 37-43.
- WILSON P. J., MEANEY C. A., HOPWOOD J. J., MORRIS C. P., 1993. *Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene*. Genomics, 17, 773-775.
- WILSON P. J., MORRIS C. P., ANSON D. S., OCCHIODORO T., BIELICKI J., CLEMENTS P. R., HOPWOOD J. J., 1990. *Hunter syndrome: Isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8531-8535.
- WILSON P. J., SUTHERS G. K., CALLEN D. F., BAKER E., NELSON P. V., COOPER A., WRAITH J. E., SUTHERLAND G. R., MORRIS C. P., HOPWOOD J. J., 1991. *Frequent deletions at Xq28 indicate genetic heterogeneity in Hunter syndrome*. Hum. Genet., 86, 505-508.
- ZLOTOGORA J., SCHAAP T., ZEIGLER M., BACH G., 1991. *Hunter syndrome in Jews in Israel: further evidence for prenatal selection favoring the Hunter allele*. Hum. Genet., 86, 531-533.

ANNA KOWALSKA¹, BOŻENA PIŁACIK²¹Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań²Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. Jerzego Nofera
Teresy 8, 90-950 Łódź

NIEDOBÓR ALFA-1-ANTYTRYPSYNY

ALFA-1-ANTYTRYPSYNA (ALFA-1 — INHIBITOR PROTEAZ
ALFA-1 — ANTYPROTEAZA)

Inhibitory proteaz stanowią po albuminach i immunoglobulinach najliczniejszą frakcję białek funkcjonalnych krwi. Termin SERPINS (ang. serine protease inhibitors) określa rodzinę inhibitorów proteaz serynowych (tj. proteaz zawierających w centrum aktywnym reszty serynowe), które kontrolują szereg bardzo istotnych procesów fizjologicznych w organizmie, związanych między innymi z fibrynolizą, krzepnięciem krwi, aktywacją komplementu, uwalnianiem kinin, procesami zapalnymi i innymi (PATTERSON 1991). Poznane glikoproteiny z rodziny SERPINS wykazują duży stopień podobieństwa, zarówno struktury molekularnej (stosunkowo nieduża masa cząsteczkowa od około 40 do 60 kDa, pojedynczy łańcuch peptydowy, podobna sekwencja aminokwasów tworzących centrum aktywne), jak i mechanizmu działania (tab. 1).

Tabela 1

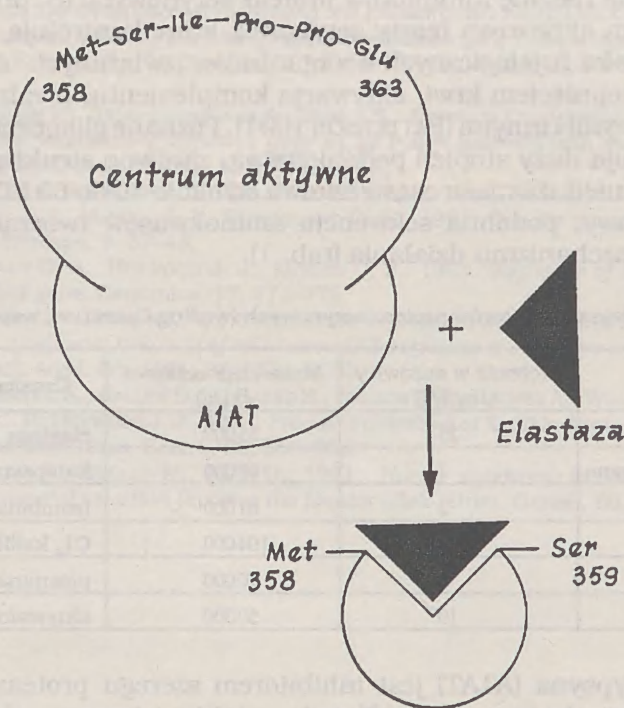
SERPINS — rodzina inhibitorów proteaz serynowych (według CARRELL'A i współaut. 1989)

Inhibitor	Stężenie w surowicy ($\mu\text{mol/l}$)	Masa cząsteczkowa (kDa)	Cząsteczka docelowa
α_1 -Antytrypsyna	25	55 000	elastaza
α_1 -Antychymotrypsyna	7	69 000	katepsyna G
Antytrombina	2	61 000	trombina
C1-inhibitor	2	104 000	C1, kallikreina
Antyplazmina	1	70 000	plazmina
PA-inhibitor	10^{-4}	50 000	aktywator plazminogenu

Alfa-1-antytrypsyna (A1AT) jest inhibitorem szeregu proteaz serynowych: przede wszystkim elastazy neutrofilowej, a także trypsyny, chymotrypsyny, plazminy, plazminogenu, katepsyny G. Podstawową funkcją A1AT jest obrona organizmu przed zbyt silnym działaniem elastazy neutrofilowej wydzielanej przez leukocyty i makrofagi. Gen A1AT o długości 12 200 par zasad jest zlokalizowany

na chromosomie 14 w pozycji q31-32.3. (CRYSTAL 1989). Ekspresja genu ma charakter tkankowo-specyficzny. Synteza A1AT zachodzi głównie w wątrobie. Dodatkowym miejscem syntezy są fagocyty jednojądrzaste, monocyty krwi i makrofagi pęcherzyków płuc. Cykl biosyntezy A1AT jest typowy dla glikoprotein sekrecyjnych. W wyniku translacji powstaje prekursor białka o długości 418 aminokwasów, przechodzący dzięki obecności N-końcowego peptydu sygnałowego do cystern aparatu Golgiego. Po zakończeniu procesu glikozylacji, odcięciu peptydu sygnałowego i przyjęciu odpowiedniej konformacji, dojrzałe białko jest wydzielane do krwi.

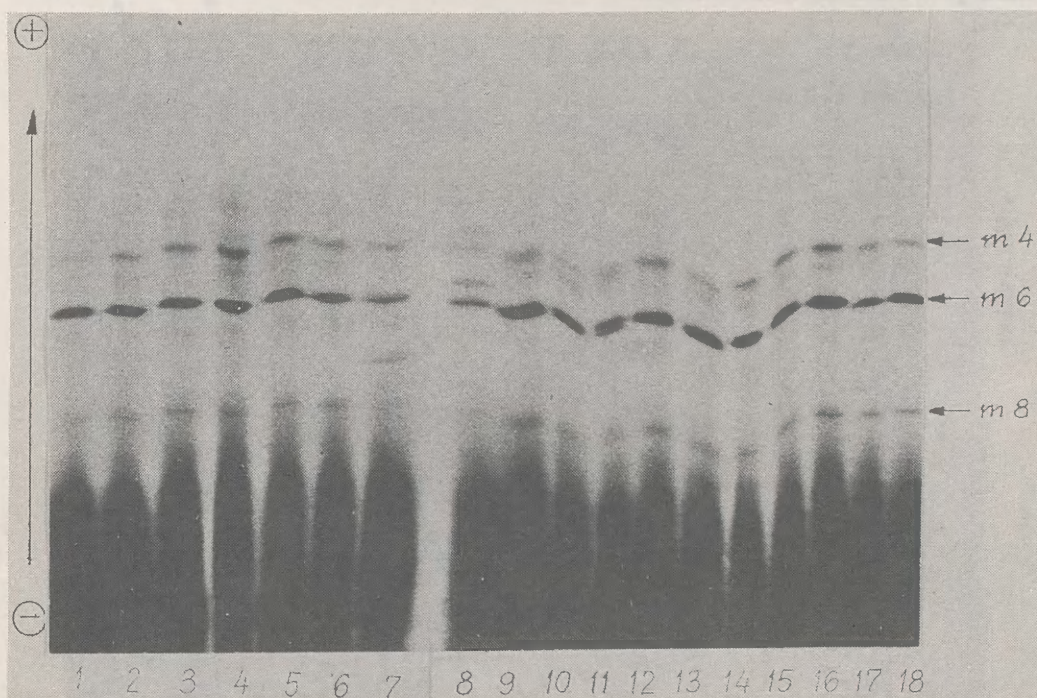
Cząteczka A1AT (55 kDa) składa się z pojedynczego łańcucha peptydowego zawierającego 394 reszt aminokwasowych oraz trzech łańcuchów cukrowcowych o różnym stopniu rozgałęzienia, zbudowanych z reszt *N*-acetyloglukozaminy, mannozy, galaktozy i kwasu siałowego. Badania krystalograficzne wykazały, iż A1AT jest białkiem globularnym o wysoce uporządkowanej strukturze trzeciorzędowej. Centrum aktywne tworzy sześć reszt aminokwasowych zajmujących pozycje od 358 do 363 w łańcuchu peptydowym. Zasadnicze znaczenie dla oddziaływania z elastazą ma metionina i seryna w pozycjach odpowiednio 358 i 359 (ryc. 1). Mechanizm hamowania proteaz polega na ich inaktywacji poprzez tworzenie trwałego, nieodwracalnego kompleksu inhibitor-proteaza, który następnie jest usuwany z krwiobiegu (CARRELL i współaut. 1982).



Ryc. 1. Schemat interakcji pomiędzy elastazą neutrofilową i alfa-1-antytrypsyną (według KALSHEKERA i współaut. 1990).

POLIMORFIZM LOCUS PI W POPULACJI

W populacji występuje wiele odmian fenotypowych A1AT, tak zwanych wariantów, uwarunkowanych allelami locus Pi (protease inhibitor) (KOWALSKA 1993). Dzięki użyciu technik elektroforetycznych, szczególnie izoelektroogniskowania w gradiencie pH od 4 do 6, wykryto dotychczas ponad 75 wariantów A1AT. W populacji dominują (95%) nosiciele prawidłowego wariantu M, który występuje w formie kilku subtypów: M1, M2, M3, zabezpieczających prawidłowy poziom A1AT (ryc. 2). Natomiast pozostałe 5% wariantów A1AT występujących w populacji jest często połączonych z zaniżonym poziomem inhibitora we krwi i, co za tym idzie, ze zwiększoną predyspozycją do rozwoju chorób (KOWALSKA i współaut. 1991, PIŁACIK 1988, TITENKO-HOLLAND i współaut. 1992).

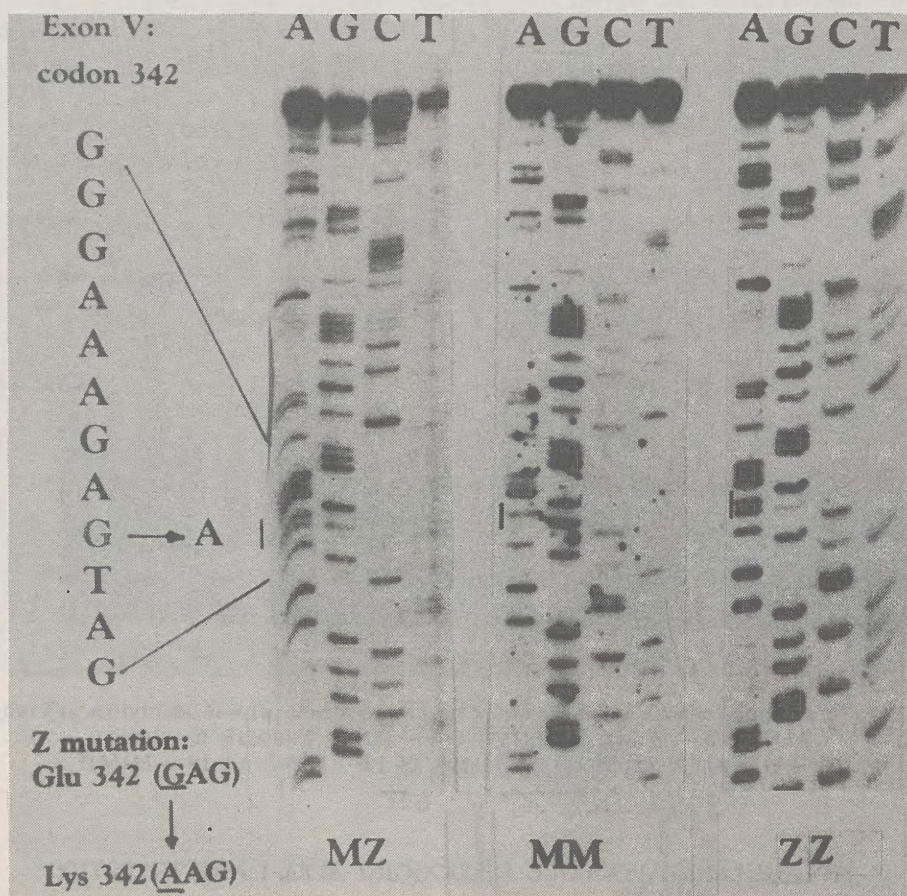


Ryc. 2. Izoelektroogniskowanie białek surowicy krwi w gradiencie pH 4–6. Identyfikacja fenotypów A1AT: 1–3 — M1M1, 4 — M1M3, 5–6 — M1M1, 7 — M1S, 8 — M1F, 9 — M1M3, 10 — M2M3, 11 — M1M2, 12–13 — M1M3, 14–18 — M1M1.

MOLEKULARNE PODŁOŻE NIEDOBORU ALFA-1-ANTYTRYPSYNY

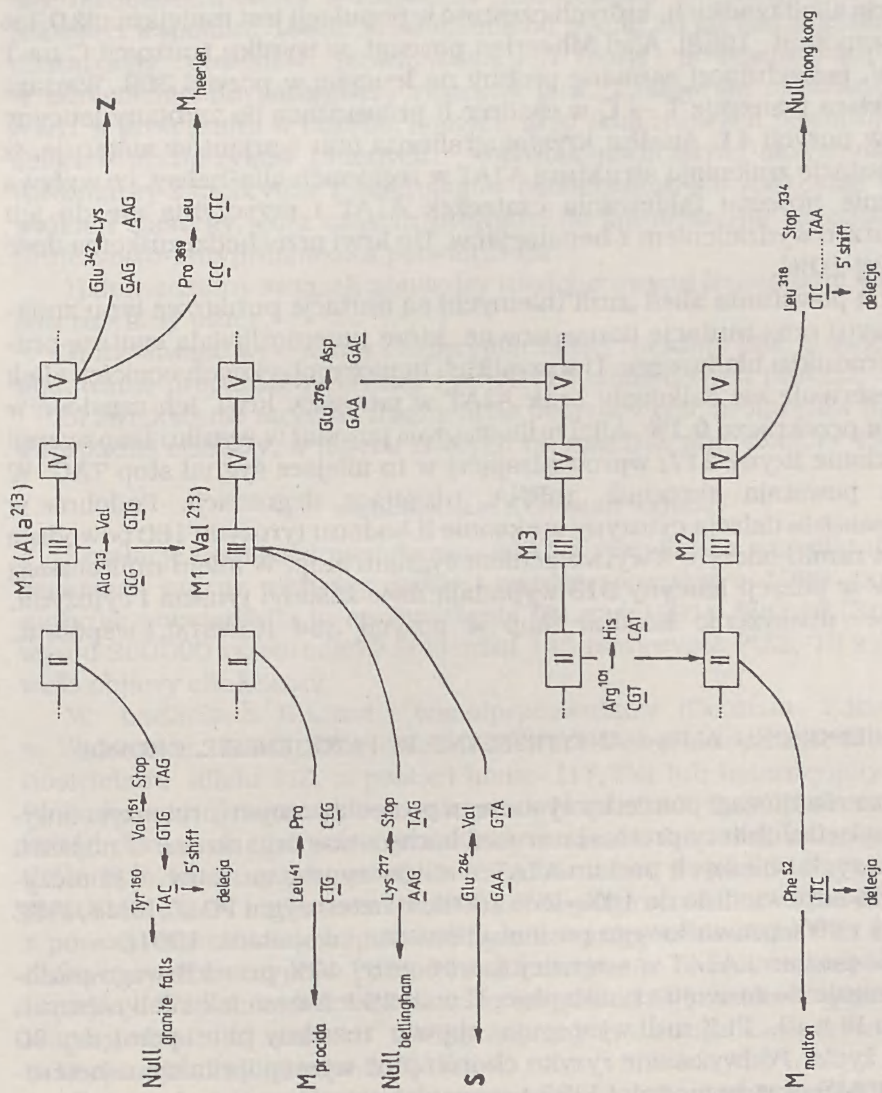
U podstaw niedoboru A1AT leżą allele deficytowe, które nie zapewniają prawidłowego stężenia A1AT oraz allele „null” (nieme) połączone z brakiem A1AT w surowicy.

Do najczęstszych alleli deficytowych należą allele Z i S występujące w populacjach rasy kaukaskiej z częstością od 1% do 4%. Allel Z powstał w wyniku tranzykcji G → A w eksonie V, dającej w pozycji 342 łańcucha peptydowego lizynę zamiast glutaminy (ryc. 3). Zamiana w sekwencji aminokwasów narusza trzeciorzędową strukturę białka. Wprowadzenie aminokwasu z dodatkową grupą aminową, wskutek zmiany ładunku cząsteczki, powoduje zerwanie mostka elektrostatycznego pomiędzy glutaminą 342 a lizyną 290. W wyniku tych zmian zwolnieniu ulega tempo posttranslacyjnego procesu fałdowania białka, co sprzyja oddziaływaniom pomiędzy resztami hydrofobowymi przylegających do siebie cząsteczek A1AT i powoduje ich agregację w siateczce endoplazmatycznej hepatocytów. Jedynie około 10%–15% zmutowanej formy A1AT jest wydzielane do krwi, gdzie wariant ten wykazuje zmniejszoną aktywność antyproteolityczną. Wskutek zmian konformacyjnych kompleks A1AT-ela-staza jest strukturą niestabilną.



Ryc. 3. Mutacja Z Glu 342 (GAG) → Lys 342 (AAG) w eksonie V genu alfa-1-antytrypsyny.

W deficytowym allelu S transwersja A → T w eksonie III genu prowadzi do zamiany glutaminy na walinę w pozycji 262 (ryc. 4). W następstwie zerwania



Ryc. 4. Mutacje w sekwencjach kodujących warunkujące powstanie alleli deficytowych i niemych genu alfa-1-antytropsyny (według BRANTLY'EGO i współprac. 1989).

mostka elektrostatycznego pomiędzy glutaminą a lizyną w pozycji 290 zmniejsza się stabilność białka, co powoduje jego rozpad w hepatocytach. Jedynie 40% wariantu S jest wydzielane do krwiobiegu. Mutacja ta nie zmniejsza działania inhibitora. Nie obserwuje się też agregacji cząsteczek w cytoplazmie hepatocytów.

Inne zidentyfikowane allele deficytowe tj: Mheerlen, Mprocida, Mduarte, P, Zaugsburg należą do alleli rzadkich, których częstość w populacji jest mniejsza niż 0,1% (BRANTLY i współaut. 1988). Allel Mheerlen powstał w wyniku tranzykcji C na T w eksonie V, powodującej zamianę proliny na leucynę w pozycji 369. Wariant Mprocida zawiera tranzykcję T → C w eksonie II prowadzącą do zamiany leucyny na prolinę w pozycji 41. Analiza krystalograficzna obu wariantów sugeruje, iż powyższe mutacje zmieniają strukturę A1AT w regionach alfa-helisy, co wpływa na zaburzenie procesu fałdowania cząsteczek A1AT i przyczynia się do ich degradacji przed wydzieleniem z hepatocytów. Do krwi przechodzi znikoma ilość A1AT (poniżej 10%).

Przyczyną powstania alleli „null”(niemych) są mutacje punktowe typu zmiana fazy odczytu oraz mutacje nonsensowne, które uniemożliwiają syntezę prawidłowego produktu białkowego. U wszystkich homozygotycznych nosicieli alleli niemych obserwuje się całkowity brak A1AT w surowicy krwi. Ich częstość w populacji nie przekracza 0,1%. Allel nullbellingham powstał w wyniku transwersji A → T w kodonie lizyny 217, wprowadzającej w to miejsce sygnał stop TAG. W następstwie powstają skrócone mRNA, ulegające degradacji. Podobnie w allelu nullgranitefalls delecja cytozyny w eksonie II kodonu tyrozyny 160 powoduje przesunięcie ramki odczytu z wytworzeniem sygnału stop. W allelu nullhongkong w eksonie IV w pozycji leucyny 318 wypadają dwie zasady: tymina i cytozyna, co powoduje utworzenie kodonu stop w pozycji 334 (CRYSTAL i współaut. 1989).

ROLA NIEDOBORU ALFA-1-ANTYTRYPSYNY W PATOGENEZIE CHOROÓB

Zakłócenie równowagi pomiędzy systemem proteolitycznym (proteazy) i antyproteolitycznym (inhibitory proteaz) narusza homeostazę organizmu. U nosicieli alleli deficytowych i niemych poziom A1AT w surowicy jest zaniżony, u homozygot PiZZ i PiSS odpowiednio do 10%–15% i 60%, u heterozygot PiMZ, PiMS, PiSZ do 60%, 80% i 40% prawidłowego poziomu (BRANTLY i współaut. 1991).

Obniżenie poziomu A1AT w surowicy krwi poniżej 40% prawidłowego poziomu predysponuje do rozwoju chorób płuc. U wszystkich nosicieli alleli niemych o fenotypach Pi null, Pi Z null występują objawy rozedmy płuc pomiędzy 30 a 40 rokiem życia. Podwyższone ryzyko chorób płuc występuje także u heterozygot PiMZ, PiMS oraz homozygot PiSS i znacznie wzrasta wraz z ekspozycją na działanie dymu papierosowego oraz szkodliwych czynników środowiska, inaktywujących działanie A1AT.

Zaburzenia glikozylacji A1AT połączone z akumulacją złogów A1AT w hepatocytach leżą u podstaw chorób wątroby, z powodu których umiera w pierwszych latach życia około 3% dzieci o fenotypie PiZZ (POVEY 1990).

NIEDOBÓR A1AT A CHOROBY PŁUC

Korelację pomiędzy obniżonym poziomem α_1 -globulin, a rozedmą płuc po raz pierwszy zaobserwowali LAURELL i ERIKSSON w 1963 roku. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w wielu krajach Europy i USA wykazały związek pomiędzy niedoborem A1AT a rozwojem przewlekłych obturacyjnych chorób płuc (KLASEN i współaut. 1986). Prowadzone od ponad 20 lat badania doświadczalne dostarczyły dowodów potwierdzających teorię proteazowo-antyproteazową w odniesieniu do patogenezy rozedmy płuc. Zakłócenie równowagi pomiędzy A1AT a proteazami w obrębie dolnych dróg oddechowych powoduje niszczenie ścianek pęcherzyków płucnych. Wskutek nadmiernej aktywności elastazy uwalnianej z fagocytów i makrofagów pęcherzykowych następuje uszkodzanie włókien elastyny, co z czasem prowadzi do zmniejszenia sprężystości. Teorię proteazowo-antyproteazową potwierdzają:

- 1) dowiedziony związek pomiędzy niedoborowymi fenotypami A1AT a rozwojem rozedmy płuc;
- 2) możliwość wywołania eksperymentalnej rozedmy płuc u zwierząt poprzez podawanie preparatów elastazy i innych elastolitycznych proteaz;
- 3) zwiększenie stężenia fragmentów peptydowych, produktów pochodzących z rozpadu elastazy, w moczu chorych na rozedmę płuc (JANOFF 1985).

NIEDOBÓR A1AT A CHOROBY WĄTROBY

Korelację pomiędzy niedoborem A1AT a marskością wątroby u dzieci zaobserwowali po raz pierwszy SHARP i współpracownicy w 1969, po czym wielu autorów potwierdziło to spostrzeżenie (PIŁACIK 1991). SVEGER (Szwecja, 1976) wśród 200 000 noworodków stwierdził 125 homozygot PiZZ, 13 z nich wykazywało objawy cholestazy.

W badaniach RUJNER i współpracowników (Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie, 1986) 22% dzieci z noworodkowym zapaleniem wątroby było nosicielami allelu PiZ, w postaci homo- (17,7%) lub heterozygotycznej (4,4%). W badaniach przeprowadzonych przez HODGES'A i współpracowników (1981) wśród dorosłych chorych z przewlekłym zapaleniem oraz marskością wątroby 2,5% było heterozygotami PiMZ. Niedobór A1AT zwiększa ryzyko pierwotnego raka wątroby. W badaniach ERIKSSONA i współpracowników (1986) 17% chorych z powodu wątrobiaka (hepatoma) było homozygotami allelu PiZ. Udział innych deficytowych fenotypów: PiSZ, Pi nullZ w rozwoju chorób wątroby jest znacznie mniejszy. Wśród rzadkich alleli deficytowych A1AT marskość wątroby obserwowano jedynie u nosicieli alleli połączonych z akumulacją zmutowanej A1AT w hepatocytach PiMmalton i PiMduarte.

Patogeneza chorób wątroby, uwarunkowanych niedoborem A1AT, pozostaje dotychczas nie wyjaśniona. Przede wszystkim nie są znane czynniki inicjujące proces chorobowy. Postulowanych jest szereg hipotez. Zgodnie z hipotezą „akumulacji” przyczyną rozwoju marskości wątroby u nosicieli allelu PiZ jest tworzenie się złogów zmutowanej A1AT w cytoplazmie hepatocytów. Tranzycja G $\rightarrow$ A w kodonie 342 powoduje zaburzenie fałdowania białka, co uniemożliwia prawidłowy proces jego glikozylacji i sekrecji. Cząsteczki zmutowanej A1AT precypitują

w siateczce endoplazmatycznej komórek wątroby. Mechanizm niszczenia hepatocytów przez zakumulowaną A1AT nie jest znany. Carrell sugeruje możliwość „przełączania” metabolizmu hepatocytów na wewnątrzkomórkową proteolizę. Badania biopunktatów wątroby w mikroskopie elektronowym u chorych ze złogami A1AT wykazały znaczne zmiany w ultrastrukturze komórkowej (m.in.: wzrost liczby peroksosomów, rozciągnięcie reticulum endoplazmatycznego) oraz występowanie dużej liczby martwych komórek. Niezrozumiały pozostaje fakt występowania złogów A1AT tylko u 40% chorych homozygot PiZZ. Brak jest korelacji pomiędzy liczbą i rozmiarami złogów a intensywnością objawów choroby. Według hipotezy „zakłóconej równowagi proteazowej” niedobór w naczyniach krwionośnych otaczających bezpośrednio hepatocyty uniemożliwia ich ochronę przed atakiem proteolitycznym. Nadmierna aktywność proteaz uwalnianych z leukocytów i makrofagów podczas procesów zapalnych powoduje niszczenie matrix komórek wątroby. Obniżony poziom A1AT nie wydaje się być jednak czynnikiem decydującym w rozwoju choroby wątroby. U wszystkich dotąd opisanych w literaturze homozygot alleli niemych, z całkowitym brakiem A1AT występowała jedynie rozedma płuc.

Żadna z dwóch przedstawionych hipotez nie wyjaśnia wszystkich zagadnień związanych z patogenezą chorób wątroby uwarunkowanych niedoborem A1AT. Podwyższone ryzyko chorób wątroby w rodzinach nosicieli allelu PiZ (oszacowane przez różnych autorów od 21% do 78%) oraz duże podobieństwo w intensywności objawów choroby obserwowane u rodzeństwa zdają się wskazywać na występowanie drugorzędowych czynników genetycznych (SCHWARZENBERG i SHARP 1990).

NIEDOBÓR A1AT A CHOROBY SKÓRY

Niedobór A1AT jest jednym z istotnych czynników w patogenezie niektórych chorób skóry o nie wyjaśnionej jeszcze etiologii, na przykład w łuszczycy i zapaleniu tkanki podskórnej (*panniculitis*). *Panniculitis* u nosicieli allelu Z występuje stosunkowo rzadko (dotychczas opisano zaledwie kilkanaście przypadków). U wszystkich chorych rozpoznano wrzodziejącą postać zapalenia skóry, którego bezpośrednią przyczyną był uraz mechaniczny. Rola niedoboru A1AT w rozwoju *panniculitis* nie jest znana. Wydaje się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowane zmiany wrzodziejące jest nadmierna aktywność proteaz uwalnianych przez obojętnochłonne granulocyty (BLEUMINK i KLARK-KE 1985).

Wśród chorych na łuszczycę Beckman i współpracownicy obserwowali znacznie wyższą częstość heterozygot MZ (12,5%) w porównaniu z grupą kontrolną (2,1%). Niedobory A1AT opisano także w innych chorobach skóry, takich jak: angioedema, pokrzywka, kontaktowe zapalenie skóry.

NIEDOBÓR A1AT A REUMATOIDALNE ZAPALENIE STAWÓW

Wyniki prac wielu autorów wskazują również na istnienie zależności pomiędzy występowaniem fenotypów związanych z niedoborem inhibitora proteaz w surowicy a reumatoidalnym zapaleniem stawów. Według badań ARNAUDA i współpracowników (1979) około 9% chorych na reumatoidalne zapalenie stawów stanowią nosiciele fenotypu PiMZ.

UDZIAŁ NIEDOBORU A1AT W PATOGENEZIE INNYCH CHOROÓB

Niektóre rzadkie choroby oczu, na przykład siatkówkowe zapalenie naczyń (*retinal vasculitis*) i zapalenie jagodówki (*uveitis anterior*) wydają się występować w powiązaniu z niedoborem A1AT. Wskazują na to obserwacje Brewertona i współpracowników (PIŁACIK 1991), którzy w 80-osobowej grupie chorych z zapaleniem jagodówki stwierdzili wysoki, bo aż 28%, udział fenotypów MZ.

Większość osób z niedoborem A1AT zapada na przewlekłe zapalenia nerek. U niektórych chorych obserwuje się złogi A1AT w kłębkach nerkowych (PIŁACIK 1991).

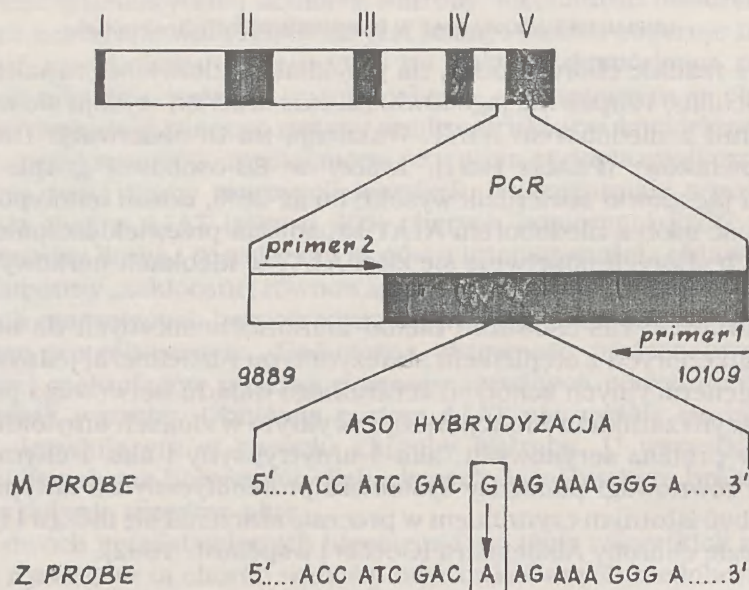
Ostatnio dzięki zastosowaniu metod immunochemicznych do badań skrawków mózgu chorych z otępieniem starczym typu Alzheimer, jednym z najczęstszych degeneracyjnych schorzeń centralnego układu nerwowego połączonych z postępującym zanikiem funkcji mózgu, wykryto w złogach amyloidu obecność inhibitorów proteaz serynowych: alfa-1-antytrypsyny i alfa-1-chymotrypsyny. Zakłócenie równowagi pomiędzy systemem proteolitycznym i antyproteolitycznym może być istotnym czynnikiem w procesie starzenia się mózgu i tym samym w patogenezie choroby Alzheimer (GOLLIN i współaut. 1992).

DIAGNOSTYKA NIEDOBORU ALFA-1-ANTYTRYPsyny, MOŻLIWOŚCI TERAPII

System diagnostyczny pozwalający na wykrywanie osób obciążonych niedoborem A1AT o podłożu genetycznym polega na trójstopniowym postępowaniu. Pierwszym etapem jest ilościowe oznaczenie A1AT w osoczu krwi metodami immunologicznymi lub pomiarem aktywności antyproteolitycznej surowicy krwi. Drugi etap postępowania diagnostycznego polega na określeniu fenotypu A1AT metodą izoelektroogniskowania białek surowicy krwi w żelach agarozowych lub poliakryloamidowych z gradientem pH od 4 do 6. Trzeci etap obejmuje analizę DNA genu alfa-1-antytrypsyny (PIŁACIK 1991).

W 1983 roku KIDD i współpracownicy przedstawili po raz pierwszy metodę detekcji mutacji Z w genie *A1AT* z wykorzystaniem 19-nukleotydowych sond do hybrydyzacji z genomowym DNA z limfocytów krwi obwodowej osób o różnych fenotypach A1AT: PiMM, PiMZ, PiZZ. W 1986 roku HEJTMANCIK i współpracownicy oraz Cox i współpracownicy przeprowadzili diagnostykę prenatalną niedoboru A1AT w oparciu o silną korelację pomiędzy allelem PiZ a polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), występującym w wyniku trawienia DNA endonukleazą Ava II. W 1987 roku Cox i współpracownicy wykorzystali do diagnostyki prenatalnej RFLP sprzężony w około 77% z allelem PiZ, będący wynikiem mutacji Val²¹³ (GTG) Ala²¹³ (GCG) w eksonie III genu *A1AT* (rys. 4). Tranzycja T → C w kodonie 213 występuje z powodu utraty sekwencji rozpoznawanej przez endonukleazy: MaeIII i BstEII.

Istotny postęp w diagnostyce niedoboru A1AT nastąpił dzięki zastosowaniu reakcji enzymatycznej amplifikacji DNA *in vitro* (PCR: polymerase chain reaction). Metoda PCR opisana przez SAIKIEGO i współpracowników w 1985 roku pozwala uzyskiwać ponad dwieście tysięcy kopii wybranego fragmentu genomu z pominięciem żmudnej procedury tworzenia bibliotek genomowych i klonowania. Efektywność hybrydyzacji sond oligonukleotydowych z produktami PCR jest



M PROBE



MZ MZ MM ZZ MZ MZ



Z PROBE

Ryc. 5. A. Schemat PCR fragmentu V eksonu genu alfa-1-antytrypsyny zawierającego mutację Z. B. Hybrydyzacja produktów PCR osób o genotypach: PiMM, PiMZ, PiZZ z sondami oligonukleotydowymi komplementarnymi do fragmentu prawidłowego (M probe) i zmutowanego (Z probe) genu *AIAT*.

znacznie wyższa aniżeli z genomowym DNA (rys. 5). Ułatwiona jest analiza RFLP, którą można przeprowadzić metodą rozdziału elektroforetycznego produktów PCR trawionych określoną restryktazą w żelu agarozowym, bez procedury hybrydyzacji z sondami plazmidowymi, stosowanej w tradycyjnym badaniu RFLP według Southerna. Metoda enzymatycznej amplifikacji DNA umożliwia także bezpośrednie sekwencjonowanie DNA uzyskanych produktów PCR (KOWALSKA i współaut. 1991).

Spośród stanów patologicznych, wywołanych niedoborem A1AT, postępowaniem leczniczym mającym na celu przywrócenie prawidłowego poziomu A1AT objęto dotychczas rozedmnę płuc (dożylnie podawanie preparatów A1AT uzyskanych z ludzkiego osocza) oraz choroby wątroby (transplantacja wątroby). W toku są poszukiwania nowych rozwiązań, zwłaszcza w zakresie terapii genowej z wykorzystaniem metod biologii molekularnej.

DEFICIENCY OF ALPHA-1-ANTITRYPsin

Summary

Alpha-1-antitrypsin (A1AT), a glycoprotein of relative molecular mass 55 kDa, is a member of the superfamily of serine proteinase inhibitors, the serpins. Its major physiological substrate is elastase, particularly in the lower respiratory tract. A1AT gene (Pi locus), located on chromosome 14 at 14q 32.1, is tissue-specific, expressed in hepatocytes and macrophages. A1AT shows considerable genetic variability, having more than 75 variants, the majority of which correspond to, quantitatively and qualitatively, normal A1AT. PiZZ allele is the most common deficiency variant. In PiZZ homozygotes A1AT concentration corresponds to only 10-15% of normal values. The deficiency of A1AT results in a protease/protease inhibitor imbalance predisposing to a development of many diseases: lung emphysema, liver cirrhosis, psoriasis, rheumatoid arthritis.

LITERATURA

- ARNAUD P., GALBRAITH R. M., FAULK W. P. i inni, 1979. *Alpha-1-antitrypsin in adult rheumatoid arthritis*. Lancet, 1, 1236-7.
- BECKMAN G., BECKMAN L., LIDEN S., 1980. *Association between psoriasis and the α_1 -antitrypsin deficiency gene*. Z. Acta Derm. Venerol (Stockh), 60, 163-164.
- BLEUMINK E., KLOKKE A. H., 1985. *Relationship between Weber-Christian Panniculitis and the ZZ phenotype of alpha-1-antitrypsin*. Arch. Dermatol. Res., 277, 328-329.
- BRANTLY M., NUKIWA T., CRYSTAL R. G., 1988. *Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency*. Amer. J. Med., 84, supp. 6A, 13-31.
- BRANTLY M., WITTES J. T., VOGELMEIER C. F. i inni, 1991. *Use of a highly purified α_1 antitrypsin standard to establish ranges of the common normal and deficient α_1 -antitrypsin phenotypes*. Chest, 100, 703-708.
- CARRELL R. W., AULAK K. S., OWEN M. C., 1989. *The Molecular Pathology of the serpins*. Mol. Biol. Med., 6, 35-42.
- CARRELL R. W., JEPSSON J. O., LAURELL C. B. i inni, 1982. *Structure and variation of human α_1 -antitrypsin*. Nature, 298, 298, 329-334.
- COX D. W., BILLINGSLEY G. D., 1986. *Restriction enzyme Mae III for prenatal diagnosis of alpha-1-antitrypsin deficiency*. Lancet ii, 741-742.
- COX D. W., MANSFIELD T., 1987. *Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency and estimates of fetal risk for disease*. J. Med. Genet., 24, 52-59.
- CRYSTAL R. G., 1989. *The α_1 -antitrypsin gene and its deficiency states*. Trends in Genetics, 5, 411-417.
- CRYSTAL R. G., BRANTLY M. L., HUBBARD R. C. i inni, 1989. *The alpha-1-antitrypsin gene and its mutations. Clinical consequences and strategies for therapy*. Chest, 95, 196-208.

- ERIKSSON S., CARLSON J., VELEZ R. 1 inni, 1986. *Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha-1-antitrypsin deficiency*. New Eng. J. of Med., 314, 736-739.
- GOLLIN P. A., KALARIA R. N., EIKELENBOOM P. 1 inni, 1992. *α -1-antitrypsin and α -1-antichymotrypsin are in the lesions of Alzheimer's disease*. NeuroReport, 3, 201-203.
- HEJTMANCIK J. F., WARD P. A., MANSFIELD T. 1 inni, 1986. *Prenatal diagnosis of α -1-antitrypsin deficiency by restriction fragment length polymorphism, and comparison with oligonucleotide probe analysis*. Lancet ii, 767-770.
- HODGES J. R., MILLWARD-SADLER G. H., BARBATSIS C. 1 inni, 1981. *Heterozygous MZ alpha-1-antitrypsin deficiency in adults with chronic active hepatitis and cryptogenic cirrhosis*. New Eng. J. of Med., 304, 557-560.
- JANOFF A., 1985. *Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis*. Am. Rev. Respir. Dis., 132, 417-433.
- KALSHAKER N., MORGAN K., 1990. *The α -1-antitrypsin and chronic lung disease*. Thorax, 45, 759-764.
- KIDD V. J., WALLACE R. B., IKUTATA K., 1 inni, 1983. *α -1-antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene*. Nature, 304, 230-234.
- KLASIN E. C., BIEMOND I., LAROS C. D., 1986. *α -1-antitrypsin deficiency and the flaccid lung syndrome. The heterozygote controversy*. Clin. Genet., 29, 211-215.
- KOWALSKA A., 1993. *Polimorfizm genu α -1-antytrypsyny (locus Pi- inhibitora proteaz)*. Postępy Biochemii, 39, 236-242.
- KOWALSKA A., TITENKO N. V., RUJNER J., 1991. *Genetic polymorphism of alpha-1-antitrypsin (Pi locus) in Polish population determined by isoelectric focusing*. Bull. Pol. Acad. Sc., Biol. Sciences, 39, 247-250.
- KOWALSKA A., SCHWARTZMAN A. L., RUJNER J. 1 inni, 1991. *In vitro amplification of alpha-1-antitrypsin gene for detection of Z mutation*. Bull. Pol. Acad. Sc., Biol. Sciences, 39, 251-256.
- LAURELL C. B., ERIKSSON S., 1963. *The electrophoretic α -1-globulin pattern of serum in α -1 antitrypsin deficiency*. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15, 132-140.
- PATTERSON S. D., 1991. *Mammalian α -1-antitrypsins: comparative biochemistry and genetics of the major plasma serpin*. Comp. Biochem. Physiol., 100B 439-454.
- PILACIK B., 1988. *Rzadkie fenotypy α -1-antytrypsyny w populacji polskiej i problemy związane z ich wykrywaniem*. Pol. Tyg. Lek., XLIII, 814-817.
- PILACIK B., 1991. *Alfa-1-antytrypsyna i jej rola w patologii*. Instytut Medycyny Pracy, Łódź.
- POVEY S., 1990. *Genetics of α -1-antitrypsin deficiency in relation to neonatal liver disease*. Mol. Biol. Med., 7, 161-172.
- RUJNER J., ROSIKIEWICZ E., MIKULSKA B. 1 inni, 1986. *α -1-antytrypsyna w surowicy u dzieci z przewlekłymi chorobami wątroby*. Ped. Pol., LXI, 698-701.
- RUJNER J., 1986. *Alfa-1-globulina jako próba przesiewowa do wrodzonego niedoboru α -1-antytrypsyny*. Pol. Tyg. Lek., XLIII, 811-813.
- SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA 1 inni, 1985. *Enzymatic amplification of genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 230, 1350-1354.
- SCHWARZENBERG S. J., SHARP H. L., 1990. *Pathogenesis of α -1-antitrypsin deficiency-associated liver disease*. J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 10, 5-12.
- SHARP H. L., BRIDGES R. A., KRIVIT W. 1 inni, 1969. *Cirrhosis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency: A previously unrecognized inherited disorder*. J. Lab. Clin. Med., 73, 934-939.
- SVEGER T., 1976. *Liver disease in alpha-1-antitrypsin deficiency detected by screening of 200 000 infants*. New J. of Med., 294, 24, 1316-1321.
- TITENKO-HOLLAND N. V., KOWALSKA A., 1992. *Alpha-1-antitrypsin (Pi) subtypes in Russians and Poles*. Hum. Hered., 42, 384-386.

MAŁGORZATA JUNGHERMAN

*Zakład Genetyki Człowieka PAN
Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań*

CUKRZYCA INSULINOZALEŻNA — SKOMPLIKOWANY PRZYKŁAD CHOROBY UWARUNKOWANEJ WIELOCZYNNIKOWO

WPROWADZENIE

Cukrzyca typu I (insulinozależna) jest chorobą autoimmunologiczną, w której organizm chorego nie wydziela insuliny na skutek całkowitego lub prawie całkowitego wyniszczenia komórek β wysp Langerhansa trzustki. Uważa się, iż autodestrukcyjny proces immunologiczny jest inicjowany przez określone czynniki środowiska u osób charakteryzujących się szczególną, uwarunkowaną genetycznie podatnością (LESLIE i współaut. 1989). Proces chorobowy przebiega powoli, pewne zmiany immunologiczne i metaboliczne występują wiele miesięcy a nawet lat przed klinicznym ujawnieniem się cukrzycy. W chwili rozpoznania choroby około 80% wysp Langerhansa jest pozbawionych komórek β , obserwuje się także silne naciekanie wysp przez limfocyty (FOULIS i współaut. 1987). W połowie lat 70-tych odkryto zwiększoną częstość pewnych antygenów HLA (ang. human leukocyte antigens — antygeny zgodności tkankowej) wśród niespokrewnionych ze sobą chorych na cukrzycę typu I w porównaniu z populacją osób zdrowych oraz zwiększoną częstość występowania identycznych haplotypów HLA u chorego rodzeństwa. Pozwoliło to wyodrębnić podstawową różnicę pomiędzy cukrzycą insulinozależną (IDDM — insulin-dependent diabetes mellitus) a insulinoniezależną (NIDDM — non-insulin-dependent diabetes mellitus), w której geny HLA nie odgrywają istotnej roli oraz zidentyfikować region HLA w krótkim ramieniu chromosomu 6 (6p) jako miejsce lokalizacji genów warunkujących podatność na cukrzycę typu I. Tak więc już około dwudziestu lat temu genetykom udało się ujawnić jeden z podstawowych faktów dotyczących dziedziczenia jednej z najczęstszych chorób wieloczynnikowych występujących u ludzi. Od tego wszakże czasu jesteśmy świadkami niesłuchanie trudnego i powolnego wydzierania naturze tajemnic dotyczących genetyki tej choroby. W oczywisty sposób nasuwają się pytania: które spośród genów leżących w regionie HLA faktycznie warunkują podatność na cukrzycę, ile ich jest i w jaki sposób się dziedziczą (recesywnie? dominująco)? Czy istnieją także geny podatności poza układem HLA; jeśli tak, to jakie, ile ich jest, gdzie są zlokalizowane, jak się dziedziczą i jakie są zależności między nimi a genami HLA? Jakie czynniki niegenetyczne (środowiskowe) predysponują do zachorowania na cukrzycę

i w jaki sposób oddziałują one z czynnikami genetycznymi? Jak dotąd odpowiedzi na te pytania pozostają bardzo niejasne.

METODY BADAWCZE STOSOWANE W GENETYCE CHORÓB WIELOCZYNNIKOWYCH

Podstawową metodą stosowaną w genetyce chorób uwarunkowanych wielogenowo jest poszukiwanie asocjacji w populacjach. Polega ono na identyfikowaniu genów polimorficznych i porównywaniu ich częstości w populacjach pacjentów i osób zdrowych (analiza asocjacji — association analysis). Stwierdzenie statystycznie istotnej asocjacji z występowaniem choroby dowodzi bezpośredniego zaangażowania przyczynowego danego genu, bądź też sprzężenia allelu markerowego z innym, leżącym w bezpośredniej bliskości, locus warunkującym podatność na daną chorobę. Niezwykle jest ważne dokładne dobranie populacji kontrolnej zgodnej etnicznie z badaną populacją osób chorych. Występowanie ukrytego rozwarstwienia populacji może spowodować fałszywe wykrycie asocjacji, jeśli częstość alleli markerowych lub częstość zachorowań w poszczególnych warstwach populacji jest różna.

W genetyce chorób wieloczynnikowych stosuje się również badania rodzinne. Tak zwana analiza sprzężeń (ang. linkage analysis) pozwala oszacować odległość genetyczną pomiędzy locus podatności na zachorowanie a locus markerowym na podstawie równoczesnego dziedziczenia choroby i markera w rodzinach. W tym przypadku rekombinacja występuje rzadziej niż w populacji ogólnej, co umożliwia wykrycie sprzężenia bardziej odległych od siebie loci, niż w przypadku analizy asocjacji. Klasyczna analiza sprzężeń wymaga znajomości sposobu dziedziczenia choroby (dziedziczenie dominujące, czy recesywne) i penetracji. Stosowane obecnie programy komputerowe umożliwiają testowanie wielu modeli dziedziczenia równocześnie (HYER i współaut. 1991).

Alternatywą dla klasycznej analizy sprzężeń jest metoda badania chorego rodzeństwa. W tym przypadku porównuje się częstość, z jaką u chorego rodzeństwa występują równocześnie 0, 1 lub 2 loci markerowe lub haplotypy rodzicielskie typu IBD (ang. identical by descent) z częstością, jaka występowałaby w przypadku pełnej niezależności markera i choroby. Wykazanie częstszej niż oczekiwana zgodności genetycznej u chorego rodzeństwa jest uważane za dowód sprzężenia locus podatności na daną chorobę z badanym markerem. Możliwość wykrycia tą metodą znaczących sprzężeń jest uzależniona od kilku czynników. Należą do nich: udział procentowy danego locus podatności w tworzenie ogólnej podatności genetycznej na zachorowanie; dostępność informatywnych markerów genetycznych; występowanie heterogenności genetycznej i fenokopii. Ostatnie dwa problemy rozwiązuje analizowanie odpowiednio dużej liczby rodowodów. Dodatkowa trudność analizowania chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo wynika ze stosunkowo rzadkiego występowania rodzin z co najmniej dwójkiem chorych dzieci (ang. multiplex families). Trudność tę pozwala częściowo przezwyciężyć zastosowanie modeli zwierzęcych chorób wieloczynnikowych człowieka, jak na przykład tak zwanej myszy NOD (ang. non-obese diabetic mouse) w przypadku badań nad cukrzycą typu I.

ASOCJACJA CUKRZYCY TYPU I Z GENAMI UKŁADU HLA

Uważa się, że 60% do 70% podatności genetycznej na cukrzycę typu I jest kodowana w obrębie genów układu HLA, a o pozostałych 30% do 40% decydują geny spoza tego układu. Szczególnie istotne w cukrzycy są antygeny HLA klasy II, kodowane przez loci DR, DQ i DP, z których każde jest podzielone dodatkowo na loci A i B. Loci A i B kodują odpowiednio łańcuchy α i β cząsteczek klasy II. Cząsteczki te są obecne na powierzchni komórek prezentujących antygen, takich jak makrofagi, limfocyty B i aktywowane limfocyty T. Wiążą one obcy (lub własny) antygen i prezentują go limfocytom T CD4+, które w przypadku cukrzycy typu I inicjują zniszczenie komórek β trzustki. Geny klasy II charakteryzują się wysokim polimorfizmem, czego wynikiem jest duża zmienność cząsteczek klasy II występujących u różnych osób. Dokładne mapowanie genów podatności na cukrzycę typu I w obrębie układu HLA jest utrudnione przez silne sprzężenia (ang. linkage disequilibrium) występujące pomiędzy poszczególnymi genami tego układu. Wczesne badania serologiczne wykazały pozytywną asocjację antygenów klasy I B8 i B15 z cukrzycą insulinozależną (SIGNAL i BLAJCHMAN 1973, NERUP i współaut. 1974). Silniejszą asocjację stwierdzono później z genami *drb1* kodującymi antygeny klasy II DR3 i DR4 (WOLF i współaut. 1983), które wykazują sprzężenie odpowiednio z B8 i B15. DR3 i DR4 wywierają efekt synergiczny na predyspozycję na zachorowanie w obrębie rasy kaukaskiej (WOLF i współaut. 1983). U 95% osób chorych na cukrzycę typu I występuje antygen DR3 lub DR4, bądź też oba równocześnie. Ponieważ jednak te same antygeny są spotykane również aż u 60% osób zdrowych, nie można uważać ich za pierwotny czynnik decydujący o zachorowaniu. Obecnie uważa się, że podatność na cukrzycę jest raczej zasocjowana z antygenami HLA-DQ. Stwierdzono na przykład, że u 90% chorych na cukrzycę typu I rasy kaukaskiej posiadających antygen DR4, występuje allel DQB1*0302, a u zaledwie 10% — DQB1*0301; podczas gdy oba te allele są w przybliżeniu jednakowo często spotykane u osób zdrowych DR4-pozytywnych (NEPOM i współaut. 1986). Podobną zależność stwierdzono badając populację ludzką w północnych Indiach (FLETCHER i współaut. 1988), natomiast nie odnaleziono jej w populacjach południowych Chin i Japonii (JACOBS i współaut. 1992). Dwa allele DQB1, to znaczy DQB1*0602 i DQB1*0603 są z kolei negatywnie zasocjowane z cukrzycą w obrębie rasy kaukaskiej (KHALIL i współaut. 1990), u czarnych (MIJOVIC i współaut. 1991) oraz w innych badanych do tej pory populacjach i mogą być w związku z tym uważane za kodujące odporność na zachorowanie. Badania sekwencji alleli DQB wykazały, że allele negatywnie zasocjowane z cukrzycą kodują kwas asparaginowy w pozycji 57 (Asp57) łańcucha β cząsteczki HLA-DQ. Na podstawie analizy modeli przestrzennych tej cząsteczki stwierdzono, że wymieniona reszta aminokwasowa wchodzi w skład kieszonki wiążącej antygen, utworzonej przez strukturę czwartorzędową łańcuchów α i β cząsteczki DQ. Sugerowano, że reszta aminokwasowa w pozycji 57 może wywierać bezpośredni wpływ na zachorowanie na cukrzycę poprzez odpowiednią modyfikację usytuowania przestrzennego prezentowanego antygeny (TODD i współaut. 1987), jednakże nie we wszystkich haplotypach HLA-DQ.

zasocjowanych pozytywnie lub negatywnie z podatnością na cukrzycę, reguła Asp57 znajduje swoje odzwierciedlenie. Przypuszcza się więc, że również łańcuch α antygeny DQ może mieć istotne znaczenie. Stwierdzono, że allele DQA1 zasocjowane z cukrzycą kodują w pozycji 52 produktu białkowego arginę. Stąd wynikał postulat, że podatność na zachorowanie jest związana z ekspresją cząsteczki DQ o dwóch cechach: występowania reszty Arg52 w łańcuchu α oraz braku reszty Asp57 w łańcuchu β (KHALIL i współaut. 1990). Znów jednak dane z innych ras niż kaukaska nie potwierdzają tej hipotezy. Podsumowując, najbardziej „stałymi” asocjacjami z podatnością na cukrzycę typu I w większości badanych populacji w obrębie genów HLA są: pozytywna asocjacja z DQA1*0301 oraz negatywna z DQB1*0602 i DQB1*0603. Wciąż nie jesteśmy pewni, czy allele te są bezpośrednio związane z zachorowaniem, czy też pozostają w sprzężeniu z nie poznanymi jeszcze innymi genami podatności.

ASOCJACJA CUKRZYCY TYPU I Z GENAMI SPOZA UKŁADU HLA

Pośród genów spoza układu HLA szczególnie interesujące w cukrzycy insulinozależnej wydają się być: region INS kodujący insulinę, region kodujący podjednostkę β receptora na limfocytach T oraz regiony kodujące łańcuchy lekkie i ciężkie immunoglobulin (odpowiednio Km i Gm).

Proces autoimmunologiczny prowadzący do wystąpienia objawów cukrzycy typu I dotyczy specyficznie produkujących insulinę komórek trzustki, stąd wszelkie anomalie syntezy i wydzielania insuliny wydają się być jednym z czynników etiologicznych, które mogą spowodować zachorowanie. Co za tym idzie, gen kodujący insulinę (*INS*) jest jednym z potencjalnych kandydatów warunkujących podatność na cukrzycę. W pobliżu genu *INS* w krótkim ramieniu chromosomu 11 (11p15.5), w kierunku 5' od miejsca startu transkrypcji, występuje region polimorficzny złożony z tandem owych powtórzeń kilkunastonukleotydowej jednostki. U przedstawicieli rasy kaukaskiej zmienna liczba powtórzeń w tym regionie umożliwia wyodrębnienie dwóch klas alleli: małych alleli klasy I (około 40 powtórzeń) i dużych alleli klasy III (około 170 powtórzeń). Niemal wszystkie przeprowadzone do tej pory badania populacyjne wykazały zwiększoną częstość alleli klasy I u chorych na cukrzycę w porównaniu ze zdrowymi (TODD 1990). Badania sprzężeń w rodzinach nie potwierdziły jednak tego odkrycia (TUOMILEHTO -WOLF i współaut. 1989). Ta niezgodność rezultatów badania asocjacji i sprzężenia pozostawała długi czas nie wyjaśniona. Może ona być wynikiem wysokiej częstości w populacji ogólnej alleli zasocjowanych z chorobą. Sugeruje się także, iż nieznaczny w porównaniu z genami układu HLA wpływ innych genów na podatność na cukrzycę może być łatwiejszy do wykrycia poprzez badanie asocjacji niż sprzężeń.

Limfocyty T rozpoznają antygen jedynie wtedy, gdy ten występuje w połączeniu z cząsteczką HLA na powierzchni komórki prezentującej antygen. W rozpoznaniu uczestniczy receptor na limfocytach T (TCR — ang. T-cell receptor) — heterodimeryczna cząsteczka złożona z łańcuchów α i β posiadających zarówno regiony stałe, jak i zmienne. Przypuszcza się, że geny kodujące TCR mogą być związane z podatnością na cukrzycę. Badania polimorficznych markerów stałej

części podjednostki TCR α nie wykazały jednak asocjacji ani sprzężenia tych markerów z cukrzycą. Analogiczne badania części stałej TCR β wykazały znacznie częstszą heterozygotyczność pacjentów, niż osób zdrowych pod względem markerów w tym regionie (MILLWARD i współaut. 1987). Nowsze doświadczenia z zastosowaniem analizy sprzężeń i większych populacji nie potwierdziły jednak tej wcześniejszej obserwacji (FIELD i współaut. 1991).

Wczesne doniesienia na temat zwiększonej częstości allotypu Km(1) u chorych na cukrzycę, posiadających antygen DR4, nie zostały potwierdzone. Również negatywne rezultaty uzyskano badając bezpośrednią asocjację i sprzężenie regionu Gm z cukrzycą (FIELD i współaut. 1984, RICH i współaut. 1986). Niedawno zaproponowano, iż geny kodujące allotypy Gm lub geny sprzężone z nimi mogą przyczyniać się do zachorowania na cukrzycę poprzez oddziaływanie z HLA, TCR β i INS (FIELD i współaut. 1991). Hipoteza ta opiera się o dane pochodzące w większości ze stosunkowo małych populacji. Jej potwierdzenie na podstawie badania większej liczby osób odzwierciedlałoby ogromną złożoność oddziaływania wielu genów odpowiedzialnych za wystąpienie podatności na cukrzycę typu I.

CZYNNIKI NIEGENETYCZNE PREDYSPONUJĄCE DO ZACHOROWANIA NA CUKRZYCĘ INSULINOZALEŻNĄ

U bliźniąt monozygotycznych zgodność zachorowania na cukrzycę typu I wynosi 30%–40%, w przypadku innego typu rodzeństwa — średnio 6%. Liczby te dowodzą istotnego zaangażowania czynników niegenetycznych w zainicjowaniu serii wydarzeń w organizmie doprowadzających do wystąpienia objawów cukrzycy. Niestety, niewiele posiadamy obecnie konkretnych informacji dotyczących precyzyjnej identyfikacji tych czynników i sposobu ich oddziaływania. Zwraca się głównie uwagę na domniemaną rolę infekcji wirusowych i ekspozycji na pewne toksyny. Przypuszcza się, że zewnętrzny czynnik inicjujący proces chorobowy działa na organizm na przestrzeni krótkiego czasu we wczesnym dzieciństwie; chociaż ekspozycja niekoniecznie musi doprowadzić do zachorowania na cukrzycę, nawet w przypadku, gdy pewne zmiany metaboliczne i immunologiczne zostaną zaindukowane. Spośród toksyn udokumentowano znaczenie alloksanu, streptozotocyny i innych związków o podobnej budowie w indukcji cukrzycy u zwierząt eksperymentalnych (WILSON i współaut. 1989). Sposób oddziaływania różnego rodzaju toksyn inicjujących cukrzycę u człowieka i zwierząt doświadczalnych może polegać na:

1. bezpośredniemu uszkodzeniu komórek β trzustki poprzez tworzenie wolnych rodników tlenowych;
2. uszkodzaniu DNA i w konsekwencji zwiększeniu aktywności syntetazy poli-ADP rybozy — enzymu zużywającego NAD w komórkach β ;
3. zahamowaniu aktywnego transportu wapnia i działania aktywowanych przez kalmodulinę kinaz białkowych.

Toksyny mogłyby także wywoływać niszczenie komórek β w sposób pośredni, na przykład indukując replikację endogennych wirusów lub reakcję immunologiczną przeciwko transformowanym komórkom. Eksperymentalnie udokumentowano sposób działania alloksanu i streptozotocyny, które po podaniu w dużym

stężeniu zwierzętom doświadczalnym wywoływały objawy cukrzycy poprzez pozbawienie komórek β puli NAD (WILSON i współaut. 1989). Streptozotocyna może przy przedłużonej ekspozycji uszkadzać genomowy DNA i indukować ekspresję retrowirusów w komórkach wysp trzustki (LIKE i ROSSINI 1976, APPEL i współaut. 1978). Częstki retrowirusów mogą z kolei inicjować odpowiedź immunologiczną, która teoretycznie może doprowadzić do zniszczenia komórek gospodarza (SUENAGA i YOON 1988).

Same infekcje wirusowe wywołują prawdopodobnie zachorowanie na cukrzycę na drodze jednego z trzech mechanizmów:

1. infekcja wirusowa może inicjować odpowiedź immunologiczną lub autoimmunologiczną niszczącą komórki β ;
2. przewlekła infekcja samych komórek β może powodować upośledzenie ich funkcji nie wywołując równoczesnej lizy komórek;
3. następuje gwałtowne zniszczenie komórek β na drodze lizy.

Przykładowo, jest znany udział infekcji wirusem różyczki lub wirusem Coxsackie B w zachorowaniu na cukrzycę.

Precyzyjne określenie, na ile oddziaływanie czynników środowiska jest ważne dla zachorowania na cukrzycę insulinozależną, jest jednak trudne. Niektórzy autorzy przypisują czynnikom zewnętrznym główną rolę, pozostawiając sprawę genetycznego uwarunkowania tej choroby na dalszym planie. Szereg faktów przemawia jednak za tym, iż wpływ obu grup czynników jest co najmniej równocenny i do zachorowania nie dochodzi bez istnienia określonej predyspozycji genetycznej. Dla przykładu, porównanie markerów w układzie HLA w grupie chorych wykazujących obecność przeciwciał przeciwko wirusowi Coxsackie B i w grupie chorych bez tych przeciwciał nie doprowadziło do wykrycia istotnych różnic (FIELD i MCARTHUR 1987). Być może więc wirusy predysponują do zachorowania na cukrzycę w sposób niespecyficzny, może katalizują tylko proces chorobowy nie będąc czynnikiem niezbędnym do zachorowania? Sugeruje się nawet, iż wysoka (60%–80%) niezgodność w zachorowaniu bliźniąt monozygotycznych, która jest głównym argumentem na rzecz istotnej roli czynników środowiska, nie wynika z braku krytycznego czynnika zewnętrznego inicjującego zachorowanie, lecz raczej z przegrupowania genów podczas rozwoju osobniczego, które powoduje, że systemy immunologiczne „identycznych” bliźniąt w rzeczywistości identycznymi nie są (EISENBARTH 1986, TODD i współaut. 1988). Albo też infekcja wirusowa jest mimo wszystko czynnikiem niezbędnym dla wystąpienia cukrzycy, ale zachodzi na tyle wcześnie (np. kilka lat przed pojawieniem się objawów klinicznych), że jej rola jest trudna do udokumentowania. Przy obecnym stanie wiedzy trudno jest jednoznacznie rozwiązać powyższe wątpliwości.

PODSUMOWANIE

Wyjaśnienie genetyki molekularnej złożonej choroby wieloczynnikowej jest niezmiernie trudne. Cukrzyca typu I jest przykładem takiej choroby. Jej podłoże genetyczne do dziś pozostaje niejasne, mimo zaangażowania wielu sił i środków w laboratoriach na całym świecie w celu rozwikłania zagadek dziedziczenia podatności na tę chorobę. Stosunkowo wcześnie w toku badań nad cukrzycą

udało się ujawnić zaangażowanie genów układu HLA. Aby jednak w pełni potwierdzić rolę określonych alleli, należałoby dokonać identyfikacji produktów białkowych genów i udokumentować ich udział w procesach doprowadzających do zniszczenia komórek β trzustki. To samo dotyczy genów spoza układu HLA, których znaczenie w cukrzycy wydaje się istotne.

Powyższe opracowanie z pewnością nie jest wyczerpującym opisem przedstawionych zagadnień. Celem autorki było przede wszystkim zwrócenie uwagi po pierwsze — na złożoność czynników doprowadzających do zachorowania na cukrzycę insulinozależną, a po drugie — na to, jak wielkie są wciąż luki w naszej wiedzy o nich. Niewątpliwie końcowym celem wszelkich badań dotyczących uwarunkowania podatności na cukrzycę — genetycznego i niegenetycznego — byłoby identyfikowanie w populacji ogólnej osób podatnych na zachorowanie i zapobieganie u nich rozwojowi choroby. I choć możemy obecnie z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć, kto wśród bliskich krewnych pacjentów z cukrzycą może sam w przyszłości zachorować, osiągnięcie tego ostatecznego celu wciąż jeszcze wymaga czasu.

INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS — AN EXAMPLE OF A COMPLICATED MULTIFACTORIAL DISORDER

Summary

Although we can now identify some non-diabetic individuals who later will develop clinical insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), our ability to predict with certainty IDDM is far from perfect. In this paper I discuss the status of knowledge regarding genetic and non-genetic factors predisposing an individual to develop type I diabetes. The role of HLA and non-HLA genes as well as viruses and toxins in initiating the processes leading to autoimmune destruction of pancreatic β -cells, has been presented. Since the discovery of involvement of HLA genes in susceptibility to the disease, further progress in our understanding of the genetics of this disorder has been surprisingly difficult to achieve. My aim was to reassure the reader that there still remain great gaps in our knowledge of IDDM — I do believe, however, that prediction and prevention of IDDM will become practical reality in the future.

LITERATURA

- APPEL M. C., ROSSINI A. A., WILLIAMS R. M., LIKE A. A., 1978. *Viral studies in streptozotocin-induced pancreatic insulinitis*. Diabetologia, 15, 327-336.
- EISENBARTH G. S., 1986. *Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease*. New Engl. J. Med., 314, 1360-1368.
- FIELD L. L., 1991. *Non-HLA region genes in insulin dependent diabetes mellitus*. Bailliere's Clin. Endocrinol. Metab., 5, 413-437.
- FIELD L. L., ANDERSON C. E., NEISWANGER K., HODGE S. E., SPENCE M. A., ROTTER J. I., 1984. *Interaction of HLA and immunoglobulin antigens in type I (insulin-dependent) diabetes*. Diabetologia, 27, 504-508.
- FIELD L. L., McARTHUR R. G., 1987. *The genetics of susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus — possible new markers*. Clin. Invest. Med., 10, 437-443.
- FIELD L. L., STEPHURE D. K., McARTHUR R. G., 1991. *Interaction between T cell receptor beta-chain and immunoglobulin heavy chain region genes in susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus*. Am. J. Hum. Genet., 49, 627-34.
- FLETCHER J., ODUGBESAN O., MIJOVIC C., MACKAY E., BRADWELL A. R., BARNETT A. H., 1988. *Class II HLA DNA polymorphisms in type I (insulin-dependent) diabetic patients of North Indian origin*. Diabetologia, 31, 343-350.

- FOULIS A. K., FARQUHARSON M. A., MEAGER A., 1987. Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells on Type 1 diabetes mellitus. *Lancet*, ii, 1423-1427.
- HYER R. N., JULIER C., BUCKLEY J. D., 1991. High resolution linkage mapping for susceptibility genes in human polygenic disease: insulin-dependent diabetes mellitus and chromosome 11q. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 243-257.
- JACOBS K. H., JENKINS D., MIJOVIC C. H., 1992. An investigation of Japanese subjects maps susceptibility to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus close to the DQA1 gene. *Hum. Immunol.*, 33, 53-57.
- KHALIL I., D'AURIOL L., GOBET M., 1990. A combination of HLA-DQB Asp57-negative and HLA-DQ Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 85, 1315-1319.
- LESLIE R. D. G., LAZARUS N., VERGANI D., 1989. Events leading to insulin-dependent diabetes. *Clin. Sci.*, 76, 119-124.
- LIKE A. A., ROSSINI A. A., 1976. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193, 415-417.
- MIJOVIC C. H., JENKINS D., JACOBS K. H., PENNY M. A., FLETCHER J., BARNETT A. H., 1991. HLA-DQA1 and DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population. *Diabetes*, 40, 748-753.
- MILLWARD B. A., WELSH K. I., LESLIE R. D. G., PYKE D. A., DEMAINE A. G., 1987. T cell receptor beta chain polymorphisms are associated with insulin-dependent diabetes. *Clin. Exp. Immunol.*, 70, 152-157.
- NEPOM B. S., PALMER J., KIM S. J., JANSEN J. A., HOLBECK S. L., NEPOM G. T., 1986. Specific genomic markers for the HLA-DQ subregion discriminate between DR4+ insulin-dependent diabetes mellitus and DR4+ seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, 164, 345-350.
- NERUP J., PLATZ P., ANDERSEN O. O., 1974. HLA antigens in diabetes mellitus. *Lancet*, ii, 864-866.
- RICH S. S., WEITKAMP L. R., GULTORMSEN S., BARBOSA J., 1986. Gm, Km and HLA in insulin-dependent type 1 diabetes mellitus. A log-linear analysis of association. *Diabetes*, 35, 927-932.
- SIGNAL D. P., BLAJCHMAN M. A., 1973. Histocompatibility (HLA) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue-specific antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*, 22, 429-432.
- SUENAGA K., YOON J. W., 1988. Association of beta cell specific expression of endogenous retrovirus with the development of insulinitis and diabetes in NOD mouse. *Diabetes*, 37, 1722-1726.
- TODD J. A., 1990. Genetic control of autoimmunity in type I diabetes. *Immunol. Today*, 11, 122-129.
- TODD J. A., BELL J. I., McDEVITT H. O., 1987. HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329, 599-604.
- TODD J. A., BELL J. I., McDEVITT H. O., 1988. A molecular basis for genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Genet.*, 4, 129-134.
- TUOMILEHTO-WOLF E., TUOMILEHTO J., CEPATIS Z., 1989. New susceptibility haplotype for type I diabetes. *Lancet*, ii, 299-302.
- WILSON G. L., HARTIG P. C., PATTON N. J., LEDOUX S. P., 1989. Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*, 37, 213-216.
- WOLF E., SPENCER K. M., CUDWORTH A. G., 1983. The genetic susceptibility to type I (insulin-dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia*, 24, 224-230.

RYSZARD SŁOMSKI^{1, 2, 3}, JOLANTA KWIATKOWSKA¹,
HANNA CHLEBOWSKA¹, BARBARA SIEMIENIAKO²,
MAGDALENA SŁOMSKA³

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

²Katedra Biochemii i Biotechnologii AR
Wołyńska 35, 60-637 Poznań

³Laboratorium Genetyki Molekularnej
Szeherazady 100, 60-195 Poznań

POLIMORFICZNE SEKWENCJE DNA I ICH ZASTOSOWANIE W DOCHODZENIU SPORNEGO OJCOSTWA

Diagnostyka molekularna należy do najbardziej dynamicznie rozwijających się działów biologii i medycyny. Najwcześniej, bo już w połowie lat 80-tych znalazła ona zastosowanie w genetyce człowieka. Złożyło się na to wiele czynników, przede wszystkim wprowadzenie sond molekularnych i enzymów restrykcyjnych, jak również nowych technik badawczych, takich jak: klonowanie DNA, blotting Southerna, sekwencjonowanie, znakowanie i detekcja DNA, PCR i synteza oligonukleotydów a także ogromne zapotrzebowanie na precyzyjne badania diagnostyczne rodzin z ryzykiem wystąpienia chorób genetycznych.

Wcześniejsze doniesienia z zakresu diagnostyki molekularnej były przedstawiane w artykułach autorów zamieszczonych w *Postęпах Biochemii* (JARUZELSKA i SŁOMSKI 1990, JUNGEMAN i SŁOMSKI 1990, SŁOMSKI i współaut. 1992, KWIATKOWSKA i SŁOMSKI 1992), *Biotechnologii* (SŁOMSKI i współaut. 1989, SŁOMSKI i współaut. 1993) i *Kosmosie* (JUNGEMAN i SŁOMSKI 1987). Obecnie w diagnostyce molekularnej można wyróżnić kierunki badań rutynowych oraz wskazać perspektywę jej dalszego rozwoju w biologii i medycynie.

Do doskonałym przykładem postępu diagnostyki molekularnej i jej wykorzystania w praktyce jest dochodzenie spornego ojcostwa. W 1985 roku JEFFREYS i współpracownicy (1985a, b) donieśli o nowej metodzie identyfikacji indywidualnej opartej o zjawisko polimorfizmu DNA. Metoda Jeffreys'a znalazła natychmiastowe zastosowanie w praktyce i pod nazwą DNA fingerprinting jest obecnie szeroko stosowana w diagnostyce molekularnej (tab. 1). Potrzeba określenia ojcostwa występuje nie tylko w sprawach sądowych o ustalenie spornego ojcostwa, lecz również niezbędna jest dla potrzeb medycznych w poradnictwie

genetycznym, diagnostyce prenatalnej i transplantologii. Badania DNA fingerprinting są wykonywane rutynowo w ponad 30 krajach. W USA wykonuje się rocznie ponad 100 tysięcy tych testów i liczba ta wykazuje tendencję wzrostową. W Polsce ten rodzaj analizy DNA został wdrożony przez SŁOMSKIEGO i współpracowników w 1987 roku i analiza jest obecnie wykonywana rutynowo w placówkach we Wrocławiu, Lublinie i Poznaniu. W badaniach wykorzystuje się polimorfizm sekwencji powtórzonych w DNA.

Tabela 1

Wdrożenie do badań rutynowych analizy polimorfizmu DNA

1985	w marcu A. Jeffreys opisał technikę DNA fingerprinting
1985	w kwietniu dopuszczono dowód z analizy DNA w postępowaniu imigracyjnym
1985	w Wielkiej Brytanii dopuszczono dowód z analizy DNA w dochodzeniu spornego ojcostwa
1986	w październiku w Wielkiej Brytanii dopuszczono dowód z analizy DNA w wykryciu sprawcy morderstwa
1987	wyniki analizy DNA dopuszczono do postępowania w sądach Wielkiej Brytanii i USA
1987	rozpoczęcie wykonywania badań DNA fingerprinting w Polsce
1988	zastosowanie analizy DNA w badaniach rodzinnych
1989	w USA ostra krytyka badań polimorfizmu DNA wykorzystywanych do orzeczeń sądowych
1990	Kongres USA zaakceptował badania typu DNA fingerprinting
1991	ostra krytyka oceny statystycznej badań polimorfizmu DNA
1992	Komitet Badań Naukowych USA uznaje badania DNA jako niezmiennie cenne przy identyfikacji indywidualnej
1993	rozpoczęcie rutynowego wykonywania badań polimorfizmu DNA w ponad 30 krajach

Sekwencje powtórzone, występujące w genomie człowieka, zalicza się do dwóch grup: grupa I obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, w których jednostki powtarzające się występują kolejno po sobie, natomiast grupa II obejmuje sekwencje tworzące małe tandemowe bloki zgrupowane lub rozproszone w genomie (VOGT 1990). Grupa I sekwencji powtórzonych jest reprezentowana przez sekwencje satelitarne DNA oraz rodziny sekwencji powtórzonych, natomiast do grupy II należą sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne.

SATELITARNY DNA

Sekwencje satelitarne są sekwencjami ułożonymi tandemowo obok siebie, w bloki złożone z kilku milionów krótkich motywów (BRITTEN i KOHNE 1968). Różnią się od całkowitego DNA podwyższoną zawartością par GC. Nazwa sekwencji satelitarne pojawiła się zanim wykazano, że składają się one z tandemowych powtórzeń. Nazwa wynikała z obserwacji wirowania preparatów DNA w gradien-

cie gęstości CsCl, gdzie sekwencje te tworzyły dodatkowe frakcje. DNA Eukaryota tworzy w czasie wirowania w gradiencie gęstości dwie lub nawet kilka frakcji w odróżnieniu od genomowego DNA Prokaryota tworzącego jedną frakcję. Liczba powtórzonych sekwencji i częstość ich występowania stanowią charakterystyczną cechę danego organizmu. Niektóre sekwencje powtórzone charakteryzują się taką samą zawartością nukleotydów GC, jak pozostały genomowy DNA. Ten typ sekwencji to tak zwane satelity kryptyczne, ponieważ frakcjonują się one razem z główną frakcją genomowego DNA. Termin satelitarny DNA jest stosowany obecnie do określenia sekwencji tandemowych występujących z częstością 103–107. Zwykle długość sekwencji powtórzonej dochodzi do 300 par zasad, czasami zdarzają się dłuższe. Według TAUTZA (1993) określenie satelitarny DNA oznacza sekwencje powtórzone 103–107 w każdym locus, z jednym lub dwoma loci na chromosomie dla danego typu jednostki powtórzonej, przy czym długość sekwencji powtórzonej wynosi od 2 do kilku tysięcy par zasad i są to sekwencje charakterystyczne dla heterochromatyny, a w szczególności dla regionów centromerowych.

SEKWENCJE MINISATELITARNE

Najbardziej polimorficzne sekwencje w genomie człowieka składają się z tandemowo powtarzających się sekwencji minisatelitarnych (NAKAMURA i współaut. 1987) i obecnie są szeroko stosowane w diagnostyce molekularnej. Termin sekwencje minisatelitarne został wprowadzony przez JEFFREYS'A i współpracowników (1985a) do oznaczania konserwatywnych sekwencji rdzeniowych, w wyizolowanym polimorficznym fragmencie sekwencji powtórzonych. Jak się potem okazało, sekwencja GGGNNGTGGGG występuje w wielu opisanych dotychczas sekwencjach charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń i jest komplementarna do sekwencji „chi” u *Escherichia coli*. Sekwencje rdzeniowe są odpowiedzialne prawdopodobnie za tworzenie minisatelitów i utrzymanie różnorodnej liczby powtarzanych jednostek w danym locus dzięki nierównemu crossing-over pomiędzy tandemowymi powtórzeniami. Minisatelity zostały wykryte równocześnie w wielu placówkach, gdzie jednocześnie wykazano ich polimorfizm (BELL i współaut. 1982). Jeffreys jako pierwszy wykazał, że sekwencje minisatelitarne należą do sekwencji występujących powszechnie w genomach, że są uorganizowane w powtarzające się jednostki i jako pierwszy zastosował w praktyce badawczej minisatelity, wprowadzając do badań technikę DNA fingerprinting (JEFFREYS i współaut. 1985b). Jeffreys zastosował sekwencje rdzeniowe opisanych minisatelitów w hybrydyzacji z DNA człowieka spodziewając się, że te sekwencje będą hybrydyzować z wieloma loci w genomie. Użyte sondy oznaczone numerami: 33.6 i 33.15, różniące się między sobą długością i niektórymi nukleotydami w sekwencji rdzeniowej, hybrydyzują z 17 loci genomowego DNA. Wartość diagnostyczną mają fragmenty wielkości od 3,5–20 tys. par zasad, pozostałe znacznie mniejsze nie dają czytelnego wyniku.

NAKAMURA i współpracownicy (1987) opisali dalsze loci sekwencji minisatelitarnych, wykazali polimorfizm powtarzających się jednostek, jak również zaproponowali dla nich nazwę VNTR (ang. variable number of tandem repeats) —

zmienna liczba tandemowych powtórzeń. Sekwencje minisatelitarne różnią się od sekwencji satelitarnych stopniem powtarzalności, długością jednostki powtarzającej, są bardziej rozproszone w genomie chociaż wykazują tendencje do grupowania się w regionach telomerowych, szczególnie w chromosomach człowieka (ROYLE i współaut. 1988). Charakterystyczną cechą sekwencji minisatelitarnych, według TAUTZA (1993) jest powtarzanie się określonych sekwencji rdzeniowych od 2 do kilkuset razy w pojedynczym locus. Prawdopodobnie w genomie człowieka występuje kilka tysięcy takich loci, przy czym różnią się jednostkami rdzeniowymi. Każdy element powtarzający się jest złożony z 9 do 100 par zasad. Obecnie sklonowano już wiele sekwencji minisatelitarnych, specyficznych dla danego locus. Nadal trwają poszukiwania nowych. Stosuje się w tym celu klony wykrywające zmienne powtórzenia i przeszukuje nimi biblioteki genomowego DNA (KNOWLTON i współaut. 1986). W tym hybrydyzuje się DNA z bibliotek z sondami oligonukleotydowymi o sekwencji odpowiadającej wcześniej opisanym sekwencjom VNTR (NAKAMURA i współaut. 1987, 1988) lub wkładowuje w bakteriofaga lambda fragmenty wyizolowane z mieszaniny fragmentów powtarzających, powstającej po trawieniu genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi z grupy często tnących, i hybrydyzuje z rdzeniami sekwencji powtórzonych. Opisane jako pierwsze tego typu sekwencje minisatelitarne należy wymienić koniec 5' genu insuliny (SMITH i współaut. 1990), gen mieliny (BOYLAN i współaut. 1987), region JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny (SILVA i współaut. 1987), koniec 3' genu CH ras (CAPON i współaut. 1983), gen alfa-globiny (HIGGS i współaut. 1986), gen kolagenu typ II (STOKER i współaut. 1985) i gen apolipoproteiny B (KNOTT i współaut. 1986). Najbardziej polimorficzny pojedynczy locus zawiera fragmenty wykrywane sondą MS1, którego allele są wielkości rzędu 1–23 tys. pz i prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzająca jest złożona z 9 pz i dotychczas opisano 2400 alleli dla tej sondy (WONG i współaut. 1987, SMITH i współaut. 1990b, JEFFREYS i współaut. 1991). Jeżeli jako sondy stosuje się tandemowe powtórzenia konserwatywnego motywu sekwencji minisatelitarnych, wówczas w hybrydyzacji Southerna otrzymuje się dla każdego osobnika jednocześnie wiele różnych fragmentów DNA; powstaje specyficzny dla osobnika „fingerprint”. Do takich sond należą między innymi wspomniane już wcześniej sondy 33.6 i 33.15.

SEKWENCJE MIKROSATELITARNE

W genomie *Eukaryota* występują powtórzenia mono-, di-, tri- i tetranukleotydowe. LITT i LUTY (1989) zaproponowali, aby te sekwencje w odróżnieniu od minisatelitów nazwać mikrosatelitami. W 1991 roku EDWARDS i współpracownicy wprowadzili dodatkowo określenie STR (ang. short tandem repeat) — krótkie powtórzenia tandemowe. Skrót STR jest również często stosowany do określenia syntetycznych powtórzeń tandemowych w technice DNA fingerprinting (VERGNAUD i współaut. 1991), dlatego w ostatnim okresie zalecany terminem są sekwencje mikrosatelitarne.

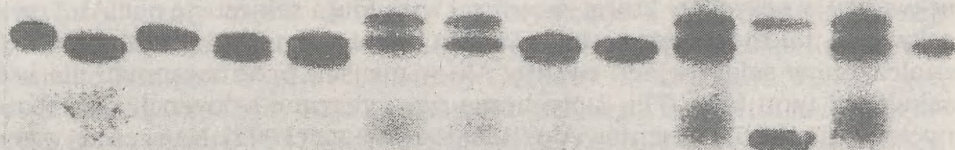
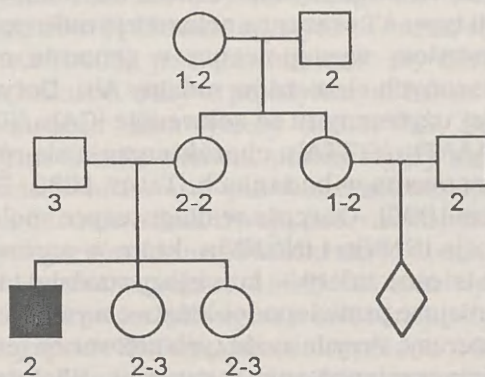
Wszystkie przebadane dotychczas sekwencje mikrosatelitarne od mononukleotydów do tetranukleotydów charakteryzują się polimorfizmem. W genomie

człowieka najczęściej występują powtórzenia typu: A > AC > AAAN > AAN > AG (N oznacza cytozynę guaninę lub tymidynę), które stanowią 76% wszystkich sekwencji mikrosatelitarnych. Około 12% tych sekwencji stanowią tandemy o długości większej niż 40 nukleotydów. Prawie 80% sekwencji z grupy A, AAN, AAAN, 50% sekwencji typu AT oraz inne sekwencje mikrosatelitarne charakteryzujące się niską częstością występowania w genomie człowieka znajduje się w sąsiedztwie rozproszonych elementów rodziny Alu. Dotychczas w diagnostyce pośredniej najbardziej użytecznymi są sekwencje (CA)_n/(GT)_n. Inne mikrosatelity, jak (A)_n/(T)_n i (AAAT)_n/(TTTA)_n charakteryzują się również polimorfizmem i coraz częściej są stosowane w badaniach (TAUTZ 1989, ECONOMOU i współaut. 1990, ZULIANI i HOBBS 1990). Obecnie w diagnostyce molekularnej najbardziej są przydatne sekwencje (NNN)_n i (NNNN)_n, które w porównaniu z sekwencjami (CA)_n wykazują dwie istotne zalety — łatwiejszy rozdział i identyfikacja poszczególnych alleli oraz mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia artefaktów wywołanych błędami polimerazy. Przydatność tych sekwencji jest ograniczona jednak ich mniejszą częstością występowania w genomie. Większość sekwencji mikrosatelitarnych, zlokalizowanych w sekwencjach Alu, występuje w regionie 3' tych sekwencji w pozycji, w której zazwyczaj występują sekwencje poli(A). Trzy grupy sekwencji mikrosatelitarnych (dwie: (A)_n/(T)_n i jedna ((AC)_n/(TG)_n, (AG)_n/(TC))) znaleziono w sekwencjach rodziny Alu w miejscu przeznaczonym dla krótkich sekwencji typu (A)_n/(T)_n. Dotychczas nie wykazano sekwencji mikrosatelitarnych w regionie 5' elementów Alu (BECKMAN i WEBER 1992). Najczęściej w genomie człowieka spotyka się dwunukleotyd (CA)_n/(GT)_n potocznie określany powtórzeniem CA (ryc. 1). Występuje 50 000–100 000 kopii powtórzeń CA w genomie człowieka i pojawiają się średnio co 30 tys. par zasad w euchromatynie (STALLINGS i współaut. 1991). W 1989 roku trzy grupy równocześnie podały informacje o różnorodności sekwencji mikrosatelitarnych wykrytą dzięki reakcji PCR (WEBER i MAY 1989, LITT i LUTY 1989, TAUTZ 1989). Powtórzenia CA mogą być wyszukane w znanych sekwencjach genomu dzięki zastosowaniu programów komputerowych lub dzięki przeszukaniu bibliotek krótkich sekwencji z sondami poli(dC-dA)/poli(dG-dT). WEISSENBACH i współpracownicy (1992) obierając drugą strategię zidentyfikowali 2995 mikrosatelitów w genomie człowieka, z czego 84% (2506) zostało zamplifikowanych. Jak się potem okazało 93% zamplifikowanych markerów wykazywało polimorfizm.

Inna grupa sekwencji mikrosatelitarnych obejmuje powtórzenia 3 lub 4 nukleotydów. Rodzina powtarzających się tetranukleotydów GATA/GACA została zidentyfikowana i wyizolowana z satelitarnego DNA węża (EPPLEN i współaut. 1982). Następnie wykazano, że tego typu powtórzenia występują u wszystkich *Eukaryota*, i są również polimorficzne. Dodatkową zaletą tych powtórzeń jest to, że po amplifikacji nie trzeba ich rozdzielać na dużych żelach sekwencyjnych, jak to jest w przypadku powtórzeń CA.

Trzy- i czteronukleotydowe powtórzenia występują co 300–500 tys. par zasad w chromosomie człowieka i są rozrzucone z tą samą częstością w całym genomie (około 10 000 loci) (EDWARDS i współaut. 1991). W diagnostyce molekularnej, a szczególnie w medycynie sądowej te sekwencje bardzo często poddaje się analizie, ponieważ charakteryzują się krótkimi lecz polimorficznymi allelami, co jest bardzo ważne, gdy analizowany jest częściowo zdegradowany DNA.

Mikrosatelity CA w rodzinie z dystrofią Duchenne'a



Ryc. 1. Analiza powtórzeń CA w regionie 3' genu *DMD* człowieka.

Badanie polimorfizmu powtórzeń CA jest wykorzystywane w diagnostyce molekularnej dystrofii mięśniowej Duchenne'a (NIEMAN-SEYDE i współaut. 1992, KWIATKOWSKA i SŁOMSKI 1992). Reakcję PCR wykonano z primerami znakowanymi 32-P na końcach 5'. Wykonano 30 cykli reakcji: 1 min, 92°C; 1 min, 55°C; 1 min 30 sek, 65°C. Produkty reakcji frakcjonowano w 8% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących, przy 1400 V, przez 5 godz. Tor 1 — chory na DMD; tor 2 — ojciec chorego; tor 3 — matka chorego; tor 4 — siostra 1 chorego; tor 5 — siostra 2 chorego; tor 6 i 7 — kobieta w ciąży (siostra matki chorego); tor 8 — mąż ciężarnej; tor 9 — dziadek chorego (ojciec matki chorego i kobiety w ciąży); tor 10 — babcia chorego; tor 11–13 — kontrole (drabina alleli). Ponieważ jest to przypadek rodzinny DMD analiza wykazała, że kobieta w ciąży nie jest nosicielką DMD.

WYKORZYSTANIE POLIMORFIZMU DNA W PRAKTYCE

W 1974 roku ukazało się doniesienie CHAKRABORTY'EGO i współpracowników *Exclusion of paternity: the current state of the art*, a blisko 20 lat później PENA i współpracownicy (1993) wydali książkę *DNA Fingerprinting: State of the Science* zbierającą najnowsze osiągnięcia z zastosowania badań DNA w praktyce. Po opublikowaniu pionierskiej pracy Jeffreys'a pojawiło się wiele doniesień o nowych sondach molekularnych, zarówno z ośrodków naukowych, jak i firm komercyjnych (ALI i współaut. 1986, NAKAMURA i współaut. 1987, VASSART i współaut. 1987, VERGNAUD i współaut. 1989). Równolegle, dla wielu loci DNA człowieka klasyczna hybrydyzacja według Southerna została zastąpiona reakcją

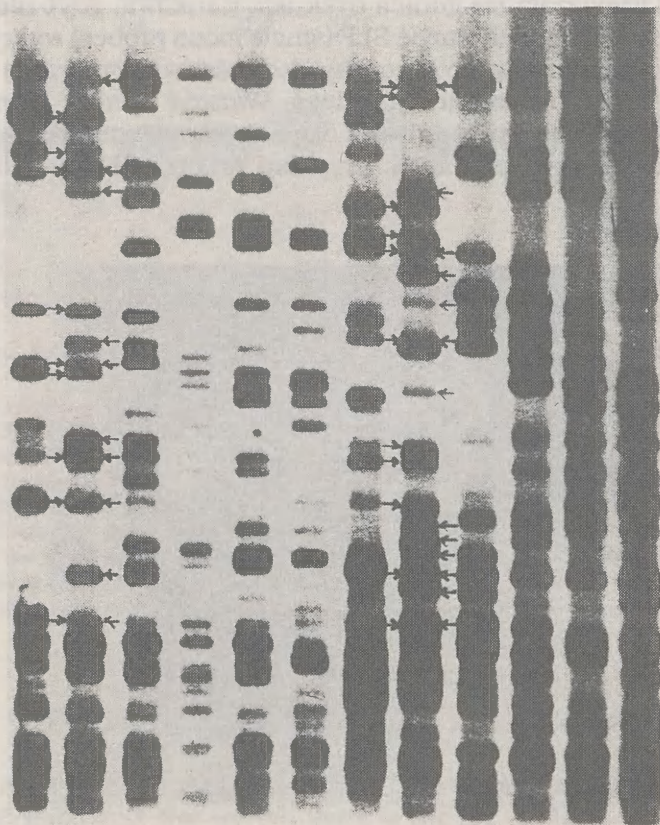
łańcuchową polimerazy — PCR (KASAI i współaut. 1990, BUDOWLE 1991, BUDOWLE i współaut. 1993). Doprowadziło to do wykształcenia się dwóch głównych kierunków badań, z których każdy posiada swoich zwolenników i przeciwników. Badania DNA fingerprinting można zasadniczo podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowi analiza pojedynczego locus (ang. single locus system, SLS), natomiast druga grupa obejmuje jednoczesną analizę wielu loci (ang. multilocus system, MLS). Wymienione grupy badań można określić jako analizę jednopunktową lub wielopunktową. Wnioski co do identyfikacji lub pokrewieństwa badanych osób w sprawach o ustalenie ojcostwa są formułowane na podstawie porównania wielkości fragmentów DNA występujących u tych osób. Celem umożliwienia jednoznacznego wnioskowania w oparciu o analizę jednopunktową jest konieczne wykonanie badań dla co najmniej 4 niezależnych loci. Ocenę pokrewieństwa przeprowadza się z uwzględnieniem częstości występowania długości fragmentów DNA obserwowanych w toku badań populacyjnych. Właśnie w tej kwestii wywiązała się gorąca dyskusja naukowa, gdyż niektóre stosowane w praktyce sondy molekularne SLP (single locus probes) wykrywają więcej niż 100 różnych fragmentów DNA i ocena częstości występowania w populacji każdego z tych wariantów nie jest możliwa. Wartość analizy jednopunktowej zależy więc od homogenności populacji i dla izolowanych grup etnicznych może być inna niż dla większej populacji. Przykład analizy SLS przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Zastosowanie analizy polimorfizmu pojedynczego locus (analiza SLS) w badaniach pokrewieństwa.

DNA badanych rodzin (matka, dziecko, domniemany ojciec) trawiono enzymem restrykcyjnym HinfI a następnie wykonano blotting i hybrydację według Southerna z sondą molekularną MS31. Strzałkami zaznaczono prążki dziecka występujące u rodziców. Locus wykazuje ogromny polimorfizm, prawdopodobnie ponad 100 alleli. Wszystkie badane osoby są heterozygotami.

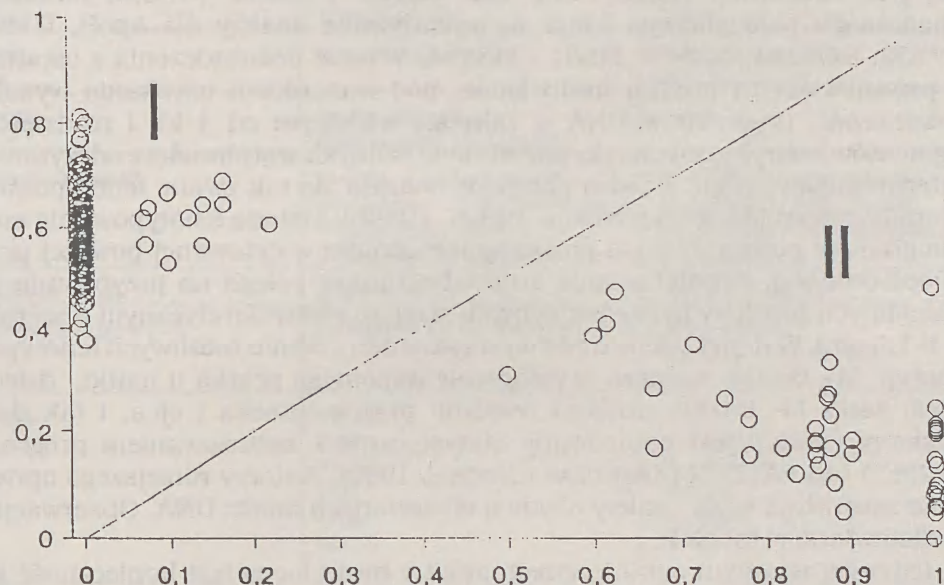
Alternatywnym podejściem badawczym jest analiza multilocus, analiza wielopunktowa. Jednym z najlepiej udokumentowanych badań z tej grupy jest jednocześnie wykrywanie wielu fragmentów DNA przy użyciu sondy MZ 1.3 lub (CAC)5 (PENA i współaut. 1993). Wysokiej informatywności sondy towarzyszy skomplikowana analiza wyniku, który odpowiada rozdzielonym elektroforetycznie fragmentom DNA i jest swoisty dla badanej osoby (z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych, dla których układ prążków jest jednakowy). Przykład analizy MLS przedstawiono na rycinie 3. Autorzy niniejszej pracy uczestniczyli w ostatnich latach w wielośrodkowych badaniach nad rutynowym stosowaniem analizy DNA fingerprinting. Uzyskane wyniki badań z zastosowaniem sondy (CAC)5\((GTG)_5\), przeprowadzonych niezależnie w sześciu laboratoriach niemieckich, posiadających wieloletnią tradycję w badaniach molekularnych i w naszym laboratorium, w pełni potwierdzają przydatność analizy wielopunktowej (BOHM i współaut. 1993, KRAWCZAK i BOCKEL 1993).



Ryc. 3. Zastosowanie analizy polimorfizmu multilocus (analiza MLS) w badaniach pokrewieństwa.

DNA badanych rodzin (matka, dziecko, domniemany ojciec) trawiono enzymem restrykcyjnym *Hinf*I, a następnie wykonano blotting i hybrydację według Southerna z sondą molekularną (CAC)5. Strzałkami zaznaczono prążki dziecka występujące u rodziców. Ten rodzaj analizy obejmuje jednocześnie ponad 70 loci.

Jednoczesna analiza DNA człowieka w około 70 regionach zawiera tyle informacji, że jej ocena klasycznym modelem genetycznym nie jest obecnie możliwa. Rozwinięto nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej. Założenia obliczeń statystycznych są dyskutowane na świecie od kilku lat, krytyka dotyczy przede wszystkim teoretycznych podstaw obliczeń. Na uwagę zasługują wyniki badań przedstawione w wieloosrodkowej pracy 7 laboratoriów, z których wynika, że w badaniach nad dochodzeniem spornego ojcostwa występują 2 grupy. Na rycinie 4 przedstawiono 2 grupy spraw obejmujące potwierdzenia (grupa I) i wykluczenia (grupa II). W grupie I zauważyć można kilkanaście przypadków, w których u dziecka wystąpiły mutacje. Ich występowanie nie wpłynęło jednak na zakwalifikowanie danej sprawy do grupy potwierdzeń lub wykluczeń ojcostwa. Analiza wielopunktowa niewątpliwie należy do grupy badań trudnych, a jej wykonywanie powinno być ograniczone do wyspecjalizowanych ośrodków.



Ryc. 4. Zastosowanie analizy multilocus w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Na rycinie przedstawiono proporcję prążków aberracyjnych dziecka i prążków wspólnych domniemanego ojca i dziecka. Linia prosta odpowiada równowadze obydwu wartości. Każdy znak reprezentuje jedną badaną trójkę (matka, dziecko, domniemany ojciec). Wszystkie badane przypadki można zakwalifikować do dwóch grup: I — grupa trójek, w których analiza potwierdziła ojcostwo; II — grupa trójek, w których analiza wykluczyła ojcostwo. W grupie I u około 5% występują prążki aberracyjne (mutacje), które nie wpływają jednak na końcowy wynik analizy.

W badaniach medycyny sądowej analiza multilocus ogranicza się wyłącznie do badania materiału, z którego wyizolowano wysokocząsteczkowy DNA. Tylko wtedy jest możliwe przeprowadzenie badań techniką blottingu według Southerna. Najczęściej materiał do badań jest zdegradowany, stąd są analizowane stosunkowo krótkie (kilkaset nukleotydów) odcinki DNA, a techniką z wyboru jest PCR.

Na początku lat dziewięćdziesiątych pojawiły się doniesienia wskazujące na brak modelu genetycznego dla oszacowania wyników uzyskanych analizą multi locus. W odpowiedzi na krytycyzm pojawiły się doniesienia wykazujące ogromną dokładność i wysoką informatywność analizy wielopunktowej. Przyjmuje się, że wielopunktowa analiza ludzkiego DNA obejmuje jednocześnie kilkadziesiąt loci i ostatnio przygotowano nowe metody analizy statystycznej, pozwalające sprowadzić wynik do wartości liczbowej, na przykład prawdopodobieństwa ojcostwa (programy komputerowe, np. PATER lub PATERN).

W naszym laboratorium standardowa analiza obejmuje wykonanie zarówno analizy multi locus, jak i pojedynczego locus. W badaniach multi locus najczęściej jest stosowany układ *Hinf*I lub *Hae*III i sonda (GTG)₅, natomiast w badaniach pojedynczego locus są wykonywane analizy dla ApoB, D1S80, D17S30, COL2A1, DXS52, MS31 i MS43A. Własne doświadczenia z ostatnich lat przemawiają za analizą multi locus, pod warunkiem uzyskania wysokiej rozdzielczości fragmentów DNA w zakresie większym od 4 kb i rozdzielenia fragmentów restrykcyjnych tak, aby nie było żadnych wątpliwości z odczytaniem i interpretacją wyniku. Bardzo pomocne okazało się tak zwane fenotypowanie autoradiogramu (EVETT i współaut. 1989a, 1989b). Metodą fenotypowania autoradiogramów posługiwały się poszczególne ośrodki w cytowanej powyżej pracy wieloośrodkowej. Fenotypowanie autoradiogramów polega na przypisaniu poszczególnych prążków hybrydizacyjnych strefom elektroforetycznym o szerokości 1–1,5 mm. W danej strefie może wystąpić jeden z ośmiu możliwych fenotypów. Fenotyp M+ D+ O+ oznacza wystąpienie wspólnego prążka u matki, dziecka i ojca, zapis M- D+ O+ oznacza wspólny prążek dziecka i ojca, i tak dalej. Uzyskany fenotyp jest oszacowany statystycznie z zastosowaniem programu FINGPED lub PATERN (KRAWCZAK i BOCKEL 1992). Autorzy niniejszego opracowania zauważają wady i zalety obydwu stosowanych analiz DNA. Obserwacje te przedstawiono w tabeli 2.

Jedynym istotnym ograniczeniem analizy multi locus jest konieczność stosowania wysokospolimeryzowanego DNA. W badaniach spornego ojcostwa tego rodzaju ograniczenia nie występują ze względu na izolowanie DNA ze świeżo pobranej krwi. W badaniu śladów biologicznych może to stanowić bardzo istotny czynnik ograniczający i dlatego w tych badaniach coraz większe zastosowanie znajduje analiza pojedynczego locus, w szczególności w powiązaniu z reakcją PCR.

Przedstawione wady obydwu analiz dotyczą głównie problemów technicznych, nie wpływających na wartość i przydatność obydwu metod. Z naszych obserwacji wynika, że występują również takie przypadki, w których analiza multi locus pozwala na wykluczenie ojcostwa, podczas gdy po trzech kolejnych analizach pojedynczego locus nie ma podstaw do jego wykluczenia. Uważamy więc, że analiza multi locus powinna być stosowana jako analiza podstawowa,

a analizy pojedynczego locus jako wspierające lub uzupełniające. Ogólny schemat wykonywania przez nasze laboratorium analizy multi locus przedstawiono na rycinie 3.

Interesującą grupą, którą należy traktować ze szczególną uwagą, jest grupa 3, w której u dziecka występuje jeden prążek, którego pochodzenia nie można przypisać ani od matki, ani od ojca. Taki prążek może być wynikiem mutacji lub ewentualnego niepełnego strawienia DNA enzymem restrykcyjnym. W naszych badaniach błąd wynikający z nie strawienia DNA nie wystąpił, co potwierdzono powtarzając analizy. Prążki mutacyjne występują z częstością poniżej 0,05. Rozróżnienie prążka mutacyjnego nie stwarza w praktyce dużych trudności.

Tabela 2

Technika Southern blotting czy PCR w dochodzeniu spornego ojcostwa?

	Blotting Southerna	PCR
Ilość DNA	5–10 µg	100 µg (możliwość pracy nawet z pojedynczymi komórkami)
Czas	1 tydzień	1 dzień
DNA	wysokocząsteczkowy	może być częściowo zdegradowany
Koszty	pracochłonna, duży nakład materiałów	niskie
Informatywność	wysoka informatywność wynikająca z kompleksowości i dużej liczby alleli; liczba alleli powyżej 99%	niska heterozygotyczność, możliwość preferencyjnej amplifikacji alleli, mniejsza liczba alleli
Wielkość alleli	2–20 kb	100–2000 kb
Stosowanie izotopów	izotopowo i niezotopowo	niezotopowo izotopowo jedynie dla mikrosatelitów
Sondy Primery	MZ1.3 33.3 33.15 F10 GTG MS31 MS43A	D1S80 D17S30 ApoB DXS52 HumthoI Col2A1

Własne obserwacje i wyniki wspólnego studium potwierdzają wysoką wartość analizy wielopunktowej. Na wynik uzyskany tą metodą nie wpływają drobne różnice metodyczne występujące w poszczególnych pracowniach. Najważniejsze jest, że metoda zdecydowanie rozdziela przypadki potwierdzenia i wykluczenia ojcostwa na dwie odrębne grupy, nie zawierające wspólnych obszarów.

DIAGNOSTYKA MOLEKULARNA A STANDARYZACJA BADAŃ

W ostatnim czasie coraz więcej pracowni skupionych wokół instytutów badawczych lub laboratoriów prywatnych przystępuje do diagnostyki molekularnej.

larnej. Uzyskiwane wyniki służyć mają często w doborze terapii, mają potwierdzić lub wykluczyć nosicielstwo choroby oraz zidentyfikować uszkodzony gen. Wzrost zainteresowań badaniami molekularnymi wiąże się przede wszystkim z możliwością uzyskania wyników reakcją PCR. W naszym kraju nie ma systemu atestacji i standaryzacji badań molekularnych. Dla przykładu w krajach Europy Zachodniej powstały instytucje nadzorujące w ciągły sposób jakość wykonywanych badań. Szczególnie wyraźnie zauważyć można działanie atestacyjne w badaniach z zakresu medycyny sądowej i kryminalistyki nadzorowane w Europie przez EDNAP, a w Niemczech przez GDNAP. Powstaje w ten sposób sieć laboratoriów wykonujących badanie na najwyższym poziomie. W Polsce atestacja tego rodzaju aczkolwiek zapoczątkowana, nie rozwija się i spotyka się z ogólną niechęcią.

Podobnie laboratoria diagnostyczne zajmujące się badaniem chorób genetycznych tworzą grupy robocze. Przykładem może być mukowiscydoza (CFTR), dla której utworzono międzynarodowe konsorcjum standaryzujące wykrywanie mutacji i oznaczanie nosicielstwa. W kraju powstała ostatnio grupa robocza mukowiscydozy, która stanowi przedłużenie działania międzynarodowego konsorcjum. Inicjatywy w tym aspekcie wydają się być szczególnie cenne.

POLYMORPHIC DNA SEQUENCES AND THEIR APPLICATION IN PATERNITY TESTING

Summary

Characteristics of polymorphic sequences of DNA, especially satellite, minisatellite and microsatellite sequences are presented. Own experience from the use of multi and single locus analysis of DNA in paternity testing has been compared with the results of research in other laboratories. Critical points of both types of analysis are discussed.

LITERATURA

- ALI S., MULLER C. R., EPPLEN J. T., 1986. *DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats*. Hum. Genet. 74, 239-243.
- BECKMAN J. S., WEBER J. L., 1992. *Survey of human and rat microsatellites*. Genomics 12, 627-631.
- BELL G. I., SELBY M. J., RUTTER W. J., 1982. *The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences*. Nature 295, 31-35.
- BOHM I., KRAWCZAK M., NURNBERG P., HAMPE J., HUNDRIESER J., POCHE H., PETERS C., SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., NAGY M., POPPERL A., EPPLEN J. T., SCHMIDTKE J., 1992. *Oligonucleotide DNA fingerprinting: results of a multi-center study on reliability and validity*. In *DNA Fingerprinting*, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birkhauser Verlag.
- BOHM I., KRAWCZAK M., NURNBERG P., HAMPE J., HUNDRIESER J., POCHE H., PETERS C., SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., NAGY M., POPPERL A., EPPLEN J. T., SCHMIDTKE J., 1993. *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)5/(GTG)5 a multi-center study*. Forensic Science International 59, 101-107.
- BOYLAN K. B. M., TAKAHASHI N., DIAMOND M., HOOD E., PRUSINER S. B., 1987. *DNA length polymorphism located 5' to the human myelin basic gene*. Am. J. Hum. Genet. 40, 387-400.
- BRITTEN R. J., KOHNE D. E., 1968. *Repeated sequences in DNA*. Science 161, 529-540.
- BUDOWLE B., 1993. *VNTR population data from various reference groups and the significance of application to identity testing*. W: PENA S. D. J., CHAKRABORTY R., EPPLEN J. T., JEFFREYS A. J. (red.), *DNA Fingerprinting: state of the Science*. Basel: Birkhauser Verlag.
- BUDOWLE B., CHAKRABORTY R., GIUSTI A. M., EISENBERG A. J., ALLEN R. R. C., 1991. *Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE*. Am. J. Hum. Genet. 48, 137-144.

- CAPON D. J., CHEN E. Y., LEVINSON A. D., SEEBURG P. H., GOEDDEL D. V., 1983. *Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue*. *Nature* 302, 33-37.
- CHAKRABORTY R., SHOW M., SCHULL W. J., 1974. *Exclusion of paternity: The current state of the art*. *Am. J. Hum. Genet.* 26, 477-488.
- ECONOMOU E. P., BERGEN A. W., WARREN A. L., ANTONARAKIS S. E., 1990. *The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2951-2954.
- EDWARDS A., CIVITELLO A., HAMMOND H. A., CASKEY C. T., 1991. *DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats*. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 746-756.
- EPPLEN J. T., MCCARREY J. R., SUTOU S., OHNO S., 1982. *Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male specific putative RNA in the mouse*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3798-3802.
- EVETT I. W., WERRET D. J., BUCKLETON J. S., 1989a. *Paternity calculations from DNA multilocus profiles*. *J. Forensic. Sci. Soc.* 29, 249-254.
- EVETT I. W., WERRET D. J., SMITH A. F. M., 1989b. *Probabilistic analysis of DNA profiles*. *J. Forensic. Sci. Soc.*, 29, 191-196.
- HIGGS D. R., WAINSCOT J. S., FLINT J., HILL A. V. S., THEIN S. L., NICHOLS R. D., TEAL H., AYYUB H., PETO T. E. A., FALUSI A. G., JARMAN A. P., CLEGG J. B., WEATHERALL D., 1986. *Analysis of the human globin gene cluster reveals a highly informative genetic locus*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83, 5165-5169.
- JARUZELSKA J., SŁOMSKI R., 1990. *Molecular basis of phenylketonuria*. *Postępy Biochemii* 36, 24-31.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S. W., 1985a. *Hypervariable „minisatellite” region in human DNA*. *Nature* 314, 67-73.
- JEFFREYS A. J., WILSON V., THEIN S. W., 1985b. *Individual-specific „fingerprints” of human DNA*. *Nature* 316, 76-79.
- JEFFREYS A. J., NEUMANN R., WILSON V., 1990. *Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis*. *Cell* 60, 473-485.
- JEFFREYS A. J., MACLEOD A., TAMAKI K., NEIL D. L., MONCKTON D. G., 1991. *Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing*. *Nature* 354, 204-209.
- JUNGERMAN M., SŁOMSKI R., 1987. *Genetic diseases — diagnosis using molecular probes and restriction fragments length polymorphism*. *Kosmos* 36, 201-212.
- JUNGERMAN M., SŁOMSKI R., 1990. *In vitro enzymatic amplification of specific DNA sequences*. *Postępy Biochemii* 36, 14-21.
- KASAI K., NAKAMURA Y., WHITE R., 1990. *Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT 118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic sciences*. *J. Forensic. Sci.*, 35, 1196-1200.
- KNOTT T. J., WALLIS S. C., PEASE J., POWELL L. M., SCOTT J., 1986. *A hypervariable region 3' to the apolipoprotein B gene*. *Nucl. Acid. Res.* 14, 9215-9216.
- KNOWLTON R. G., BROWN, BRAMAN J. C., BARKER D., SCHUMM J. W., MURRAY C., TAKVORIAN T., RITZ J., DONNIS-KELLER H., 1986. *Use of highly polymorphic probes for genotype analysis bone marrow transplantation*. *Blood* 68, 378-385.
- KRAWCZAK M., BOCKEL B., 1993. *The formal analysis of multilocus DNA fingerprints*. W: *DNA Fingerprinting*, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.
- KWIATKOWSKA J., SŁOMSKI R., 1992. *DMD gene — the largest human gene*. *Postępy Biochemii* 38, 49-55.
- LITT M., LUTY J. A., 1989. *A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 397-401.
- NAKAMURA Y., JULIER C., WOLFF R., HOLM R., O'CONNELL P., LEPPERT M., WHITE R., 1987. *Characterization of a human „midisatellite” sequence*. *Nucleic Acids Res.*, 15, 2537-2547.
- NAKAMURA Y., CARLSON M., KRAPCHO K., KANAMORI M., WHITE R., 1988. *New approach for isolation of VNTR markers*. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 854-859.
- NIEMAN-SEYDE S., SŁOMSKI R., RINISLAND F., ELLERMEYER U., KWIATKOWSKA J., REISS J., 1992. *Molecular genetic analysis of 67 patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy*. *Hum. Genet.* 90, 65-70.
- PENA S. D. J., CHAKRABORTY R., EPPLEN J. T., JEFFREYS A. J., 1993. *In DNA Fingerprinting*, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLEN and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.

- ROYLE N. J., CLARKSON R. E., WONG Z., JEFFREYS A. J., 1988. *Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosoms*. Genomics 3, 352-360.
- SILVA A. J., JOHNSON J. P., WHITE R., 1987. *Characterization of a highly polymorphic region 5' to JH in the human immunoglobulin heavy chain*. Nucl. Acid. Res., 15, 3845-3857.
- SŁOMSKI R., ZIETKIEWICZ E., 1987. *DNA recombination techniques in human genetics*. Postępy Biochemii 33, 445-465.
- SŁOMSKI R., JUNGERMAN J., KRASZEWSKI A., HORST-SIKORSKA W., 1989. *In vitro amplification of selected sequences of human genome*. Biotechnologia 2, 74-84.
- SŁOMSKI R., CHLEBOWSKA H., REISS J., 1992. *Application of the polymerase chain reaction in clinical diagnostics*. Postępy Biochemii 38, 75-80.
- SŁOMSKI R., KWIATKOWSKA J., CHLEBOWSKA H., 1993. *Application of molecular biology techniques in diagnosis of human diseases*. Biotechnologia 4, 125-131.
- SMITH J. C., ANWAR R., RILEY J., JENNER D., MARKHAM A. F., JEFFREYS A. J., 1990a. *Highly polymorphic minisatellite DNA probes. Further evaluation for individual identification and paternity testing*. Journal of a Forensic Society, 30, 19-32.
- SMITH J. C., NEWTON C. R., ALVES A., ANWAR R., JENNER D., MARKHAM A. F., 1990b. *Highly polymorphic minisatellite sequences: Allele frequency and mutation rates for five locus specific probes in Caucasian population*. J. For. Sci. Soc., 30, 19-32.
- STALLINGS R. L., FORD A. F., NELSON D., TORNEY D. C., HILDEBRAND C. E., MOYSIS R. K., 1991. *Evolution and distribution of (GT)_n sequences in mammalian genomes*. Genomics, 10, 807-815.
- STOKER N. G., CHEAH K. S. E., GRIFFIN J. R., POPE F. M., SOLOMON E., 1985. *A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene*. Nucl. Acid. Res. 13, 4613-4622.
- TAUTZ D., 1989. *Hypervariability of simple sequences as a general source of genetic variation*. Nucl. Acid. Res. 17, 6463-6471.
- TAUTZ D., 1993. *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*. W: DNA Fingerprinting, red. S. D. J. PENA, R. CHAKRABORTY, J. T. EPPLER and A. J. JEFFREYS, Birhauser Verlag, 1992.
- VASSART G., GEORGES M., MONSIEUR M., BROCAS H., LEQUARRE A. S., CHRISTOPHE D., 1987. *A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA*. Science 235, 683-684.
- VERGNAUD G., MARIAT D., ZOROASTRO M., LAUTHIER V., 1989. *Detection of single and multiple polymorphic loci by synthetic tandem repeats of short oligonucleotides*. Electrophoresis 12, 134-140.
- VOGT P., 1990. *Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved „chromatin folding code”*. Hum. Genet. 84, 301-336.
- WEBER J. L., MAY P. E., 1989. *Abundant class of human polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction*. Am. J. Hum. Genet. 44, 388-396.
- WEISSENBEACH J., GYAYPAY G., DIB C., VIGNAL A., MORISETTE J., MILASSEAU P., VAYSSEIZ G., LATHROP M., 1992. *A second-generation linkage map of the human genome*. Nature 359, 794-801.
- WONG Z., WILSON V., PATEL I., JEFFREYS A. J., 1987. *Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA*. Annals of Human Genetics 51, 269-288.
- ZULIANI G., HOBBS H. H., 1990. *A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences*. Am. J. Hum. Genet. 46, 963-969.

HENRYK HÜBNER i ANNA MORDALSKA

*Zakład Biologii i Genetyki Medycznej
Instytut Nauk Podstawowych
Wojskowa Akademia Medyczna
Plac gen. J. Hallera 1
90-647 Łódź*

GENOMOWY IMPRINTING U CZŁOWIEKA

Termin „imprinting” — „piętno” jest zapożyczony przez genetykę z etologii, gdzie oznacza wyspecjalizowaną a jednocześnie ograniczoną w czasie formę uczenia się. U wielu kręgowców imprinting jest zachowaniem, dzięki któremu młode zwierzęta nawiązują kontakty społeczne oraz uczą się bezbłędnie rozpoznawać matkę i osobniki swojego gatunku. To wrodzone piętno wywiera wpływ na całe życie zwierzęcia, mimo że może się ono zrealizować jedynie w określonym krótkim czasie po urodzeniu lub wykluciu.

Termin imprinting w znaczeniu genetycznym, a ściślej w cytogenetycznym, został po raz pierwszy użyty na początku lat sześćdziesiątych dla scharakteryzowania zjawiska eliminacji chromosomów u *Sciara* (CROUSE 1960). Pomimo upływu tylu lat od ukazania się tej pierwszej, a następnie licznych innych publikacji (BROWN i BENNETT 1957, BROWN i NELSON-REES 1961, CROUSE i współaut. 1971, KITCHIN 1970) dla wielu biologów i lekarzy ciągle jeszcze jest niespodzianką, że matczyne i ojcowskie chromosomy mogą u ssaków oraz innych grup zwierząt funkcjonować u potomstwa odmiennie. W związku z tym — różnym, zależnym od pochodzenia, funkcjonowaniem materiału genetycznego — genomowy imprinting proponuje się po polsku nazywać „genomowym piętnem rodzicielskim”.

W dziedziczeniu cech u badanego przez Mendla grochu nie ma prawdopodobnie większego znaczenia, czy gen decydujący o czerwonej czy białej barwie kwiatów pochodzi od rośliny matczynej lub ojcowskiej. U ssaków oraz u przedstawicieli innych taksonów nie jest jednak obojętne, od którego z rodziców pochodzi komplet chromosomów albo konkretny chromosom (np. heterochromosom X) lub określony allel. Istnieją niepodważalne dowody na to, że chromosomy lub geny mogą zapamiętać swoje rodzicielskie pochodzenie. U niektórych organizmów konsekwencją genomowego piętna rodzicielskiego jest odwracalna utrata aktywności jednej z dwu homologicznych sekwencji DNA. W genetycznym ujęciu efekt imprintingu jest równoznaczny z hemizygotycznością w określonym locum lub w zespole loci. Genomowe piętno rodzicielskie nie podważa praw Mendla, lecz wyjaśnia obserwowane od nich odstępstwa.

Można zatem stwierdzić, że genomowe piętno rodzicielskie w ogólnym znaczeniu jest zróżnicowaną modyfikacją i/lub ekspresją u potomstwa homologicznych alleli czyli regionów chromosomów dziedziczonych od każdego rodzica. Do tej pory poznane przykłady genomowego imprintingu obejmują eliminację ojcowskich chromosomów u owadów *Sciara coprophila* i *Diaspidid coccidis* (BROWN i BENNETT 1957), heterochromatyzację i inaktywację heterochromosomu X u ssaków (LYON 1961, 1991), wyłączenie zależne od nici ojcowskiego chromosomu w krzyżówkach u drożdży, u myszy zróżnicowaną metylację transgenów (SURANI i współaut. 1988, 1990, WILLISON 1991), która może obejmować przyległe sekwencje w miejscu insercji oraz różne formy allelicznego wyłączenia genów ssaków (HOLLIDAY 1990). Są znane także nieliczne przykłady rodzicielskiego piętna genomowego u roślin.

WPLYW GENOMOWEGO IMPRINTINGU NA ROZWÓJ EMBRIONALNY SSAKÓW

Organizmy diploidalne zachowują zdolność do redukcji w mejozie swojego genomu do stanu haploidalnego oraz produkcji gamet męskich i żeńskich. Okazało się także, że u diplontów występują stany, w których potrzebują one tylko haploidalnych zestawów swojego genomu. U ssaków takim dobrze poznany stan jest mechanizm determinacji płci oparty na zjawisku haploidalności. Chromosom Y warunkujący rozwój płci męskiej jest u niej obecny w pojedynczej kopii. U płci żeńskiej ten sam efekt jest osiągany przez kompensacyjny mechanizm prowadzący we wczesnym stadium embriogenezy do inaktywacji jednego z dwóch chromosomów X i powstania ciała Barra. W wyniku tego procesu u samic ssaków geny sprzężone z chromosomem X występują także w dawce haploidalnej.

Nieprzypadkowa inaktywacja chromosomu X u ssaków była pierwszym, dla tej gromady, przykładem zróżnicowanej ekspresji zależnej od rodzicielskiego pochodzenia materiału genetycznego. Ojcowski chromosom X jest preferencyjnie inaktywowany we wszystkich komórkach samic torbaczy i w błonach płodowych rozwijających się samic gryzoni. Natura bodźca powodującego tę wybiórczą inaktywację nie jest dotychczas wyjaśniona. W komórkach właściwego embrionu ssaków inaktywacja jest losowa (LYON 1961), a znaczenie fakultatywnej heterochromatyzacji chromosomów X u ssaków i tworzenie ciała Barra jest ogólnie znane i nie wymaga szczegółowego omawiania. Proces inaktywacji chromosomu X zależy w części od metylacji DNA w przylegających do genów regionach bogatych w pary C-G (HOLLIDAY 1990). Funkcja tych genów może być reaktywowana przez 5-azacytydynę powodującą demetylację DNA. Inaktywacja chromosomu X jest analogiczna do poniżej omówionego allelicznego wykluczenia, z tym jednak zastrzeżeniem, że w tym przypadku mechanizm kompensacyjny rozciąga się na cały chromosom X. Wpływ genomowego piętna rodzicielskiego na rozwój embrionalny ssaków nie ogranicza się tylko do tworzenia ciałek Barra. U ssaków komórki rozwijającego się embrionu nie korzystają w jednakowej mierze z obu odziedziczonych genomów i wiedzą prawdopodobnie doskonale, kiedy mają skorzystać z informacji zawartej w macierzym lub ojcowskim homologu. Zatem geny autosomalne, pochodzące od matki i ojca ulegają zróżnicowanej ekspresji

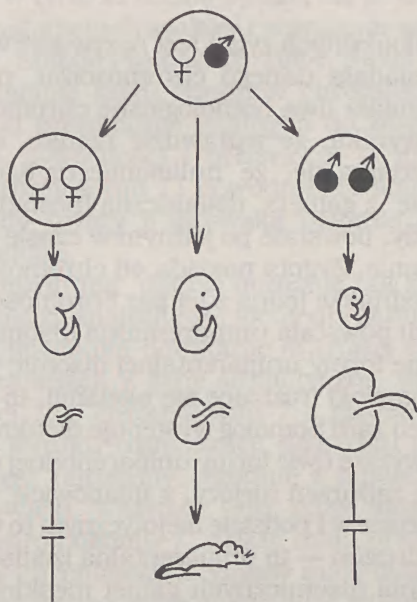
u embrionu. Badano (LAWLER i współaut. 1982) komórki embrionalnego nowotworu — zaśniadu groniastego — rozwijającego się z kosmówki i ustalono, że mają one 46 zupełnie prawidłowych chromosomów, które jednak wszystkie były pochodzenia ojcowskiego. A więc przypadek partenogenezy, która mogła polegać na podwojeniu chromosomów plemnika (całkowite nierozdzielenie się chromosomów) albo na dispermii, przy czym cały maczynny materiał genetyczny został utracony.

W genetycznie przeciwnym przypadku, kiedy wszystkie chromosomy są pochodzenia maczynnego powstaje inny embrionalny nowotwór — potworniak jajnika (MYERS i współaut. 1982). Nowotwory tego rodzaju pochodzą z diploidalnego, partenogenetycznego wzrostu maczynnego pochodzenia i dowody cytogenetyczne sugerują, że są one zaburzeniem postmeiotycznym.

Potworniak jajnika ma diploidalne, maczyczne i partenogenetyczne pochodzenie i powstaje w wyniku nienormalnego rozwoju pierwszego ciała kierunkowego lub z fuzji drugiego ciała kierunkowego z przedjadrzem komórki jajowej. Jeden z dwóch chromosomów X komórek potworniaka jest genetycznie nieaktywny (tworzy ciało Barra), co sugeruje, że mechanizmy genomowego imprintingu i inaktywacji chromosomu X są całkowicie maczyczne (CHANDRA i NANJUDIAH 1990).

W celu potwierdzenia tych obserwacji przeprowadzono doświadczenia na komórkach jajowych myszy. Przebieg i wyniki eksperymentów przedstawiono na rycinie 1. Z komórek jajowych każdorazowo usuwano przedjadrza i wprowadzano nowe. Tworzono zatem poniższe kombinacje:

- dwa ojcowskie przedjadrza — androgenetyczne zygoty;
- jedno przedjadrze maczyczne, a drugie ojcowskie — prawidłowe zygoty;



Ryc. 1. Koństruowanie androgenetycznych i gynogenetycznych zygot oraz ich dalszy rozwój.

— dwa maczyne przedjadrza — zygoty gynogenetyczne.

Rozwój androgenetycznych zygot nie jest prawidłowy, bowiem dochodzi do nadmiernego rozwoju błon płodowych oraz łożyska, natomiast rozwój embrionu jest niewielki; ciąża kończy się poronieniem. Gynogenetyczne zygoty także nie rozwijają się prawidłowo, i w przeciwieństwie do poprzednich, obserwuje się intensywny rozwój embrionu, a zahamowany jest rozwój tkanek pozazarodkowych i również dochodzi do poronienia (BARTSCH i współaut. 1992).

Wyniki tych doświadczeń są podobne do tego, co w osłabionej formie zaobserwowano u człowieka w przypadku triploidii, a więc w losie zygot z 69 chromosomami. Wykazano, że w przypadku triploidii u człowieka większość zygot ma 2 zestawy chromosomów od ojca; anomalia ta jest zatem wynikiem podwójnego zapłodnienia. U człowieka, jeżeli 2 komplety chromosomów pochodzą od ojca a 1 od matki, tworzy się hipertroficzne łożysko z cystami, często również zaśniead groniasty. Jeżeli 2 komplety chromosomów pochodzą od matki a 1 od ojca, embrion rozwija się początkowo dobrze, ale nie rozwija się łożysko i dochodzi do wczesnego poronienia. Dzieci urodzone z $3n$ chromosomami mają przeważnie kariotyp mozaikowy, z linią komórek o prawidłowym kariotypie, a fenotypowo stwierdza się duże łożysko z cystami. Dziecko ma bardzo mały tułów z dużą głową i często spotyka się syndaktylię.

Przeprowadzone doświadczenia dowodzą, że u ssaków geny matki odpowiadają za wzrost embrionu, natomiast geny ojcowskie są odpowiedzialne za struktury zewnątrz embrionalne, a więc za łożysko i błony płodowe (BARTSCH i współaut. 1992).

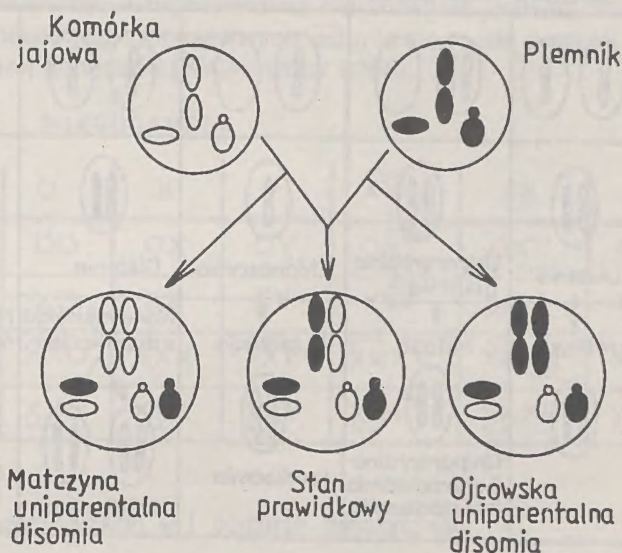
CYTOGENETYCZNE DOWODY GENOMOWEGO IMPRINTINGU

Powstawanie aneuploidalnych zygot jest oczywiste: w przypadku monosomii jedna z gamet nie posiadała danego chromosomu, natomiast w przypadku trisomii jedna z gamet miała dwa homologiczne chromosomy. Przeprowadzono obliczenia, z których wynika, że wprawdzie rzadko, ale jednak z częstością statystycznie istotną zdarza się, że nullisomiczna gameta (bez chromosomu z jednej pary) łączy się z gametą disomiczną (posiadającą dwa chromosomy z jednej pary). Dwa błędy, powstałe po jednym w czasie oogenezy i spermatogenezy, znoszą się wzajemnie. Zygota posiada 46 chromosomów, po dwa chromosomy w każdej parze, jednakże jedna z jej par chromosomów pochodzi tylko od jednego z rodziców, czyli powstała uniparentalna disomia (ENGEL 1980) (ryc. 2).

Występują dwie różne formy uniparentalnej disomii: jeżeli od jednego rodzica pochodzą dwa różne homologi (różniące się allelami), to powstaje uniparentalna heterodisomia, a jeżeli ten sam homolog występuje dwukrotnie, to powstaje uniparentalna izodisomia. Powyższe dwie formy uniparentalnej disomii są konsekwencją różnie umiejscowionych zaburzeń mejozy, a mianowicie: jeżeli nierozdzielenie się chromosomów miało miejsce w I podziale mejotycznym to występuje uniparentalna heterodisomia, jeżeli w drugim — to uniparentalna izodisomia (ryc. 3).

Częstość powstawania disomicznych gamet męskich i żeńskich jest jednakowa, jednak aneuploidalne plemniki rzadko zapładniają komórki jajowe. Jest oczywiste, że jeżeli nie rozdzielone chromosomy przechodziły uprzednio proces

crossing-over, to wówczas izodisomia jest częściową heterodisomią lub heterodisomia jest częściową izodisomią.



Ryc. 2. Schemat powstawania uniparentalnej disomii.

Pseudodisomia nie jest, jakby się mogło wydawać, stanem prawidłowym, bowiem dla właściwego rozwoju zygoty ważne jest, aby jeden z chromosomów homologicznej pary pochodził z plemnika, a drugi z komórki jajowej. Przyczyna nieprawidłowości tkwi w tym, że różnie wydają się przebiegać procesy metylacji DNA w mikro- i w makrogametach ssaków i powiązane są z tym różne następstwa (REIK i współaut. 1987, SURANI i współaut. 1984, SWAIN i współaut. 1987).

Monoparentalne disomie kilku regionów chromosomów mogą powodować różnorodne fenotypy od prenatalnie letalnych do zespołów, które cechują się zaburzeniami rozwoju, żywotności i behavioru. U myszy matczyne disomie proksymalnej części chromosomu 11 powoduje, że potomstwo jest mniejsze niż normalnie, podczas gdy myszy z ojcowską disomią tego samego fragmentu chromosomu 11 są większe.

Chromosomowy imprinting dobrze obrazuje tak zwana mysz Cattanacha. W chromosomie nr 7 myszy znajduje się locus dla genu barwy sierści. Inny allel w tym szczepie myszy powoduje powstanie brązowej sierści. Mysz Cattanacha posiada w obu chromosomach 7 geny albinotyczne, warunkujące białą sierść, ale segment o długości 1/3 chromosomu 7 z genem brązowego zabarwienia sierści znajduje się w wyniku translokacji pośrodku jednego chromosomu X. Drugi chromosom X jest normalny. Zgodnie z hipotezą Lyon chromosomy X ulegają losowej inaktywacji. Wszędzie tam, gdzie aktywny jest chromosom X posiadający segment chromosomu 7, myszy mają brązową sierść. Tam, gdzie aktywny jest normalny chromosom X, myszy mają białą sierść.

Jeżeli genomowy imprinting może obejmować istotną część genomu ssaków, to należy oczekiwać, że zmienna penetracja i zmienna ekspresja niektórych genów może być związana z rodzicielskim pochodzeniem materiału genetycznego.

	Przebieg prawidłowy	Komplementacja gamet	Od monosomii do izodisomii	Błędy powstające po zapłodnieniu	
Gamety					
Zygota	 Disomia	 Uniparentalna disomia	 Monosomia	 Disomia	 Disomia
Komórka somatyczna	 Mitoza	 Mitoza Uniparentalna heterodisomia lub izodisomia	 Duplikacja Izodisomia	 Nondysjunkcja i duplikacja Izodisomia	 Miotyczny crossing-over Częściowa izodisomia

Ryc. 3. Różne sposoby powstawania uniparentalnej disomii.

go. U myszy mamy taki rzadki dowód: mutacja *Thp* jest letalna. Embriony z delecją w T kompleksie giną, jeżeli odziedziczą mutację od swojej matki, ale przeżywają, gdy tę mutację odziedziczą po ojcu.

Zdaniem WILLISONA (1991), dotychczasowe wyniki doświadczeń analizujących skutki uniparentalnej disomii u myszy oraz wpływu genomowego imprintingu na pojedyncze geny wskazują na to, że liczba genów sprzężonych z autosomami i wykazujących efekt rodzicielskiego piętna genomowego jest niewielka; u myszy prawdopodobnie około dziesięciu genów.

FENOTYPOWE NASTĘPSTWA IZODISOMII U CZŁOWIEKA

Występowanie uniparentalnej disomii pociąga za sobą określone konsekwencje genetyczne i wyjaśnia przypadki dziedziczenia, które nie są zgodne z prawami Mendla (ENGEL 1980). Zdarza się czasami, że przy całkowicie prawidłowym kariotypie, X — recesywna choroba (cecha sprzężona z płcią) jest przenoszona z ojca na syna, a nie na córkę — nosicielkę. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że chromosomy X i Y zygoty pochodziły od ojca a komórka jajowa nie miała chromosomu płci, co wyjaśniono na rycinie 4.

Jest oczywiste, że uniparentalna disomia może prowadzić do ujawnienia się cech (chorób) autosomalnie recesywnych u potomstwa rodziców, z których tylko jeden jest heterozygotą. Opisano kilkoro dzieci ze zwłóknieniem torbielowatym (mukowiscydoza) i wykazano, że oba chromosomy 7 (w tym chromosomie

znajduje się locus genu zwłóknienia torbielowatego) tych pacjentów pochodziły od jednego rodzica, częściej od matki (SPENCE i współaut. 1988).

Ogólnie rzecz biorąc, uniparentalna disomia jest jednak rzadkim powodem ujawniania się homozygot recesywnych: zdarza się to nie częściej niż w 1 : 10 000 przypadków danej genopatii (WARBURTON 1988).

		MIKROGAMETY					
		O	X	Y	$\overline{XY}$	$\underline{XX}$	$\underline{YY}$
MAKROGAMETY	O	OO	OX	OY	$O\overline{XY}$	$O\underline{XX}$	$O\underline{YY}$
	X	XO	XX	XY	$X\overline{XY}$	$X\underline{XX}$	$X\underline{YY}$
	$\overline{XX}$	$\overline{XX}O$	$\overline{XXX}$	$\overline{XXY}$	$\overline{XX}\overline{XY}$	$\overline{XX}\underline{XX}$	$\overline{XX}\underline{YY}$
	$\underline{XX}$	$\underline{XX}O$	$\underline{XXX}$	$\underline{XXY}$	$\underline{XX}\overline{XY}$	$\underline{XX}\underline{XX}$	$\underline{XX}\underline{YY}$

$\overline{XX}$ – nondysjunkcja w I podziale mejotycznym

$\underline{XX}$ – nondysjunkcja w II podziale mejotycznym

Ryc. 4. Nondysjunkcja chromosomów płci i powstawanie uniparentalnej disomii.

Pasjonująca jest historia odkrycia znaczenia izodisomii w patogenezie zespołu Pradera-Willi'ego. U noworodków z tym zespołem występuje wybitna hipotonia mięśniowa, która stopniowo ustępuje. Początkowo duże trudności w odżywianiu zmieniają się w żarłoczność powodującą otyłość z jednoczesnym niedoborem wzrostu. Niedorozwój psychiczny i fizyczny jest połączony z niedorozwojem wewnętrznych i zewnętrznych narządów płciowych. Często pojawia się cukrzyca insulino-oporna. Przeżycie jest skrócone (PRADER i współaut. 1956, CASSIDY 1992).

Od 1981 roku wiadomo, że u połowy pacjentów z zespołem Pradera-Willi'ego występuje częściowa delecja ramienia długiego chromosomu 15, tuż poniżej centromeru, w obszarze prążka 15q11-q13 (CASSIDY 1992). Wykazano, że ta delecja w każdym przypadku dotyczy chromosomu 15 pochodzącego od ojca (BUTLER i współaut. 1986), a parę lat później ukazały się doniesienia oparte o analizę DNA (NICHOLLS i współaut. 1989, OVERHAUSER i współaut. 1989, ROGAN i współaut. 1991), że u tej części pacjentów, u których nie stwierdzono częściowej delecji ramienia długiego chromosomu 15, nie występuje chromosom 15 pochodzący od ojca. Oba chromosomy 15 tych pacjentów pochodzą od matki (BUTLER 1990, CASSIDY 1992). Przyczyną omawianego zespołu jest zatem u części pacjentów uniparentalna disomia.

Znaczenie uniparentalnej disomii w genetycznym uwarunkowaniu powstawania wad rozwojowych znajduje potwierdzenie w innych zespołach wad wrodzonych, na przykład, w zespole Angelmana (ANGELMAN 1965). Anomalia chromosomowa polega również na częściowej delecji regionu 15q11-q13, ale w tym

przypadku brakuje części matczynego chromosomu 15. Powstaje zupełnie inny fenotyp, w części przeciwstawny do zespołu Pradera-Willi'ego: wzrost jest normalny, masa ciała jest również normalna i nie występuje hipotonia mięśniowa. Dla zespołu Angelmana są bardzo charakterystyczne symetryczne ataktyczne ruchy i zaburzenia poruszania się. Dzieci mają duże usta, zaczerwienione policzki, stale się śmieją i z tego powodu zespół Angelmana jest nazywany „syndromem szczęśliwej kukielki” (KNOLL i współaut. 1989, MAGENIS i współaut. 1990, PEMBREY i współaut. 1989).

Jak już wspomniano, u części pacjentów z zespołem Angelmana stwierdza się delecję fragmentu matczynego chromosomu 15. U tych pacjentów, u których delecja nie występuje, można wykazać uniparentalną disomię ojcowskiego chromosomu 15.

GENOMOWY IMPRINTING I ALLELICZNE WYKLUCZENIE

U organizmów diploidalnych alleliczne wykluczenie, w wyniku którego tylko jeden z dwóch alleli jest aktywny, doprowadza do funkcjonalnej (nie strukturalnej!) haploidalności. Zjawisko allelicznego wykluczenia jest znane w odniesieniu do genów dla immunoglobulin od 1965 roku. Diploidalne komórki produkujące immunoglobuliny nie używają obydwu autosomalnych alleli; dana komórka produkuje jedynie jedną specyficzną immunoglobulinę. Mechanizm odpowiedzialny za to zjawisko został wówczas nazwany allelicznym wykluczeniem (WELER 1965). Uważano, że mechanizm tego zjawiska polega na specyficznej regulacji funkcji genu, po powstaniu — w wyniku połączenia się różnych (V-D-J) domen DNA — funkcjonalnego genu dla immunoglobuliny. Obecnie wydaje się, że jest możliwa inna interpretacja tego zjawiska (HOLLIDAY 1990), a mianowicie doświadczenia na transgenicznym myszach wykazały, że jeżeli istnieją już funkcjonalne geny dla immunoglobulin, to ukształtowanie następnych genów jest przez nie blokowane.

Są znane również inne przykłady allelicznego wykluczenia. Nowe mutacje mogą być *in vitro* łatwo indukowane w komórkach linii CHO (wyprowadzonej z jajnika chomika chińskiego) przez standardowe silne mutageny, jak na przykład EMS, a liczne rewersje tych mutacji zachodzą niespodziewanie pod wpływem słabego mutagenu jakim jest 5-azacytydyna, posiadająca właściwości demetylujące. Wyniki te sugerują, że komórki wstępnie posiadały allel aktywny i allel nieaktywny (metylowany). Pierwszy allel był wystawiony na działanie mutagenu i zmutował, natomiast drugi uaktywnił się po demetylacji (HOLLIDAY 1990). Powyższy mechanizm został potwierdzony podczas doświadczeń na innych genach (MONK i GRANT 1990, REIK i współaut. 1987).

Doświadczenia *in vitro* pozwoliły na dość dobre poznanie wpływu procesów metylacji na alleliczne wykluczenie. Do tej pory bardzo niewiele jednak wiadomo o tych mechanizmach zachodzących *in vivo* u ssaków. Genomowy imprinting, powodujący alleliczne wykluczenie, prawdopodobnie może powodować znaczne odchylenie od statystycznie spodziewanych proporcji alleli u potomstwa. Jest przy tym mniej istotne, czy alleliczne wykluczenie jest wynikiem genomowego imprintingu u matki czy u ojca.

ZMIENNY WIEK WYSTĘPOWANIA DOMINUJĄCYCH GENOPATII

Badania przeprowadzone na transgenicznym myszach dowodzą, że genomowy imprinting działa również na poziomie pojedynczego miejsca genowego. Wykazano, że wzór metylacyjny wokół wstawionego transgenu i jego transkrypcyjna aktywność mogą się w mysim płodzie różnić w zależności od płci rodzica, od którego pochodzi (REIK i współaut. 1987, SAPIENZA i współaut. 1987). Różnice te mogą być tkankowo specyficzne, dlatego też istotne jest badanie wzorów metylacji na poziomie pojedynczego locus, a nie na poziomie genomu oraz w tkance, a nie na poziomie całego organizmu.

U człowieka spośród autosomalno-dominujących genopatii występują takie, w których wiek występowania i/lub ciężkość objawów jest zależna od płci dotkniętego chorobą rodzica. Płasawica Huntingtona wykazuje szeroką zmienność, jeżeli chodzi o wiek występowania pierwszych objawów. Gdy patologiczny gen jest dziedziczony od ojca, objawy chorobowe występują wcześniej (średnio w 33 roku życia), a gdy gen pochodzi od matki objawy występują później (średnio w 42 roku życia) (MYERS i współaut. 1982, 1983). Ta statystycznie istotna różnica może być tłumaczona rodzicielskim piętnem genomowym, które poprzez metylowanie redukuje aktywność normalnego allelu pochodzącego od matki, z pozostawieniem — jako allelu funkcjonującego — allelu płasawicy Huntingtona pochodzącego od ojca (CLARKE 1990).

Powyższa teza nie jest jednak molekularnie udowodniona, tym bardziej, że potrzebny jest dowód, iż istotnie imprinting jest odwracany przy każdym przejściu chromosomu przez linię komórek płciowych. Pośredni dowód na to odwracanie dostarczyły badania wykazujące, że w płasawicy Huntingtona modyfikujący wpływ płci obciążonego rodzica występuje w pojedynczej rodzicielskiej generacji, a nie jest kumulowany przez poszczególne pokolenia (MYERS i współaut. 1985).

Dystrofia miotoniczna jest przykładem choroby, w której występuje zjawisko antycypacji (HOWELER i współaut. 1989) polegającej na tym, że objawy chorobowe u potomstwa są bardziej nasilone i manifestują się wcześniej niż u rodziców. U większości nosicieli mutacji zaniki mięśniowe występują w drugiej, trzeciej lub w czwartej dekadzie życia. Największą osobliwością w tym zespole jest istnienie u potomstwa obciążonych matek ciężkiej miopatii manifestującej się już podczas życia wewnątrzmacicznego. Rodzicielskie piętno genomowe mogłoby być wyjaśnieniem dla takiego wczesnego występowania objawów chorobowych, ale do tej pory brak bezpośrednich dowodów prawdziwości tej tezy.

RODZINNE WYSTĘPOWANIE NOWOTWORÓW

Interesujące dowody na kliniczne znaczenie genomowego piętna rodzicielskiego dla funkcjonowania pojedynczego genu zostały dostarczone poprzez odkrycia onkologiczne. Dobrym przykładem są tu obserwacje nowotworu kłębka. Dominujący gen powodujący powstanie tego rzadkiego, łagodnego nowotworu

manifestuje się jedynie u tych osób, które odziedziczyły go po ojcu. Model dziedziczenia jest więc taki, że matczyny gen jest inaktywowany podczas oogenezy i może być ponownie aktywowany podczas spermatogenezy (MEY i współaut. 1989).

Przed rozwojem recesywnego nowotworu obydwa allele jego supresorowego genu są traczone; pierwszy przez mutację a drugi często przez somatyczną rekombinację i/lub nondysjunkcję. W nowotworze Wilmsa związanym z delecją 11p, w retinoblastoma i w osteosarcoma, w których utrata następuje w 13q, chromosom matczyny jest gubiony dużo częściej niż ojcowski.

W rodzinnych przypadkach siatkówczaka muszą ulec mutacji obie homologiczne kopie genu retinoblastoma, których locus znajduje się w chromosomie 13 i dopiero wówczas jest możliwa transformacja nowotworowa. Jeden z allelicznych genów retinoblastoma (*RBI*) ulega często delecji w linii zarodkowej, zwykle w ojcowskim chromosomie 13. Ten ojcowski gen *RBI* jest także często zmutowany w sporadycznych przypadkach osteosarcoma (ale nie w sporadycznych przypadkach retinoblastoma), co powoduje, że przeżywające osoby z rodzinnym retinoblastoma są bardzo podatne na sarcoma. Dla wyjaśnienia preferencyjnego zatrzymywania ojcowskiego chromosomu w osteosarcoma przyjmuje się, iż imprinting powoduje, że chromosomy są różnie podatne na mutacje, a matczyny allel może być względnie tłumiony przez metylację. Zatem, aby rozwinął się proces nowotworowy allel matczyny powinien być utracony. W znacznej części recesywnych nowotworów region chromosomowy, który jest uznawany za niosący mutację, pozostaje heterozygotyczny. Zdaje się to dowodzić, że imprinting może czasami uczynić jeden z alleli całkowicie nieaktywny i dlatego nie jest on gubiony.

OPÓŹNIENIE UMYSŁOWE ZWIĄZANE Z KRUCHYM CHROMOSOMEM X

Najczęstszą przyczyną genetycznie uwarunkowanego niedorozwoju umysłowego wśród mężczyzn jest zespół MARTINA i BELLA (1943), którego cytogenetyczną cechą jest łamliwość chromosomu X w prążku Xq27.3 (SUTHERLAND i ASHFORTH 1979). Zespół zasługuje na szczególną wagę ze względu na odstępstwa od znanych reguł dziedziczenia. Około 30% nosicielek tego genu wykazuje upośledzenie umysłowe, podczas gdy 20% mężczyzn posiadających ten gen jest umysłowo normalnych. Występują także różnice w spodziewanej częstości tego syndromu u braci obciążonych mężczyzn (SHERMAN i współaut. 1984, 1985). Liczne odmienności w dziedziczeniu tego zespołu spowodowały rozwój badań zmierzających do ich wyjaśnienia (BROWN i współaut. 1987, STEINBACH 1986).

Model dziedziczenia zespołu łamliwego chromosomu X zaproponowany przez Lairda (LAIRD 1987, LAIRD i współaut. 1990) jest oparty na genomowym imprintingu. Ujawnienie lub nieujawnienie się objawów chorobowych sprowadza się do różnic pomiędzy zmutowanym (ale nie poddanym imprintingowi) chromosomem Fra-X i zmutowanym (i poddanym imprintingowi) chromosomem Fra-X. Występowanie cytogenetycznego objawu, jakim jest łamliwość chromosomu X w prążku q27.3 jest, zdaniem Lairda, zależne od imprintingu. Chromosom X z mutacją Fra-X poddany procesowi imprintingu ma być łamliwy, natomiast

chromosom z tą samą mutacją, ale nie poddany procesowi imprintingu ma być niełamiwym.

Mężczyźni z pełnymi objawami zespołu Martina-Bella posiadają zmutowany, aktywny chromosom X nie poddany procesowi imprintingu (LAIRD 1987, LAIRD i współaut. 1990). U mężczyzn, którzy odziedziczyli chromosom Fra-X, a nie są chorzy, występuje miejscowy imprinting mutacji Fra-X. Kobiety-nosicielki przejawiają niektóre cechy tego zespołu w zależności od przypadkowej inaktywacji (lyonizacji) chromosomu X. Mogą one uniknąć objawów chorobowych, jeżeli inaktywacji ulegnie więcej niż 50% komórek z mutacją kruchego chromosomu X. Powyższy model wymaga jednak doświadczalnego potwierdzenia.

POSTULOWANE MEJOTYCZNE MECHANIZMY GENOMOWEGO IMPRINTINGU

Dotychczas zebrane dane wskazują, że rodzicielskie piętno genomowe w sposób niezmienny przechodzi przez podział mitotyczny, ale może zostać wymazane podczas podziału mejotycznego. HULTEN i HALL (1990) sugerują istnienie poniższych etapów mechanizmu genomowego imprintingu:

- wymazanie jakiegoś poprzedniego piętna genomowego;
- naniesienie nowej modyfikacji rodzicielskiego genomu;
- tkankowo specyficzna fenotypowa ekspresja rodzicielskiego imprintingu u potomstwa.

Inaktywowany chromosom X samicy ssaka jest całkowicie aktywny u potomstwa. W przypadku zygoty XY pozostaje aktywny we wszystkich komórkach potomnych, a w przypadku zygoty XX może znowu ulec genetycznej inaktywacji. Być może, że ten ogólnie znany proces lyonizacji chromosomu X jest szczególnym przypadkiem, nałożonym na generalne mechanizmy autosomalnego imprintingu. Molekularne mechanizmy piętna genomowego zdają się być powiązane z metylacją CpG. Metylacja związana z rozrodczą linią komórek mogłaby mieć miejsce podczas podziałów mitotycznych poprzedzających mejozę lub podziałów mejotycznych, lub w okresie pomejotycznym. Z badań wynika (MONK 1988), że u myszy zjawisko autosomalnego imprintingu zachodzi w mejozie wraz z metylacją. Metylacja wywiera wpływ na konfigurację chromatyny i raz podczas gametogenezy wprowadzona do chromosomów mogłaby być powielana aż do chwili aktywacji danego genu.

Proces wymazania poprzedniego i naniesienia nowego imprintingu zachodzi w profazie I podziału mejotycznego, w stadiach zygotenu i pachytenu, w których matczyne i ojcowskie homologi są ściśle sparowane (HULTEN i HALL 1990). Zdaniem tych autorów jest również prawdopodobne, że po normalnie przebiegającym procesie pachytenowej koniugacji nie powinno nic pozostać z poprzedniej „chromosomowej pamięci”, zaburzenie procesu koniugacji może prowadzić do zaburzenia zapisu nowego rodzicielskiego piętna genomowego. Krytycznym momentem prawidłowości przebiegu zmiany imprintingu miałyby być stopień kondensacji chromatyny w pachytenie. Im mniej są skondensowane chromosomy mejotyczne, tym łatwiej może przebiegać proces demetylacji lub metylacji i na odwrót. Interesujące jest, że u człowieka występuje zależna od płci różnica w długości chromosomów pachytenowych: żeńskie są w przybliżeniu 50%

dłuższe niż męskie (WALLACE i HULTEN 1985). Ta istotna różnica w długości chromosomów może być morfologicznym wykładnikiem odmienności w genomowym imprintingu pomiędzy płcią męską a żeńską.

EWOLUCYJNY ROZWÓJ GENOMOWEGO IMPRINTINGU

CHANDRA i NANJUDIAH (1990) zakładają 3 możliwe drogi ewolucyjnego rozwoju genomowego imprintingu, a mianowicie:

a. Imprinting może być korzystny sam w sobie, gdy wdrukowane i niewdrukowane allele tego samego locus dają inne fenotypy. U pewnych organizmów determinowanie płci może być spowodowane imprintingiem; tym samym matczyzna kontrola płci potomstwa jest możliwa, korzystną konsekwencją imprintingu.

b. Geny odpowiedzialne za imprinting mogą mieć plejotropowe efekty i mogą ulegać selekcji z różnych innych powodów. Nie ma do tej pory dowodów na taką ewolucję genomowego imprintingu.

c. Genomowy imprinting mógłby koewoluować wraz z innymi cechami. Takimi innymi cechami mogłyby być na przykład powodowanie, że androgenetyczne i gynogenetyczne diploidy nie są zdolne do rowoju oraz wzmacnianie znaczenia anizogamii w rozmnażaniu płciowym.

Za genomowy imprinting są odpowiedzialne procesy metylacji DNA, jak to udowodniono metodami biochemicznymi (cięcie enzymami restrykcyjnymi). Jest jednak cały szereg pytań, na które nie ma odpowiedzi, na przykład:

- Czy metylacja poprzedza czy następuje po inaktywacji lub reaktywacji genów sprzężonych z chromosomem X?
- Pewne transgeny są różnie metylowane w plemnikach i w komórkach jajowych. Nie wiadomo jednak, jak dalece jest ten wzór następnie dziedziczony.

Na podstawie szeregu badań wiadomo obecnie, że genom plemników jest bardziej metylowany niż genom jaja, chociaż obydwa są ogólnie niedometylowane w porównaniu z tkankami somatycznymi. Wydaje się ponadto, że po zapłodnieniu następuje proces demetylacji. W zarodku przed implantacją nie ma dla wszystkich sekwencji dużego sygnału procesu metylacji *de novo*. Wykrywalna metylacja *de novo* rozpoczyna się blisko momentu implantacji i wzrasta podczas gastrulacji.

GENOMIC IMPRINTING IN MAN

S u m m a r y

Problems of genomic imprinting in man are presented. Genomic imprinting in mammals is also analyzed; its influence on sex determination and inheritance of some of X-linked syndromes as well as influence of imprinting on development of embryonic and extraembryonic tissues. Phenotype consequences of uniparental disomy are showed, also in the aspect of genome imprinting. The dependence of phenotypic expression of genetic dominant disorders and familiar cancers on genomic imprinting in man is also discussed.

LITERATURA

- ANGELMAN H., 1965. „Puppet” children: a report on three cases. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 7, 681–683.
- BARTSCH O., HÜBNER H., MORDALSKA A., 1992. Powstawanie i znaczenie uniparentalnej disomii. *Post. Biol. Kom.*, 19, 311–322.
- BROWN S. W., BENNETT F. D., 1957. On sex determination in the diaspine scale *Pseudaulacaspis pentagona* (TARG.) (Coccoidea). *Genetics*, 42, 510–523.
- BROWN S. W., NELSON-REES W. A., 1961. Radiation analysis of a lecanoid genetic system. *Genetics*, 46, 983–1007.
- BROWN W. T., SHERMAN S. L., DOBKIN C. S., 1987. Hypothesis regarding the nature of the fragile X mutation. *Hum. Genet.*, 75, 294–295.
- BUTLER M. G., 1990. Prader-Willi Syndrome: Current Understanding of Cause and Diagnosis. *Amer. J. Med. Genet.*, 35, 319–332.
- BUTLER M. G., MEANEY F. J., PALMER C. G., 1986. Clinical and Cytogenetic Survey of 39 Individuals With Prader-Labhart-Willi Syndrome. *Amer. J. Med. Genet.*, 23, 793–809.
- CASSIDY S. B., 1992. Conference Report: First International Scientific Workshop on Prader-Willi Syndrome and other Chromosome 15 Deletion Disorder. *Amer. J. Med. Genet.*, 42, 220–269.
- CHANDRA H. S., NANJUDIAH V., 1990. The evolution of genomic imprinting. *Development*, suppl. 47–53.
- CLARKE A., 1990. Genetic imprinting in clinical genetics. *Development Suppl.* 131–139.
- CROUSE H. V., 1960. The controlling element in sex chromosome behaviour in *Sciara*. *Genetics*, 45, 1425–1443.
- CROUSE H. V., 1966. An inducible change in state on the chromosomes of *Sciara*: Its effects on the genetic components of the X. *Chromosoma*, 18, 230–253.
- CROUSE H. V., BROWN A., MUNFROD B. C., 1971. L-chromosome inheritance and the problem of „imprinting” in *Sciara* (*Sciariidae*, *Diptera*). *Chromosoma*, 34, 324–339.
- ENGEL E., 1980. A New Genetic Concept: Uniparental Disomy and Its Potential Effect, Isodisomy. *Am. J. Med. Genet.* 6, 137–143.
- HOLLIDAY R., 1990. Genomic imprinting and allelic exclusion. *Development*, Suppl. 125–129.
- HOWELER C. J., BUSCH H. F. M., GERAEDTS J. P. M., NIERMEIJER M. F., STAAL A., 1989. Anticipation in myotonic dystrophy: Fact or fiction. *Brain*, 112, 779–797.
- HULTEN M. A., HALL J. G., 1990. Proposed meiotic mechanism of genomic imprinting. *Chromosomes Today*, 10, 157–162.
- KITCHIN R. M., 1970. A radiation analysis of a *Comstockiella* chromosome system: destruction of heterochromatic chromosomes during spermatogenesis in *Parlatoria oleae*. *Chromosoma*, 31, 165–197.
- KNOLL J. H. M., NICHOLS R. D., MAGENIS R. E., GRAHAM J. M. Jr., LALANDE M., LATT S. A., 1989. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but different in parental origin of the deletion. *Amer. J. Med. Genet.* 32, 285–290.
- LAIRD C. D., 1987. Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile-X syndrome of mental retardation. *Genetics*, 117, 587–599.
- LAIRD C. D., SVED J., THORNE J., LAMB M., 1990. The X-inactivation imprinting model of the fragile-X syndrome: annotated references. *Chromosome Today*, 10, 163–165.
- LAWLER S. D., POVEY S., FISHER R. A., PICKTHAL V. J., 1982. Genetic studies on hydatidiform moles. II. The origin of complete moles. *Ann. Hum. Genet.*, 46, 209–222.
- LYON M. F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature*, 190, 372–373.
- LYON M. F., 1991. The quest for the X-inactivation centre. *Trends Genet.*, 7, 69–70.
- MAGENIS R. E., TOTH-FEJEL S., ALLEN L. J., BLACK M., BROWN M. G., BUDDEN S., COHEN R., FRIEDMAN J. M., KALOUSEK D., ZONANA J., LACY D., LAFRANCHI S., LAHR M., MAFARLANE J., WILLIAMS C. P. N., 1990. Comparison of the 15q Deletion in Prader-Willi and Angelman Syndromes: Specific Regions, Extent of Deletions, Parental Origin, and Clinical Consequences. *Amer. J. Med. Genet.*, 35, 333–349.
- MARTIN J. P., BELL J., 1943. A pedigree of mental defect showing sex-linkage. *J. Neurol. Psychiatr.*, 6, 154–157.
- MEY VAN DER A. G. L., MAASWINKEL-MOOPY P. D., CORNELISSE C. J., SCHMIDT P. H., KAMP VAN DER J. J. P., 1989. Genomic imprinting in hereditary glomus tumours: Evidence for new genetic theory. *Lancet*, ii, 1291–1294.
- MONK M., 1988. Genomic imprinting. *Genes and Development*, 2, 921–925.

- MONK M., GRANT M., 1990. *Preferential X-chromosome inactivation DNA methylation and imprinting*. Development, Suppl. 55-62.
- MYERS R. H., CUPPLES L. A., SCHOENFELD M., D'AGOSTINO R. B., TERRIN N. C., GOLDBAKHER N., WOLF P. A., 1985. *Maternal factors in onset of Huntington Disease*. Am. J. Hum. Genet., 37, 511-521.
- MYERS R. H., GOLDMAN D., BIRD E. D., SAX D. S., MERRIL C. R., SCHONFELD M., WOLF P. A., 1983. *Maternal transmission in Huntington's disease*. Lancet, 1, 208-210.
- MYERS R. H., MADDEN J. J., TEAGUE J. L., FALEK A., 1982. *Factors related to onset age of Huntington disease*. Am. J. Hum. Genet., 34, 481-488.
- NICHOLLS R. D., KNOLL J. H. M., BUTLER M. G., KARAM S., LALANDE M., 1989. *Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome*. Nature, 342, 281-285.
- OVERHAUSER J., LEE-CHEN G.-J., MCMAHAN J., WASMUTH J., OBERLENDER S., CARLIN M. E., NIEBUHR E., 1989. *Paternal inheritance of the deleted chromosome 5 in most cri du chat syndrome patients*. Amer. J. Hum. Genet., 45, A 330.
- PEMBREY M., FENNEL S. J., BERGHE VAN DER J., FITCHETT M., SUMMERS D., BUTLER L., CLARKE C., GRIFFITHS M., THOMPSON E., SUPER M., BARATISER M., 1989. *The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13*. J. Med. Genet., 26, 73-77.
- PRADER A., LABHART A., WILLI H., 1956. *Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie und myotonieartigen Zustand in Neugeborenenalter*. Schweiz. Med. Wochenschr., 86, 1260-1261.
- REIK W., COLLICK A., NORRIS M. L., BARTON S. C., SURANI M. A., 1987. *Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice*. Nature, 328, 248-251.
- ROGAN P. K., MASCARI M. J., LADDA R. L., GOTTLIEB W., NICHOLS R. D., 1991. *The origin of maternal disomy in Prader-Willi Syndrome*. Am. J. Hum. Genet., 49, 287 suppl.
- SAPIENZA C., PETERSON A. C., ROSSANT J., BALLING R., 1987. *Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin*. Nature, 328, 251-254.
- SEARLE A. G., BEECHY C. V., 1978. *Complementation studies with mouse translocations*. Cytogenet. Cell Genet., 20, 282-303.
- SHERMAN S. L., JACOBS P. A., MORTON N. E., PROSTER-ISKIENIUS U., HOWARD-PEEBLES P. N., NIELSEN K. B., PARTINGTON M. W., SUTHERLAND G. R., TURNER G., WATSON M., 1985. *Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males*. Hum. Genet., 69, 289-299.
- SHERMAN S. L., MORTON N. E., JACOBS P. A., TURNER G., 1984. *The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis*. Ann. Hum. Genet., 48, 21-37.
- SPENCE J. E., PERCIACCANTE R. G., CREIG G. M., WILLARD H. F., LEDBETTER D. H., HEJTMANCIK J. F., POLLACK M. S., O'BRIEN W. E., BEAUDET A. L., 1988. *Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease*. Am. J. Hum. Genet., 42, 217-226.
- STEINBACH P., 1986. *Mental impairment in Martin-Bell syndrome is probably determined by interaction of several genes: simple explanation of phenotypic differences between unaffected and affected males with the same X chromosomes*. Hum. Genet. 72, 248-252.
- SURANI M. A. H., BARTON S. C., NORRIS M. L., 1984. *Development of reconstituted mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome*. Cell, 50, 127-136.
- SURANI M. A. H., KOTHARY R., ALLEN N. D., SINGH P. B., FUNDELE R. F., FERGUSON-SMITH A. C., BARTON S. C., 1990. *Genome imprinting and development in the mouse*. Development, suppl. 89-98.
- SURANI M. A., REIK W., ALLEN N. D., 1988. *Transgenes as molecular probes for genomic imprinting*. Trends Genet., 4, 59-62.
- SUTHERLAND G. R., ASHFORTH P. L. C., 1979. *X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq26 or 27*. Hum. Genet., 48, 117-120.
- SWAIN J. L., STEWART T. A., LEDER P., 1987. *Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting*. Cell, 50, 719-727.
- WALLACE B. M. N., HULTEN M. A., 1985. *Meiotic chromosome pairing in the normal human female*. Ann. Hum. Genet., 49, 215-226.
- WARBURTON D., 1988. *Editorial: Uniparental Disomy: A rare consequence of the high rate of aneuploidy in human gametes*. Am. J. Hum. Genet., 42, 1069-1074.
- WEILER E., 1965. *Differential activity of allelic γ -globulin genes in antibody-producing cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54, 1765-1772.
- WILLISON K., 1991. *Opposite imprinting of the mouse Igf2 and Igf2r genes*. Trends Genet. 7, 107-109.

DANUTA ROŻYŃKOWA

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie
Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin

PERSPEKTYWY GENETYCZNYCH BADAŃ NOWOTWORÓW — ODKRYCIA I WIZJE

W słowie „nowotwór” wyraża się fakt powstania nowego, odmiennego rodzaju komórek z pojedynczej, zdrowej komórki danego osobnika. Ewolucja i onkogeneza mają wiele wspólnego i te dwa procesy przeplatają się wzajemnie prawdopodobnie od zarania życia — pisze JEAN DE GROUCHY (1991). Ewolucja chromosomów w filogenezie naczelnych i wielu gatunków ssaków została potwierdzona porównawczymi „mapami” chromosomów (KLINGER 1963, LEJEUNE i współaut. 1973, YUNIS i PARKASH 1982). Z drugiej strony wiadomo, że ewolucji klonalnej komórek nowotworowych towarzyszą rearanżacje chromosomów. Jak dalece odbiega genom nowotworu od macierzystego, postaram się zilustrować badaniami cytogenetycznymi, molekularnymi i doświadczalnymi.

Proces nowotworowy jest wieloetapowy. Model ewolucji klonalnej jest różny dla różnych nowotworów tkankowo-swoistych i ściśle związany z regulacjami metabolicznymi danego klonu komórkowego. Jednak z reguły dotyczą one zmian genów regulujących replikację DNA i podział komórki lub procesy różnicowania. Są to mechanizmy leżące u podstaw rozwoju w szerokim tego słowa znaczeniu, przy czym, jeśli różnicowanie jest czymś przeciwnym do podziału komórki zwierzęcej, to niekontrolowane podziały komórkowe lub akumulacja komórek z uszkodzonym DNA sygnalizują nieobecność cząsteczek „na straży” znaczących punktów kontrolnych komórki (LANE 1992). Z obliczeń wynika, że częstość somatycznych rearanżacji DNA jest na ogół bardzo wysoka, sięgając prawie kilku na sto mitoz, lecz częstość mitoz prowadzących do nowotworu wynosi tylko jedną na bilion, choć, co prawda, u co piątego osobnika. Większość mutacji jest usuwana przez system naprawczy DNA, a komórki z dużą zmianą genetyczną giną.

W zmutowanej komórce, by stała się nowotworową, muszą zajść dodatkowe zmiany: unieśmiertelnienie, przemieszczenie i następnie mutacje w miejscach genomu ważnych dla regulacji procesów komórkowych, na przykład w protoonkogenie, genie regulującym jego aktywność albo genie przeciwnowotworowym (WEINBERG 1985). Nie znamy jeszcze całego zestawu tych genów. Dla orientacji przedstawiam ich kategorie za KORSMEYEREM (1992) w tabeli 1.

Tabela 1

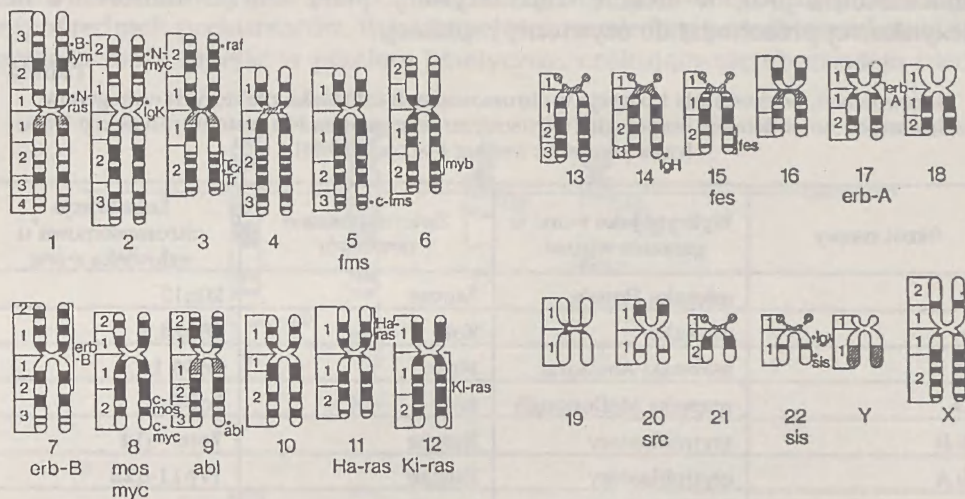
Kategorie komórkowych onkogenów i ich wpływu na wzrost nowotworów
(według S. J. KORSMEYER'A 1992)

Kategoria I:	Geny kodujące czynniki wzrostu i proliferacji Czynniki transkrypcji lub ogniwa transdukcji sygnałów Przykładowo: <i>MYC</i> , <i>RAS</i> , <i>ABL</i> Decyduje zwiększenie funkcji
Kategoria II:	Geny supresji nowotworów-przeciwnowotworowe Hamowanie wzrostu i proliferacji Przykładowo: <i>Rb</i> , <i>p53</i> Decyduje utrata funkcji
Kategoria III:	Geny programowej śmierci komórki A. Uchylające programowaną śmierć <i>BCL-2</i> B. Geny „drogi ku śmierci” <i>p53</i> Decyduje utrata funkcji

TRANSLOKACJE CHROMOSOMÓW W HEMATOLOGII

Badając pod mikroskopem chromosomy komórek nowotworowych znajdujemy wiele zmian: braki lub naddatki, wzajemne translokacje dwóch różnych chromosomów, delecje częściowe, a czasem figurki bardzo małych fragmentów chromosomowych (ang. double minutes) lub region chromosomu barwiący się jednolicie, tak zwane HSR (ang. homogeneously staining region). Uważa się je za cytologiczne efekty amplifikacji genów. Dzięki dużemu postępowi barwień i metod synchronizacji hodowli obserwator może oceniać wzory prążkowe identyfikujące poszczególne pary chromosomów i może opisywać nieprzypadkowe ich zmiany w przebiegu nowotworu. Oddzielone translokowane nadatki można poddać analizie molekularnej by identyfikować geny, które leżą w krytycznych fragmentach i które przez zmianę pozycji przyczyniają się do złośliwego wzrostu (CORY 1987). Chromosomowa lokalizacja wielu protoonkogenów (ryc. 1) i dowody na nieprzypadkowość anomalii chromosomowej pozwoliły rozwinąć fascynujące scenariusze zdarzeń, które mogą stanowić prelude nowotworowej transformacji i dalej klonalnej selekcji (porównaj ROŻYŃKOWA i RUPNIEWSKA 1989).

Oryginalną zmianą chromosomową w nowotworach hemo- i limfopoetycznych jest w wielu przypadkach translokacja. Jej wynikiem może być efekt pozycji przez deregulację jakiegoś genu z powodu nowego sąsiedztwa lub utworzenia nowego produktu genowego. Przykładem jest chłoniak Burkitt'a i przewlekła białaczka szpikowa. Chłoniak Burkitt'a występuje często w dzieciństwie u ludzi żyjących w tropikalnych obszarach Afryki. Zmiany chromosomowe w komórkach guza są dobrze poznane, mianowicie 90% chorych ma wzajemną translokację w obrębie chromosomów 8 i 14, a reszta — translokację chromosomów 8 i 2 lub 8 i 22, co zapisuje się t/8;14/ /q24;q31/, t/2;14/ /p12;q24/ i t/14;22/ /q31;q11/ (ryc. 2B). W miejscach złamań poprzedzających translokację chromosomy 14,2 i 22 noszą geny strukturalne immunoglobulin, mianowicie łańcucha ciężkiego i łańcuchów lekkich odpowiednio kappa i lambda. Komórkowy



Ryc. 1. Kariotyp człowieka z zaznaczeniem pozycji niektórych komórkowych onkogenów.

ekwiwalent wirusowego *v-myc* czyli *c-myc* jest zlokalizowany w chromosomie 8, długim q24. Okazało się, że punkt złamania we wszystkich trzech translokacjach jest wewnątrz genu *c-myc*. Jego egzony są przemieszczone do miejsca skupiającego geny *Ig* (CROCE i NOWELL 1986, DALLA-FAVERA i współaut. 1982). Taką zmianę zauważono także w dużej liczbie chłoniaków u myszy, gdzie translokacja dokonuje się między chromosomami 12 i 15, które noszą gen *Ig* i *c-myc* odpowiednio (ADAMS i współaut. 1983).

W innym nowotworze, mianowicie chłoniaku grudkowym, rozwijającym się z centroblastów i centrocytów — ośrodków rozmnażania grudek chłonnych, wykryto inny onkogen, nie mający wirusowego homologu, nazywany *BCL-2* (ang. B-cell lymphoma/leukemia) (TSUJIMOTO i współaut. 1985). Temu chłoniakowi towarzyszy translokacja genu *BCL-2* z punktu złamania w chromosomie 18 do jednoczesnego miejsca złamania w chromosomie 14,2 lub 22, która podobnie jak poprzednio gen *myc* zestawia tym razem gen *BCL-2* z elementem regulatorowym genu strukturalnego (KOCKI i ROŻYŃKOWA 1991). Cały szereg późniejszych doświadczeń scharakteryzował ten gen jako najciekawszy regulator programowanej śmierci komórek (KORSMEYER 1992, ROŻYŃKOWA 1994).

Geny strukturalne immunoglobulin w limfocytach pre-B, dojrzewających do plazmocytów wydzielających przeciwciała, z natury swej podlegają serii przekształceń, jak rekombinacje, wycinania RNA, mutacje i podobne, zapewniające dużą różnorodność swoistych przeciwciał. Można przypuszczać, że przemieszczenie onkogenu *myc* do „rojowiska” genetycznej aktywności i jego amplifikacja odgrywa znaczną rolę w patogenezie guza Burkitt'a przez nadmierną nie regulowaną ekspresję. Produkt protoonkogenów rodziny *MYC* jest czynnikiem transkrypcji, wiążąc w sposób swoisty sekwencję zasad CACGTG w DNA odanego genu przez domenę transaktywacyjną TAD (ang. transactivation domain) usytuowaną w końcu aminowym. Ta domena białkowa wiąże także produkt genu

retinoblastoma pRb. W efekcie transaktywacji przez *c-MYC* komórka z fazy spoczynkowej przechodzi do ożywionej replikacji.

Tabela 2

Nazewnictwo, pochodzenie i pozycja w chromosomach człowieka niektórych onkogenów, izolowanych na podstawie homologii z wirusowymi onkogenami lub testem transfekcji DNA; (zmodyfikowane według MALCOLM 1984)

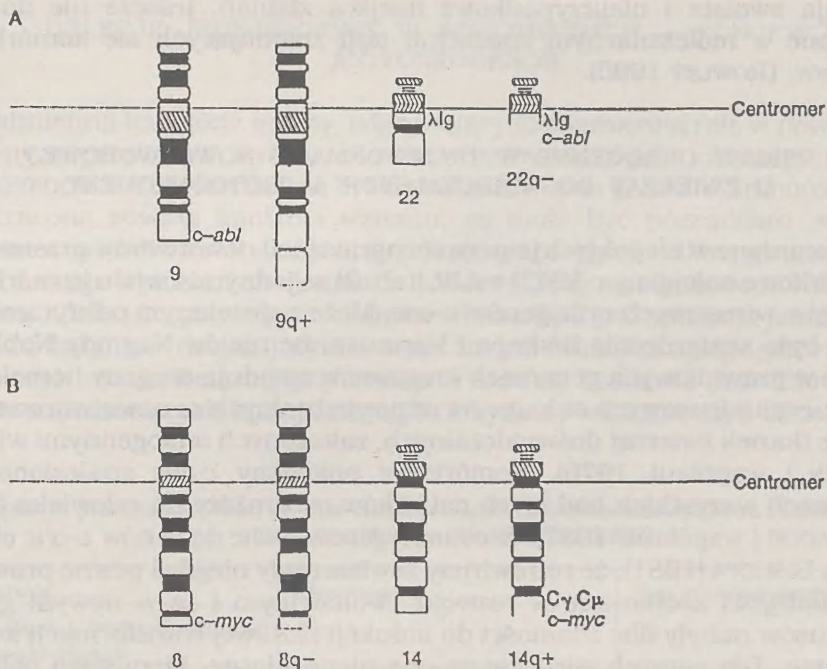
Skrót nazwy	Wykryty jako v-onc w genomie wirusa:	Zwierzę noszące nowotwór	Lokalizacja chromosomowa u człowieka <i>c-onc</i>
<i>src</i>	mięsaka Rous'a	Kurczę	20q13
<i>fes</i>	mięsaka	Kot	15q26.1
<i>abl</i>	białaczkii Abelsona	Mysz	9q34.1
<i>fms</i>	mięsaka McDonough	Kot	5q34
<i>erb B</i>	erytroblastozy	Kurczę	7pter-q12
<i>erb A</i>	erytroblastozy	Kurczę	17p11-q22
<i>mos</i>	mięsaka Moloney'a	Mysz	8q22
<i>raf</i>	mięsaka 3611	Mysz	3p25
<i>Ha-ras</i>	mięsaka Harvey'a	Mysz	11p15
<i>Ki-ras</i>	mięsaka Kirstena	Szczur	12p12
<i>myc</i>	myelocytomatozy MC29	Kurczę	8q24
<i>myb</i>	myeloblastozy BA3-A	Kurczę	6q21-24
<i>fos</i>	mięsaka kości FBJ	Mysz	14q21-31
<i>sis</i>	mięsaka	Małpa wcinista	22q13.1

Użyte skróty: p — ramię krótkie chromosomu, q — ramię długie chromosomu oraz kolejność prążków i podprążków liczonych od centromeru.

Sama translokacja chromosomowa nie jest jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za powstanie nowotworu. Badania epidemiologiczne przemawiają za dodatkowymi zjawiskami. Jednym jest zakażenie pierwotniakiem malarii (*Plasmodium falciparum*), stwarzające przewlekłą stymulację antygenową u mieszkańców tropikalnej Afryki. Guz Burkitt'a może jednak sporadycznie występować w jakiegokolwiek części świata i główną rolę w unieśmiertelnianiu komórek B odgrywa zakażenie wirusem Epstein-Barr, który jest wirusem DNA z rodziny opryszczki, *herpetoviridae* (EPSTEIN i ACHONG 1983). Wirus ten jest zdolny do unieśmiertelniania limfocytów B przy udziale antygenu EBNA-1 (ang. Epstein-Barr virus nuclear antigen). Można przyjąć, że w takiej komórce preneoplastycznej dodatkowe zdarzenie translokacji chromosomowej wraz z nadmierną ekspresją genu *c-myc* zaburza proces dojrzewania i różnicowania limfocytów B, zwłaszcza, że przewlekła stymulacja malarią obniża liczbę współpracujących regulatorowych limfocytów T. Role tego czynnika w krajach Europy i Ameryki może spełniać wirus HIV (DOUGLAS i współaut. 1980, BIRX i współaut. 1986).

Przewlekła białaczka szpikowa jest następnym nowotworem, w którym zmiana chromosomów towarzyszy klinicznym objawom ekspansji nowotworowego klonu komórek. Schorzenie charakteryzuje się długą fazą przewlekłą z zaburzeniem granulopetycznej czynności szpiku, lecz w której komórka dominująca

w krwi obwodowej jest jeszcze ciągle dojrzały granulocyt lub jeden z jego bezpośrednich prekursorów. W jakimkolwiek czasie fazy przedbiałaczkowej stan pacjenta może przejść w przełom blastyczny, cechujący się obecnością niedoj-



Ryc. 2. Translokacje chromosomowe.

A. Wymienne przemieszczenie *c-abl* z chromosomu 9 do miejsc złamań w chromosomie 22 i utworzenie małego chromosomu Philadelphia. B. Jedna z translokacji w guzie Burkitt'a, w której *c-myc* zostaje przemieszczony w okolicę genu strukturalnego ciężkiego łańcucha immunoglobuliny.

rzałych postaci komórkowych w krwi obwodowej. Chorzy z przewlekłą białaczką szpikową mają szczególną aberrację chromosomową w komórkach niedojrzewających, nawet w przewlekłej fazie choroby, mianowicie mały chromosom nazwany Ph' od pierwszej litery miasta Philadelphia, gdzie został wykryty przez Nowell'a (NOWELL i HUNGERFORD 1960) (rys. 2A). Ten mały chromosom jest wynikiem translokacji, jaka zaszła między chromosomem 9 a 22 z punktami złamań w dystalnych okolicach długich ramion jednego i drugiego chromosomu. Potem okazało się, że w tej translokacji onkogen *c-ABL* z miejsca 9q34 przemieszcza się do regionu 22q11 zwanego BCR (ang. break cluster regio). Fuzja locus BCR-ABL stwarza nowy gen fuzyjny, który koduje nowy produkt o aktywności kinazy tyrozynowej, większy i aktywniejszy niż *c-ABL*. Działa on w procesach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej i jest zdolny do transformacji *in vitro* komórek macierzystych hemopoetycznych (MCLAUGHLIN i współaut. 1987). Odcinek genu człowieka składający się z sekwencji cDNA BCR-ABL był pierwszą sondą używaną do diagnozowania nowotworu. W ten sposób analizy kariotypów zostały dopełnione analizą molekularną genu, co ma decydujące znaczenie w ocenie skuteczności terapii.

Chłoniak Burkitt'a, chłoniak grudkowy i przewlekła białaczka szpikowa ilustrowały te zaburzenia, w których komórkowe onkogeny zmieniły swe chromosomowe terytorium. W wielu innych postaciach białaczek i chłoniaków występują swoiste i nieprzypadkowe miejsca złamań, jeszcze nie do końca wyjaśnione w molekularnym znaczeniu tam znajdujących się komórkowych onkogenów (ROWLEY 1990).

WIRUSY ONKOGENNE W TRANSFORMACJI NOWOTWOROWEJ U ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH A PROTOONKOGENY

Wspomniane w niepełnych jeszcze scenariuszach nowotworów przemieszczone komórkowe onkogeny *c-MYC* i *c-ABL* (tab. 2) są jednymi z wielu komórkowych homologów wirusowych onkogenów *v-onc*. Może największym odkryciem ostatnich lat było stwierdzenie Bishopa i Varmusa, laureatów Nagrody Nobla roku 1989, że w prawidłowych genomach kręgowców znajdują się geny homologiczne do *v-onc*, czyli wirusowych onkogenów odpowiedzialnych za nowotworową transformację tkanek zwierząt doświadczalnych, zakażonych onkogennymi wirusami (STEHELIN i współaut. 1976). Komórkowe onkogeny *c-onc* znaleziono potem w genomach wszystkich badanych gatunków od drożdży do człowieka (GATEFF 1978, JACOB i współaut. 1987). Stosunek genów *c-onc* do genów *v-onc* objaśnia hipoteza BISHOPA (1981), że retrowirusy zawłaszczyły niegdyś pewne prawidłowe geny *Eukaryota* zachowane w rozwoju ewolucyjnym i że w nowym genomie retrowirusów nabyły one zdolności do indukcji złośliwej transformacji komórek gospodarza. Dla samych wirusów są one nieprzydatne. Pierwszym całkowicie scharakteryzowanym retrowirusem był wirus mięsaka Rous'a, powodujący mięsaki u kurcząt za sprawą *v-src*.

Retrowirusy mogą powodować pierwszy etap transformacji komórek nie tylko przez te niezwykle „zawłaszczone” i zmienione geny *v-onc*. Innym mechanizmem jest integracja wirusowego genomu do genomu gospodarza i zmiana poziomu ekspresji przyległych genów. Wirus RNA po wejściu do komórki przepisuje RNA w DNA za pomocą odwrotnej transkryptazy i ten transkrypt jest następnie włączony (insercja) do DNA gospodarza (BISHOP 1984).

Komórkowe onkogeny kodują białka o fundamentalnym znaczeniu w życiu komórki. Są to enzymy fosforylacji białek, glikoproteidy błon komórkowych z funkcją receptorową, czynniki wzrostowe, białka wiążące DNA i regulujące transkrypcję (WEINBERG 1985). Zmienione onkogeny, wyrażające zwiększoną aktywność nawet w pojedynczej kopii w jakimkolwiek punkcie kaskady przekazywania sygnałów, zostały uznane za onkogeny dominujące. Różne są przejawy aktywacji onkogenów: we wzmożonej syntezie czynników wzrostowych, wzmożonej syntezie receptorów czynników wzrostowych, syntezie receptorów o zwiększonym powinowactwie, zmianie transdukcji sygnałów po związaniu na receptorze, wreszcie w pojawieniu się zmienionych nadczynnych kinaz tyrozynowych, czyli tyrozyno-specyficznych enzymów fosforylujących (GRZELAKOWSKA-SZTABERT 1992). Nadmierna ekspresja tych ostatnich może doprowadzić do wzmożonej proliferacji nawet bez interakcji czynnika wzrostowego. Ostatnim decydującym

przejawem roli *c-onc* jest regulacja transkrypcji przez ich produkty. Przykładem jest heterodimer *fos-jun* lub *myc-max* (MORGENBESSER i DEPINHO 1994).

DELECJE JEDNOGENOWE W NOWOTWORACH — KONCEPCJA ANTYONKOGENÓW

Odminną kategorią genów, odgrywających znamienne rolę w nowotworach, są geny supresorowe, zwane też przeciwnowotworowymi lub antyonkogenami (STANBRIDGE 1970). To właśnie brak produktów tych genów w komórce sprawia, że utracona została kontrola wzrostu, co może być początkiem „wejścia na nowotworową ścieżkę” (tab. 3). Antyonkogeny zostały określone genami recesywnymi, z czego wynika, że w komórce nowotworowej są zmutowane lub utracone obydwa allele i że pierwszym ważnym zdarzeniem jest mutacja jednego z pary genów a drugim — decydującym — wypadnięcie funkcji drugiego genu z tej samej pary, czyli utrata heterozygotyczności. Produkty białkowe prawidłowych alleli genów supresorowych kodują negatywne sygnały wzrostu, czyli takie, w efekcie

Tabela 3

Loci genów przeciwnowotworowych w chromosomach człowieka (zmodyfikowane według LEVINE (1993) oraz KINZLER i VOGELSTEINA (1993))

Nowotwór	Chromosom	Gen przeciwnowotworowy
Siatkówczak (retinoblastoma), kostniakomięsak	13q14	<i>Rb</i>
Guz Wilms'a (nefroblastoma), mięsak prążkowanokomórkowy mięsakowy	11p13	<i>WT-1</i>
Głębok wielopostaciowy (astrocytoma)	17p13	<i>p53</i>
Rak piersi	13p14 17p13 17q.1	<i>Rb</i> <i>p53</i> <i>BRCA1, BRCA2</i>
Drobnokomórkowy rak płuc	13q14 17p13 3p	<i>Rb</i> <i>p53</i> <i>RB</i>
Rodzinną polipowatość gruczolakowata	5q21	<i>APC</i>
Rak jelita grubego	17p13 18q21	<i>p53</i> <i>MCC, DCC</i>
Neurofibromatoza	1p. 14q 17q	nle znane <i>NF-1</i>
Oponiak	22q	<i>NF-2</i>
Neuroblastoma	1p. 2p.17	<i>N-MYC</i> i nle znane
MEN-1 — zespół układu dokrewnego	11q	nle znany
MEN-2 — zespół nowotworów układu dokrewnego	10	nle znany

których nastąpi zatrzymanie cyklu komórkowego, ostateczne różnicowanie, albo fizjologiczna, programowana śmierć komórki (GREEN 1988, HORST 1993).

Istnienie genów przeciwnowotworowych zaproponowali HARRIS i współaut. (1969) i KNUDSON (1971) w toku dwóch linii badań: hybrydów somatycznych komórek nowotworowych z prawidłowymi *in vitro* oraz dziedzicznie uwarunkowanych nowotworów embrionalnych.

Grupie HARRIS'A (1969) udało się mianowicie wykazać przed 25 laty, że jeśli zhybrydyzować przez fuzję jąder komórkowych komórki nowotworowe z nienowotworowymi, to komórki hybrydy nie mają cechy wzrostu nowotworowego. Jednakże w wyniku segregacji genetycznej tych rekombinantów oraz utraty losowej różnych chromosomów dochodziło do reekspresji złośliwego wzrostu. Przyjęto więc roboczo, że istnieją loci genowe zdolne do supresji wzrostu, ponieważ ich brak lub recesywna mutacja uniemożliwiają wejście w prawidłowy program różnicowania lub śmierci z powodu stałej ekspresji toru mitogennego.

Pierwsze badania grupy KNUDSONA (1971) dotyczyły nowotworów embrionalnych. O ile poprzednio omawiane aberracje chromosomów w chorobach nowotworowych układu krwiotwórczego mają swoiste znaczenie nie tylko w diagnostyce, ale i w prognozowaniu klinicznym, to dotychczasowe obserwacje guzów litych nie pozwalają na jednoznaczne określenie ich roli w prognozowaniu klinicznym (LIMON i MITELMAN 1994). Wyjątkiem są rodzinne nowotwory, w których czasem można dostrzec mikrodelecję: w siatkówczaku zarodkowym (retinoblastoma) w segmencie 14 podcentromerowo w chromosomie 13, w guzie nerki Wilms'a (nephroblastoma) w segmencie 13 krótkiego ramienia chromosomu 11, w neuroblastoma — delecję w krótkim ramieniu chromosomu 2 (CAVENEY i współaut. 1986, KINZLER i VOGELSTEIN 1993). Te miejsca zwróciły uwagę na identyfikację utraconych alleli.

Guz nerki Wilms'a i siatkówczak złośliwy mają wiele podobieństw. Obydwa są nowotworami wieku dziecięcego i chociaż większość zdarza się sporadycznie, obydwie nowotwory mogą przejawiać zwiększoną częstość w niektórych rodzinach. Cytogenetyczne a potem molekularne badania tych nowotworów doprowadziły do hipotezy, że chodzi tu o brak lub inaktywację mutacyjną pewnych genów zdolnych do supresji wzrostu i kontroli różnicowania. Utrata jednego z alleli może być dziedziczona w linii zarodkowej, a mutacja drugiego allelu może zdarzyć się w linii somatycznej. Analizą cytogenetyczną pary 13 i polimorfizmu restrykcyjnego fragmentów DNA udało się zidentyfikować mechanizmy odpowiedzialne za eliminację prawidłowych alleli genów supresorowych (CAVENEY i współaut. 1983). Jest nim mitotyczny brak rozdziału (non disjunction) pary chromosomów 13 lub mitotyczna rekombinacja z utratą części chromosomu 13. Efekty tych mechanizmów można potwierdzić monosomią 13 w jednych komórkach i parą chromosomów 13 z brakiem allelu *Rb*. Wykrycie genu siatkówczaka (*rb*) przyczyniło się do epokowych odkryć w regulacji cyklu komórkowego (HORST 1992).

Gen *Rb* (nieobecny w retinoblastoma) i gen *Wt* (nieobecny w guzie nerki Wilms'a) były prototypami antyonkogenów. Tkanką specyficzną dla pierwszego jest siatkówka, a dla drugiego — mezonefros i listewka płciowa. Białkowe produkty tych genów okazały się białkami regulatorowymi transkrypcji. Ekspresja genu *Wt* w prawidłowej tkance w okresie embrionalnym, analizowana *in situ*,

miała miejsce w mezenchymie, pęcherzyku nerki, nabłonku kłębków i mezonefros a także w płodowych gonadach. Sonda molekularna genu supresorowego Wilms'a udowodniła, że ma on określoną rolę w rozwoju nerki oraz rozległą (plejotropową) rolę w mezenchymie i nabłonku. Jest najprawdopodobniej genem rozwoju funkcji filtracji w nerce, tej funkcji, która rozwija się wcześniej w ewolucji kręgowców (PRITCHARD-JONES i współaut. 1990). Udowodniono także rolę supresorową tego genu wobec nowotworowego wzrostu. Mianowicie za pomocą strategii przeniesienia mikrojąder komórkowych udało się przekazać normalny chromosom 11 do linii komórkowej pochodzącej z guza Wilms'a i po wszczępieniu podskórnie myszy bezgrasiczej udowodnić, że komórki te straciły zdolność do tworzenia nowotworu (WEISSMAN i współaut. 1987).

W następnych latach wykryto szereg dalszych genów przeciwnowotworowych i ich produkty. Gen kodujący białko p53, określane też jako białko Tp53 (ang. tumor protein) ma niezwykłą historię i znaczenie (LEVINE 1993). Początkowo sądzono, że chodzi o aktywny onkogen zmutowany, a nie o inaktywację antyonkogenu. Obecnie wiadomo, że w tym genie może być ponad 350 niezależnych mutacji punktowych w regionach szczególnie wrażliwych (hot spots). Odpowiadają one pięciu domenom białka Tp53, szczególnie wiernie zachowanym w przebiegu ewolucji (DE FROMENTEL i SOUSSI 1992, LEVINE i współaut. 1991, BERBEĆ 1994). Utrata funkcji tego genu towarzyszy progresji różnych nowotworów (tab. 3).

BADANIA NOWOTWORÓW U MYSZY TRANSGENICZNYCH

Następnym etapem badań stał się model myszy transgeniczných. Dlatego przedstawię niektóre doświadczenia, w których strategie genowe wymuszające stałą ekspresję jednych genów lub powodujące inaktywację innych, wpływają decydująco na rozwój nowotworu.

Większość znanych onkogenów, antyonkogenów i czynników wzrostowych zostało poddanych analizie w systemie transgenicznym celem weryfikacji ich onkogennej potencjału *in vivo*. Rozwinięto wysoce użyteczne i unikatowe strategie, które dostarczają nowego wglądu w patogenezę nowotworów, a jednocześnie mogą wpłynąć na zmianę lub utrzymanie naszych wyobrażeń o ich rozwoju.

Strategia transgeniczna posługuje się wprowadzeniem obecnego DNA na stałe do komórek linii zarodkowej myszy. Dzięki homologicznej rekombinacji między egzo- i endogennymi sekwencjami DNA zmiany genetyczne powstają w ściśle określonych miejscach i pozostają na stałe. Obejmują one dwie duże kategorie: mutacje dominujące, polegające na zwiększeniu czynności genu (dominant gain-of-function) i mutacje recesywne typu nonsensowego, uniemożliwiające tworzenie produktu genu. Pierwszy typ zmian uzyskuje się przez mikroinjekcję do zarodkowych komórek wielopotencjalnych, tak zwanego transgenu, czyli konstruktu złożonego z onkogenu, enhancera lub promotora i odpowiedniego wektora. „Wymazanie” genu, czyli drugi typ zmian, prowadzący do inaktywacji genów, odbywa się techniką celowego modyfikowania genomu (gene targeting, porównaj HETMAN 1993). W tym celu izolowane komórki zarod-

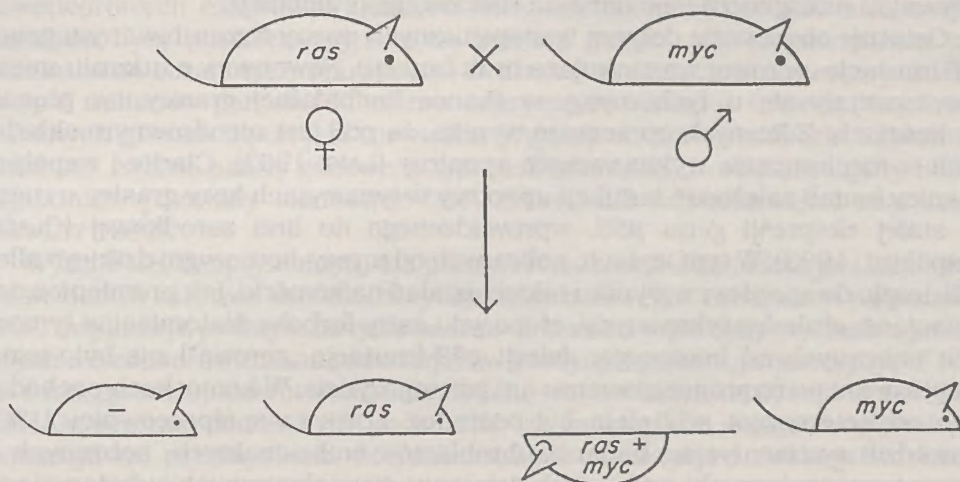
kowe macierzyste hoduje się *in vitro* i modyfikuje ich genom, na przykład, przez zastąpienie sekwencji genu *p53* od 2. do 6. egzonu genem odporności neomycynowej (*neo*). Wyselekcjonowane kłony komórek z nieaktywnym genem *p53* są następnie wprowadzone do blastocysty, gdzie odbywa się kolonizacja zmodyfikowanych komórek i dalszy rozwój płodów, zachowujących zmianę genomu w linii zarodkowej. Takie myszy heterozygotyczne poddaje się reprodukcji międzymieszańcowej a ich potomstwo, sprawdzone pod względem obecności dzikiego allelu, na przykład *p53*, lub jego braku (homozygota prawidłowego allelu, heterozygota, homozygota nieczynnego allelu) stanowi dawców komórek do dalszych badań, na przykład tymocytów czy fibroblastów.

Sekwencje mysiego *c-myc* umieszczono w konstrukcie pod kontrolą enhancera genu strukturalnego *IgH*-, w skrócie *E/myc*. Była to imitacja sytuacji w guzie Burkitt'a z translokacją chromosomową 8;14, o której była mowa w poprzedniej części artykułu. Stan preneoplastyczny cechował się deregulacją cyklu komórkowego i zaburzeniem różnicowania. Populacja limfocytów pre-B górowała nad dojrzałymi limfocytami B. Mimo ekspresji wszystkich antygenów różnicowania łącznie z ekspresją genów *RAG-1* i *RAG-2* (ang. recombinase activating genes), czynność limfocytów B u tych myszy była jednak nieco upośledzona w porównaniu z myszami kontrolnymi. Przejawiało się to w reakcjach na mitogeny, w wydzielaniu przeciwciał, odpowiedzi na T-zależne i T-niezależne antygeny. Po różnym okresie latencji, trwającym od 3–18 tygodni u myszy *E-myc* rozwinęły się chłoniaki pre-B i B limfocytowe o dużej złośliwości. Natomiast chłoniaki T-komórkowe rozwinęły się w warunkach, gdy zmieniono promoter E na *Thy-1* (thymic-grasiczy). Były to właściwe grasiczaki złożone z proliferujących tymocytów i jeszcze bardziej ekspansywnych komórek epitelialnych (MORGENBESSER i DEPINHO 1994). Jeśli konstrukt zawierał ludzki gen *c-myc* i promoter mysiego genu zgodności tkankowej H-2K to występowały zaburzenia proliferacji i różnicowania, ale nie doszło do złośliwej transformacji komórek. To doświadczenie poinformowało dodatkowo, że chociaż *c-myc* może być potencjalnym onkogenem, to okres latencji i klonalność komórek guza zależy od innych czynników.

Próbowano zidentyfikować geny synergistyczne z *c-myc*. W chłoniaku, wywołanym u myszy transgenicznym przez konstrukt *E-myc* zaobserwowano żywe pobudzenie białek wiążących GTP, kodowanych przez geny rodziny *ras*. Białka G, wiążące i hydrolizujące nukleotydy guaninowe, stanowią uniwersalny łącznik w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. Celem identyfikacji przyczyn, przyspieszających rozwój chłoniaków, wprowadzono dodatkowo pewne onkogeny przez zakażenie wirusami onkogennymi lub drogą meiotycznej rekombinacji przez krzyżówki z innymi transgenicznymi osobnikami. Okazało się, że synergistycznymi z *c-myc* są geny *H-ras*, *raf*, *pim-1*, *bcl-2* (ryc. 3). Wszystkie łączy lokalizacja cytoplazmatyczna z tym, że białko *H-ras* ma aktywność kinazy tyrozynowej a produkty *raf* i *pim* mają aktywność kinaz seryno-treoninowych. Produkt ostatniego genu jest czynnikiem przeżycia (tab. 1).

Do badań w systemie transgenicznym posłużono się także konstruktami *N-myc* i *L-myc*, których amplifikację i nadmierną ekspresję stwierdzono w neuroblastoma (*N-myc*) i raku drobnokomórkowym płuc (*L-myc*). Konstrukty *E-N-myc*, wprowadzone do linii zarodkowej myszy, przyczyniły się do rozwoju chłoniaków B-komórkowych, które dojrzewały do plazmocytoma. Natomiast

konstrukty *E-L-myc* przyczyniły się do szybkiego rozwoju grasiczaków T-komórkowych, a w miarę starzenia zwierząt — do guzów złożonych z myelomonocytów. Ten ostatni wynik jest o tyle ciekawy, że w patogenezie białaczki myelomonocytowej u człowieka znaczącą rolę przypisuje się ekspresji deregulowanego *L-myc*.



Ryc. 3. Schemat onkogenezy w systemie transgenicznym u podwójnej heterozygoty dominujących deregulowanych onkogenów.

Myszy transgeniczne poddano też doświadczeniu w odwrotnej wersji, gdy transgenami były zmutowane geny *H-ras*, *SV40-T* antygen lub transformujący czynnik wzrostowy TGF alfa a w utkaniu wynikłych ogniskowych raków badano ekspresję *c-myc*. Wyniki tych doświadczeń nie tylko potwierdziły współdziałanie tych genów w złośliwej transformacji komórek wątrobowych, ale i potwierdziły oczekiwania, że w rozwoju nowotworu działa kilka mutacji.

Dalszy ciąg badań u myszy transgenicznych dotyczy skutków inaktywacji genu *p53* oraz nadmiernej ekspresji genu *bcl-2*. Pierwszy promuje programowaną śmierć, a drugi jest jej inhibitorem. McDONNELL i współpracownicy (1989) wprowadzili konstrukt, w którym ludzki gen *BCL-2* został umieszczony pod kontrolą enhancera *Ig* (genu strukturalnego ciężkiego łańcucha immunoglobuliny), imitując tym translokację w chłoniaku grudkowym u człowieka: t /14;18/ (McDONNELL i współaut. 1989). U tych myszy transgenicznych nadmierna ekspresja *BCL-2* była w komórkach śledziony i grasicy, a z łagodnej poliklonalnej proliferacji centrocytów wywiązała się selektywna ekspansja małych, spoczynkowych limfocytów B o immunofenotypie IgM/IgD. Komórki te gromadziły się czasowo w fazie G0 i G1 cyklu komórkowego, pozostały jednak zdolne do aktywacji i syntezy DNA. Jednakże w miarę upływu czasu zmiany komórkowe przerodziły się w rozrost złośliwych chłoniaków, co jasno ilustrowało bliski stosunek między supresją apoptozy a rozwojem nowotworu. W przebiegu cyto-genetycznych i molekularnych zmian tych chłoniaków złośliwych znaleziono również translokację aktywującą *c-myc*. W związku z tą obserwacją wyhodowano myszy transgeniczne z krzyżówki *Elg-Bcl-2* x *Elg-myc* i udowodniono genetyczne

uzupełnienie się tych dwu onkogenów. U podwójnie transgenicznych potomków rozwinęła się szybko nisko zróżnicowana postać białaczki z hemopoetycznych komórek macierzystych. Z tego wynika, że onkogenny potencjał wzmacnia się przy kombinacji takich zdarzeń genetycznych, z których pierwsze przez deregulację *bcl-2* stwarza korzyść przeżycia, a drugie przez pozytywną stymulację wzrostu aktywnym onkogenem *myc* narusza równowagę proliferacji.

Ostatnie obserwacje dotyczą transgenicznych myszy ze zmutowanym genem *p53* (mutacja „zerowa” warunkująca brak funkcji). Nowotwory o utkaniu mięsaków rozwijały się u tych myszy w tkance limfoidalnej grasicy, w płucach i w kościach. Z licznych opracowań wynika, że *p53* jest nieodzownym składnikiem w mechanizmie wykonawczym apoptozy (LANE 1992). Clarke i współpracownicy badali zależność indukcji apoptozy w tymocytach kory grasicy u myszy od stałej ekspresji genu *p53*, wprowadzonego do linii zarodkowej (CLARKE i współaut. 1993). W tymocytach, pobranych od myszy-homozygot dzikiego allelu *p53* doszło do apoptozy w wyniku takich działań na komórki, jak promieniowanie jonizujące, glukokortykosterydy, etopozyd i estry forbolu. Natomiast w tymocytach pobranych od homozygot delecji *p53* (mutacja „zerowa”) nie było oznak apoptozy ani po napromieniowaniu ani po etopozydzie. W komórkach pochodzących od heterozygot *p53* efekt był pośredni. LOWE i współpracownicy (1993) prowadzili systematyczne badania fibroblastów embrionalnych, pobranych od myszy transgenicznych, poddanych działaniu genotoksycznych substancji używanych jako chemioterapeutyki: 5-fluorouracyl, etopozyd, adramiacyna i promieniowanie jonizujące. Fibroblasty były homo- lub heterozygotyczne pod względem prawidłowego „dzikiego” i zmutowanego allelu. Badania ekspresji mRNA-*p53* wykazały prawidłową, częściową lub utraconą ekspresję genu, zależnie od genotypu *p53*. Autorzy doszli do przekonania, że *p53* wywiera znaczący i zależny od dawki genu wpływ na apoptozę, jeśli czynnik indukcyjny powoduje uszkodzenie nici DNA. Jest to także dowód, że prawidłowa funkcja genu *p53* polega między innymi na blokowaniu podziału komórek z uszkodzonym DNA.

PODSUMOWANIE

Skrótowy przegląd wybranych analiz cytogenetycznych, nawiązujących do nich badań molekularnych DNA i białek, a także doświadczeń metodą inżynierii genetycznej jest dosyć selektywnym obrazem przeobrażeń, jakie dostrzegamy w komórkach nowotworowych. Jeśli bowiem pierwsze (chromosomy) widzi się w całym komplecie, drugie (geny i białka) są wysoce wybiórcze (tylko niektóre albo jeden gen). Cytogenetyk analizuje kariotypy realne pojedynczych komórek, które nie muszą reprezentować całej populacji, za to może wskazać drogi klonalnej ewolucji. Molekularne podejście (poza hybrydyzacją *in situ*) może „uśrednić” genom komórki nowotworowej i „zgubić” heterogenność komórek nowotworowych.

Patogenne konsekwencje przynajmniej niektórych zrównoważonych translokacji i delecji chromosomów mogą być jeszcze bardziej skomplikowane niż prosta w zasadzie aktywacja onkogenów lub utrata antyonkogenów. Polisomie lub

poliploidie nie zostały jeszcze zadawalająco wyjaśnione na poziomie genów (HEIM 1992).

Nie ujmując nic pracownikom klonującym geny trzeba przyznać, że analiza cytogenetyczna była kluczem do molekularnej cytogenetyki dwóch głównych kategorii rearanżacji: nieprzypadkowych translokacji (około 70 w komórkach nowotworowych człowieka) i stałych delecji. Znajomość usytuowania miejsca złamania była punktem wyjścia do selekcji genów, używanych potem jako molekularne sondy tych rearanżacji. Jednakże prążek chromosomowy zawiera około 5 milionów par zasad i szansa odkrycia rearanżacji metodą Southerna w różnych guzach litych jest niewielka. Wyjątek stanowią białaczki i chłoniaki, ponieważ istotne sondy genowe w tych schorzeniach, zawierające geny immunoglobulin, pozwoliły sklonować DNA istotne dla kilkudziesięciu rearanżacji (ROWLEY 1990).

Wydaje się, że optymalnym dla pełnego rozeznania działaniem jest kontynuowanie badań zarówno metodami cytogenetycznymi, jak i analizami na poziomie DNA. Implikacje praktyczne tych badań, zwłaszcza w predyspozycjach ujawniających się zachorowaniami rodzinnymi w predyspozycjach „promocyjnych” (chodzi o fazę promocji nowotworu) zostały omówione w artykule J. STEFFENA (1993). Na zakończenie chciałabym podkreślić, że nowe dane biologii molekularnej zmuszają do przemyślenia dotychczasowych koncepcji i definicji w obrębie patologii nowotworów. Pragnę też wyrazić pogląd, że badania cytogenetyczne i molekularne uzupełniają, ale nie zastępują patomorfologii w dziedzinie diagnostyki nowotworów. Istota badań genetycznych polega bowiem na wykryciu nie znanych przedtem mechanizmów odpowiedzialnych za deregulację kontroli transkrypcyjnej i autonomii wzrostu komórek.

PERSPECTIVES IN CANCER GENETIC RESEARCH — DISCOVERIES AND VISIONS

Summary

The review refers to the current progress in the studies on genetic changes that occur within the cancer cell and are critically involved in the transformation of a normal to a malignant cell. The considerations are limited to:

- those changes that have been detected by analyzing the karyotypic pattern of human cancer cells found in leukemia and lymphoma,
- two large classes of genes that are subject to somatic mutations — 1, oncogenes whose existence was revealed by the study of animal retroviruses, and 2, antioncogenes which were revealed by the study of hereditary cancer in man.

A new approach to studying the role of the above mentioned genes in the initiation and progression of induced tumors in transgenic mice is also presented.

LITERATURA

- ADAMS J. M., GERONDAKIS S., WEBB E. L. M., CORY S., 1983. *Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin gene locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas*. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 1982–1986.
- ADAMS J. M., HARRIS A. W., PINKERT C. A., CORCORAN L. M., ALEXANDER W. S., CORY S., PALMITER R. D., BRINSTER R. L., 1985. *The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancer induces malignancy in transgenic mice*. Nature, 318, 533–538.

- BERBEĆ H., 1994. *Gen p53 człowieka*. Post. Biochem., 40, 6–11.
- BISHOP J. M., 1981. *Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes*. Cell, 23, 5–7.
- BISHOP J. M., 1984. *Viruses, genes and cancer. The Harvey Lectures. Series 78*, 137–171.
- BIRX D., REDFIELD R. R., TOSATO G., 1986. *Defective regulation of Epstein Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS related disorders*. N. Engl. J. Med., 314, 874–879.
- CAVENEY W. R., DRYJA T. P., PHILLIPS R. A., 1983. *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. Nature, 305, 779–785.
- CAVENEY W. K., KOUFOS A., HANSEN M. F., 1986. *Recessive mutant genes predisposing to human cancer*. Mutation Res., 168, 3–14.
- CLARKE A. R., PURDIE C. A., HARRISON D. J., MORRIS R. G., BIRD C. C., HOSPER M. L., WYLLIE A. H., 1993. *Thymocyte apoptosis induced by p-53-dependent and independent pathways*. Nature, 362, 849–852.
- CORY S., 1987. *Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosomal translocation*. Adv. Canc. Res., 47, 189–234.
- CROCE G., NOWELL P., 1986. *Molecular genetics of human B cell neoplasia*. Adv. Immunol. 38, 245–274.
- DALLA-FAVERA R., BREGNI M., ERICKSON J., PATTERSON D., GALLO R. C., CROCE C. M., 1982. *Human c-myc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 7824–7827.
- DE GROUCHY J., 1981. *The malignant primate*. Ann. Génét. 34, 137–142.
- DOUGLAS E. C., MAGRATH I. T., LEE E. C., WHANG-PENG J., 1980. *Cytogenetic studies in non-Africa Burkitt lymphoma*. Blood 55, 148–155.
- EPSTEIN M. A., ACHONG B. G., 1983. *The relationship of the EBV virus to Burkitt's lymphoma W:The Epstein-Barr Virus*. Red. M. A. EPSTEIN, B. G. ACHONG, Berlin, Spronger Verlag, 322–327.
- DE FROMENTEL, SOUSSE T., 1992. *TP53 tumor suppressing gene: a model for investigating human mutagenesis*. Genes, Chromosomes Cancer, 4, 1–15.
- GATEFF E., 1978. *Malignant neoplasms of genetic origin in Drosophila Melanogaster*. Science 200, 1448–1459.
- GREEN A. R., 1988. *Recessive mechanisms of malignancy*. Br. J. Cancer, 58, 11–12.
- GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., 1992. *Regulacja cyklu komórkowego — historii i komplikacji ciąg dalszy*. Post. Biochem., 38, 98–107.
- HARRIS H., MILLER D. J., KLEIN G., WORST P., TACHIBANA T., 1969. *Suppression of malignancy by cell fusion*. 223, 363–368.
- HEIM S., 1992. *Is cancer cytogenetics reducible to the molecular genetics of cancer cells*. Genes, Chromosomes, Cancer, 5, 188–196.
- HETMAN M., 1993. *Celowe modyfikowanie genomu ssaków*. Post. Biol. Kom. 20, 217–238.
- HORST A., 1992. *Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek*. Post. Biol. Kom., 19, 3–22.
- HORST A., 1993. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. Post. Biol. Kom., 20, 311–330.
- JACOB L., OPPER M., METZROTH B., PHANNAVONG B., MECHLER B., 1987. *Structure of the I/2/g1 gene of Drosophila and delimitation of its tumor suppressor domain*. Cell, 50, 215–250.
- KINZLER K. W., VOGELSTEIN B., 1993. *A gene for neurofibromatosis 2*. Nature, 363, 495–496.
- KLINGER H. P., 1963. *The somatic chromosomes of some primates*. Cytogenetics, 2, 140–151.
- KNUDSON A. G., 1971. *Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68, 820–823.
- KOCKI J., ROŻYŃKOWA D., 1991. *Gen bcl-2 w patofizjologii limfocytów B*. Post. Biol. Kom., 18, 169–182.
- KORSMEYER S. J., 1992. *Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death*. Blood, 80, 879–886.
- LANE O. P., 1992. *p53, guardian of the genome*. Nature, 358, 15–16.
- LEJEUNE J., DUTRILLAUX B., RETHORE M. C., PRIEUR M., 1993. *Comparaison de la structure fine des chromatides d'Homo sapiens et de Pan troglodytes*. Chromosoma, 43, 423–444.
- LEVINE A. J., 1993. *The tumor suppressor genes*. Annu. Rev. Biochem., 62, 623–651.
- LEVINE A. J., MOMAND J., FINLAY C. H., 1991. *The p53 tumor suppressor gene*. Nature, 351, 453–456.
- LIMON J., MITELMAN F., 1994. *Znaczenie aberracji chromosomowych w litych guzach nowotworowych człowieka*. Polish J. Pathol., 45, 1–16.
- LOWE S. W., SCHMITT E. M., SMITH S. W., OSBORNE B. A., JACKS T., 1993. *p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes*. Nature, 362, 847–852.

- MALCOLM S., 1984. *Chromosome Rearrangements and Cancer*. W: *Molecular Medicine*, vol. 1. Red. A. D. B. MALCOLM, IRL Press 1984.
- MCDONNELL T. J., DEANE N., PLATT F. M., NUNEZ G., JAEGER U., MCKEARN J. P., KORSMEYER S. J., 1989. *bcl-2-Immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation*. *Cell*, 57, 79–88.
- MCLAUGHLIN J., CHIANESE E., WITTE O. N., 1987. *In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the p210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 84, 6558–6562.
- MERLINO G., 1994. *Regulatory imbalances in cell proliferation and cell death during oncogenesis in transgenic mice*. *Cancer Biology*, 5, 13–20.
- MORGENBESSER S. D., DEPINHO R. A., 1994. *Use of transgenic mice to study myc family gene function in normal mammalian development and in cancer*. *Cancer Biology*, 5, 21–36.
- NOWELL P. C., HUNGERFORD D. A., 1960. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia*. *Science*, 132, 1497–1499.
- PRITCHARD-JONES K., FLEMING S., DAVIDSON D., BICKMORE W., PARTEOUS D., GOSDEN C., BARD J., BUCKLER A., PELLETIER J., HOUSMAN D., VAN DEYINGEN V., HASTIC N., 1990. *The candidate Wilms' Tumor gene is involved in genitourinary development*. *Nature*, 346, 194–197.
- ROWLEY J. D., 1990. *Molecular cytogenetics: Rosetta Stone for understanding cancer—Twenty ninth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture*. *Cancer Res.*, 50, 3816–3825.
- ROŻYŃKOWA D., RUPNIEWSKA Z. M., 1989. *Wieloletowa palogeneza chłoniaków*. *Post. Biol. Kom.*, 16, 225–267.
- ROŻYŃKOWA D., w druku (1994). *Genetyczne regulacje apoptozy, programowej śmierci komórki*. *Post. Biol. Kom.*
- SAGER R., 1986. *Genetic Suppression in tumor formation: a new frontier in cancer research*. *Can. Res.*, 46, 1573–1580.
- STANBRIDGE E. J., 1970. *Suppression of malignancy in human cells*. *Nature*, 260, 17–20.
- STEHELIN D., VARMUS H., BISHOP M., VOGT P., 1976. *DNA related to the transforming gene/s/ of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA*. *Nature*, 260, 170–173.
- STEFFEN J., 1933. *Postępy w badaniach nad dziedzicznymi predyspozycjami do rozwoju nowotworów złośliwych*. *Nowotwory*, 43, 279–297.
- TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFFE E., CROCE C. M., 1985. *Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma*. *Science*, 228, 1440–1443.
- WEINBERG R. A., 1985. *The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus*. *Science*, 230, 770–776.
- WEINBERG R. A., 1989. *Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis*. *Cancer Res.*, 49, 3713–3721.
- WEISSMAN B. E., SAXON P. J., PASQUALE S. R., JONES G. R., GEISER A. G., STANBRIDGE E. J., 1987. *Introduction of normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression*. *Science*, 136, 175–180.
- YUNIS, PARKASH O., 1982. *The origin of man: A chromosomal pictorial legacy*. *Science*, 215, 1525–1530.

ANTONI HORST

*Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,*

PRODUKTY GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Choroby nowotworowe, jedna z głównych przyczyn śmierci nowoczesnych społeczeństw, zdaje się wchodzić w nową erę badań. O ile dotychczasowe badania dotyczyły głównie pozaustrojowych czynników kancerogennych, to obecne badania ukierunkowują się na podatność lub odporność organizmu na powstawanie procesu nowotworowego. Są to badania skoncentrowane na molekularnych czynnikach własnych organizmu, pobudzających wzrost nowotworowy, lub hamujących ten proces. Obecnie przyjmuje się, że do powstania procesu nowotworowego przyczynia się z jednej strony nadmiar czynników pobudzających wzrost nowotworowy lub z drugiej strony — niedobór czynników hamujących ten proces.

ONKOGENY

Liczbę onkogenów, czyli czynników wpływających na powstanie raka określa się obecnie na ponad 100. Powstaje pytanie — skąd się biorą onkogeny i czym one są? Badanie genomu człowieka wykazało, że zawiera on znaczną liczbę proto-onkogenów (czyli substancji, z których mogą powstawać onkogeny), których rola w organizmie nie została do końca wyjaśniona, a które pod wpływem mutacji, powodującej ich uaktywnienie, mogą spowodować powstanie raka. Najczęstszym źródłem powstania onkogenów są prawdopodobnie retrowirusy, to jest wirusy, których informację genetyczną stanowi RNA, a nie DNA. Z kolei, dzięki odwrotnej transkryptazie RNA wirusa ulega transkrypcji na DNA, następnie jest wbudowany do DNA człowieka jako jego integralny składnik genomu; podczas podziału komórki składnik ten ulega powielaniu (reduplikacji) i podobnie jak macierzysty, komórkowy DNA przechodzi do komórek potomnych. Z reguły ten fragment DNA, stanowiący tak zwany proto-onkogen, nie jest aktywny i nie powoduje żadnej choroby do czasu, kiedy wskutek mutacji dochodzi do jego uaktywnienia i produkcji białek zawartych w genomie wirusa, powodujących proliferację i transformację nowotworową komórki. Najczęściej występujące onkogeny retrowirusowe przedstawiono w tabeli 1.

Również DNA-wirusy mogą działać kancerogennie poprzez swoje produkty. Do najlepiej poznanych należą: adenowirusy, wirusy papowa i opryszczki. Transformujący region wirusów polyoma koduje 3 białka, składające się na duży, średni i mały antygen T, z tego duży antygen T powoduje nieograniczony wzrost

Tabela 1.

Onkogeny retrowirusowe i ich homologi komórkowe

Retrowirusowe	Białko wirusowe	Homolog komórkowy	Nowotwór	Gatunek
<i>v-sis</i> (Simian sarcoma virus)	p28 ^{sis}	łańcuch B PDGF	mięsak	małpa wełnista
<i>v-src</i> (Rous sarcoma virus)	pp60 ^{v-src}	pp60 ^{v-src}	mięsak	kura
<i>v-fes</i> (St-feline sarcoma virus)	p85 ^{gag-fes}	p92 ^{c-es}	mięsak	kot
<i>v-abl</i> (Abelson Murine leukemia virus)	120 ^{gag-abl}	p150 ^{c-abl}	białaczka	mysz, kot
<i>v-erbA</i> (Avian erythroblastosis virus)	gp65 ^{erbA}	skrócony receptor EGF	erytroleukemia	kura
<i>v-erbB</i> (Avian erythroblastosis virus)	gp65 ^{erbB}	skrócony receptor EGF	mięsak	kura
<i>v-myc</i> (Avian myelomatosis virus)	p101 ^{gag-myc}	p58 ^{c-myc}	rak, mięsak, szpiczak	kura
<i>v-H-ras</i> (Harvey murine sarcoma virus)	p21 ^{v-Ha-ras}	p21 ^{c-Ha-ras}	mięsak, erytroleukemia	mysz, szczur
<i>v-K-ras</i> (Kirsten murine sarcoma virus)	p21 ^{v-K-ras}	p21 ^{c-K-ras}	mięsak, erytroleukemia	mysz
<i>v-N-ras</i>		p21 ^{c-N-ras}	neuroblastoma, białaczka, mięsak	człowiek

Różnorakie działanie komórkowych onkogenów:

p58^{c-myc} — reguluje transkrypcję, powoduje unieśmiertnienie i transformację (nowotworową) komórek w hodowli
p21^{c-Ha-ras} — wiążąc GTP lub GDP poprzez ich hydrolizę reguluje aktywność kinazy adenylanowej — hydroliza powoduje inaktywizację białek ras, związanych z błoną komórkową — następuje zahamowanie bodźców przez błonowych cykazy adenylanowej ze zniesieniem aktywności kinazy tyrozynowej. Mutacja p21 (w poz. 12) z powodu niemożności hydrolizy powoduje stałe związanie GTP z błoną komórkową, powodując permanentną aktywację cykazy adenylanowej, prowadzącą do powstania raka pęcherza moczowego.

z jednoczesnym zmniejszeniem zapotrzebowania na czynniki wzrostu, średni wpływa na transformację nowotworową, natomiast rola małego antygeny nie jest znana. Podobnie duży antygen T wirusa SV40 wpływa również na transformację nowotworową komórek.

Główne mechanizmy działania proto-onkogenów sprowadzają się do fosforylacji białek odgrywających podstawową rolę w cyklu komórkowym; do wpływu na

transmisję sygnałów dla czynności komórek (np. onkogeny *ras*, które w niekontrolowany i permanentny sposób powodują stałe pobudzenie komórki do proliferacji) oraz do wpływu na transkrypcję DNA, czyli aktywację genów (np. proto-onkogeny *myc*, *fos*, *jun*, *myb* i inne). Oddzielną grupę czynników powodujących proces nowotworowy stanowi nadmiar czynników wzrostu (np. EGF, PDGF, NGF, interleukiny i wiele innych) lub niedobór produktów genów przeciwnowotworowych, których główni przedstawiciele wpływają na ten proces poprzez cykl komórkowy (BISHOP 1991, CROSS i DEXTER 1991, CANTLEY i współaut. 1991).

CYKL KOMÓRKOWY

Najbardziej charakterystyczną cechą wzrostu nowotworowego jest niepomiarowana proliferacja określonej grupy komórek, nie poddająca się mechanizmom kontrolnym i prowadząca kosztem innych komórek do wyniszczenia organizmu i śmierci. Są wprawdzie jeszcze inne cechy wzrostu nowotworowego, jak zdolność do tworzenia przerzutów, kiedy komórki odrywające się od pierwotnego nowotworu przechodzą do różnych narządów, w których również ulegają nadmiernej i niekontrolowanej proliferacji.

Proliferacja normalnych komórek odbywa się w bardzo złożonym procesie, zwanym cyklem komórkowym, odbywającym się w miarę potrzeby pod ścisłą kontrolą mechanizmów regulacyjnych, pozwalających jedynie na uzupełnienie powstałych ubytków. Proliferacja komórek, podobnie jak ogólna przemiana materii, należy do niezbędnych atrybutów żywych tkanek. Spośród komórek normalnego wielokomórkowego organizmu jedne są krótko żyjące (np. komórki krwi żyjące niekiedy do kilku godzin, dni lub miesięcy — brak proliferacji tych komórek w krótkim czasie musi prowadzić do śmierci całego organizmu — przykładowo erytrocyty żyją w najlepszym razie tylko do 3 miesięcy i stąd brak proliferacji erytrocytów w ciągu niecałych 3 miesięcy musiałby prowadzić do śmierci organizmu). Inne komórki dzielą się, czyli proliferują jedynie wyjątkowo (typowym przykładem są komórki wątroby, które proliferują dopiero na skutek wycięcia części komórek wątrobowych, przy czym proliferacja tych komórek odbywa się tylko dopóty, dopóki nie nastąpi przywrócenie pierwotnej wielkości i kształtu wątroby, po czym dotąd nie znane czynniki kontrolne zatrzymują dalszą proliferację tych komórek) i wreszcie zróżnicowane komórki nerwowe, które nigdy nie proliferują.

Właściwe poznanie cyklu komórkowego umożliwiło odkrycie w 1971 roku czynnika dojrzewania MPF (maturation promoting factor). Istota tego odkrycia polegała na wykryciu czynnika dojrzewania oocytów dla umożliwienia ich zapłodnienia, a których mejoza została zatrzymana we wczesnym okresie życia płodowego (około 3-go miesiąca życia płodowego), zaś normalne, stopniowe kończenie mejozy następuje dopiero po okresie pokwitania. W 1982 roku wykryto produkt genu *cdc2* (od cell division cycle) w postaci białka $p34^{cdc2}$, które w 1987 roku zostało zidentyfikowane jako kinaza białkowa, przenosząca grupy fosforanowe z ATP na różne białka. Ponieważ poziom $p34^{cdc2}$ podczas całego cyklu jest stały, zaczęto poszukiwania czynnika ulegającego okresowym zmianom w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Czynnikiem tym okazało się

Kluczową rolę w przebiegu cyklu komórkowego odgrywa kinaza $p34^{cdc2}$, skompleksowana z odpowiednią cykliną. Początkowo sądzono, że istnieje tylko jedna cykliną, szybko jednak przekonano się, że prawdopodobnie każda faza cyklu komórkowego jest aktywowana przez swoistą cyklinę. Najwięcej trudności sprawiało poznanie czynników potrzebnych do rozpoczęcia cyklu, czyli STARTu. Dopiero ostatnio okazało się, że czynnikami tymi u ssaków są cykliny z grupy D, głównie cykliną D1 (u drożdży cykliny CLN-3). Cykliną D1 jest najprawdopodobniej identyczna z onkogenem *bcl-1*, to jest czynnikiem, którego nadmiar powoduje powstanie chłoniaków typu B. Z kolei cykliny D2 i D3 hamując proces różnicowania komórek wpływają na dodatkową cechę procesu nowotworowego, polegającą na zahamowaniu różnicowania się komórek. Poza tym aktywatorami cyklu komórkowego są również dawniej poznane czynniki, jak wielkość komórki, składniki odżywiania, czynniki wzrostu EGF, PDGF, NGF i inne.

W początkowej fazie cyklu komórkowego są niezbędne cykliny E i A, które tworzą wraz z $p34^{cdc2}$ odpowiednie kinazy zależne od cyklin E-Cdk2 i A-Cdk2 (ang. cyclin dependent kinase). Napromienianie promieniami gamma ludzkich fibroblastów w fazie G1 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego przed wystą-

Ryc. 1. Schemat działania cyklu komórkowego. Mechanizm napędowy cyklu (przedstawiony w postaci koła grubych strzałek): w fazie G1 pod wpływem syntezy cyklin A i E oraz ich asocjacji z $p34^{cdc2}$ powstaje nieaktywny pre-MPF (tyrozyna w poz. 15 i treonina w poz. 14 uległy fosforylacji); pod wpływem różnych czynników (składniki odżywiania, czynniki wzrostu itp.) oraz niektórych cyklin (np. CLN1-3 u drożdży) występuje „start” inicjujący replikację DNA; czynniki fosforylujące (produkty genów *wee1* i *mik1*) hamują postępowanie cyklu, umożliwiając syntezę DNA, natomiast pod wpływem czynników defosforylujących (fosfataza *cdc25*) i asocjacji cykliny B do $p34^{cdc2}$ następuje przejście pre-MPF w aktywny MPF, powodujący przejście cyklu z fazy G2 do fazy M, w której pod wpływem fosforylacji następuje wytworzenie wrzeciona mitotycznego, kondensacja chromosomów i degradacja otoczki jądrowej; z kolei następuje pod koniec fazy M rozpad cykliny B, powodujący inaktywację MPF, a w następstwie wyjście cyklu z fazy M do fazy G1 z jednoczesną defosforylacją wywołującą segregację i dekondensację chromosomów, degradację wrzeciona oraz reorganizację otoczki jądrowej, po czym może wystąpić następny cykl komórkowy. Wewnętrzny mechanizm kontrolny cyklu (wpisany do koła w środku schematu): na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie G1/S zmutowany DNA powoduje zatrzymanie cyklu (przy współudziale p53), również na przejściu z fazy G2/M nieukończona synteza DNA powoduje zatrzymanie cyklu (także przy współdziałaniu z p53); zaburzenia organizacji wrzeciona mitotycznego, kondensacji chromosomów i degradacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu na zasadzie sprzężenia zwrotnego w fazie M, podobnie jak na tej samej zasadzie zaburzenia segregacji i dekondensacji chromosomów, degradacji wrzeciona mitotycznego i reorganizacji otoczki jądrowej powodują zatrzymanie cyklu w początkowej fazie G1. Czynniki kontrolne spoza cyklu (na rysunku na zewnątrz koła grubych strzałek): p105Rb — aktywne w postaci hipofosforylowanej w fazie G1 — hamuje proliferację komórek, po czym hiperfosforylowane, nieaktywne aż do końca cyklu umożliwia proliferację komórek; p53 — strażnik prawidłowego genomu — hamuje cykl komórkowy w fazie G1/S w przypadku zmutowanego DNA lub w fazie G2/M w przypadku niezreplikowanego DNA, aktywuje geny hamujące proliferację komórek, w przypadku zmutowanego DNA może spowodować apoptozę komórki; zmutowany p53 może prowadzić do kancerogenezy. Czynniki transkrypcji E2F jest silnie związany z cyklem, działając w kompleksie z p53, cykliną A i p105Rb.

Cykliny — A, B, E; grupy fosforanowe — P; tyrozyna — Y; treonina — T.

pieniem fazy S (w fazie S następuje reduplikacja DNA). Blok tej fazy jest spowodowany inaktywacją kinaz E-Cdk2 i A-Cdk2, spowodowaną skompleksowaniem z odpowiednimi inhibitorami, indukowanymi przez białka inhibitorowe p21 i p53.

Wskutek syntezy cyklin A i E oraz łączenia się ich z kinazą p34^{cdc2} powstaje nieaktywny pre-MPF, w którym tyrozyna w pozycji 15 i treonina w pozycji 14 uległy fosforylacji. Pod wpływem dodatkowo działających czynników następuje przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego (faza S — synteza DNA w celu całkowitego podwojenia DNA dla komórek potomnych). Przejście z fazy G1 do S cyklu komórkowego stanowi jego ważny etap decydujący o tym, czy do powielania zostanie przekazany prawidłowo zbudowany DNA, czy też zdefektowany. Od tego bowiem zależy, czy komórka potomna będzie prawidłową, czy też defektywną. Okazało się, że na straży prawidłowości przekazywanego do powielania DNA stoi swoisty mechanizm, w którym ważną a właściwie nawet decydującą rolę odgrywają produkty genów przeciwnowotworowych (p53, p16 i prawdopodobnie jeszcze inne dotąd nie poznane czynniki).

W fazie S dochodzi do całkowitego i wiernego podwojenia zawartości DNA w komórce. Ostatnie badania wykazały, że główną rolę w tej fazie cyklu komórkowego odgrywa kinaza p34^{cdc2}, skompleksowana z cykliną A. Po ukończeniu syntezy DNA cykl komórkowy przechodzi w fazę G2. Przejście do tej fazy odbywa się prawdopodobnie pod wpływem kinazy p34^{cdc2} skompleksowanej z cykliną E.

Od końca fazy G1, poprzez fazy S i G2 kompleks kinazy z cyklinami pozostaje nieaktywny dzięki utrzymywaniu pod wpływem kinaz wee1 i mik1 fosforylacji tyrozyny w pozycji 15 i treoniny w pozycji 14 p34^{cdc2}. Pod koniec fazy G2 pod wpływem fosforylasy cdc25 następuje defosforylacja kinazy p34^{cdc2} i tym samym jej uaktywnienie z jednoczesnym skompleksowaniem z cykliną B — w ten sposób powstaje aktywny czynnik dojrzewania MPF (ang. maturation promoting factor).

Z chwilą utworzenia aktywnego MPF następuje przejście z fazy G2 do fazy M, czyli mitozy. W tej fazie następuje szereg zmian w jądrze komórkowym na skutek przenoszenia grup fosforanowych na składniki jądra, ulegających odpowiedniemu przekształceniu. Dzięki temu następuje organizacja wrzeciona kariokinetycznego, kondensacja chromosomów oraz degradacja otoczki jądra — innymi słowy następuje przygotowanie materiału genetycznego do jego podziału na dwie potomne komórki. Najlepiej z tego jest poznany proces degradacji otoczki jądra, składającej się w głównej mierze z lamin, które wskutek fosforylacji ulegają dysocjacji i tym samym dla umożliwienia podziału następuje degradacja otoczki.

Przejście cyklu komórkowego z fazy G2 do M stanowi, podobnie jak przejście z fazy G1 do S, drugi punkt krytyczny podziału komórkowego. Tym krytycznym elementem jest dokończenie reduplikacji całego materiału genetycznego, gdyż tylko w ten sposób mogą powstać dwie całkowicie identyczne komórki potomne. W przeciwnym razie mogą powstać zdefektowane komórki z powodu utraty niektórych genów — takim klasycznym przykładem jest znane w onkologii zjawisko utraty heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity) prowadzące do powstania nowotworu z powodu utraty genów przeciwnowotworowych. Również i w tym przypadku, podobnie jak przy przejściu cyklu komórkowego z fazy G1 do S, rolę czynnika kontrolnego spełnia produkt genu przeciwnowotworowego p53.

Pod koniec fazy M cyklu komórkowego następuje degradacja cyklin B i A, skompleksowanych z kinazą p34^{cdc2} i tym samym czynnika dojrzewania MPF, a w związku z tym również defosforylacja poprzednio ufosforylowanych elementów jądra komórkowego, czego najdobitniejszym objawem jest ponowne połączenie składników otoczki jądra (laminin) z wytworzeniem nowej otoczki jądrowej, z uprzednią segregacją i dekondensacją chromosomów oraz degradacją wrzecionna kariokinetycznego. Komórka z chwilą zakończenia cyklu komórkowego wchodzi ponownie w fazę G1, trwającą różnie długo w zależności od rodzaju komórek i obecności aktywatorów cyklu — zaś niektóre komórki (np. komórki wątrobowe) wchodzi w fazę Go, z której mogą wejść ponownie w cykl komórkowy dopiero pod wpływem specyficznych czynników.

Według dawniejszych poglądów (MURRAY 1992) zahamowanie cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1-S i G2-M miało polegać głównie na sprzężeniu zwrotnym, kiedy nie dokończona reakcja poprzedzająca na zasadzie inaktywacji enzymów następczej reakcji miała powodować zatrzymanie jej i tym samym zatrzymanie cyklu. Nowsze badania sugerują (NASMYTH i HUNT 1993), że działa tu raczej mechanizm podobny do „tamy (bariery) i śluzy”, kiedy nadmierna akumulacja inhibitora powoduje zatrzymanie cyklu, zaś przewaga czynników aktywujących przepływ, czyli postępowanie cyklu. Stąd tak ważne są zarówno aktywatory, jak i inhibitory cyklu komórkowego.

Zgodnie z nowszymi badaniami postępowanie cyklu komórkowego od fazy replikacji DNA (fazy S) do mitozy jest regulowane przez kompleksy kinazy z odpowiednimi cyklinami: we wczesnej fazie G1 CDK2 skompleksowane z cykliną E, a podczas fazy S CDK2 skompleksowane z cykliną A i wreszcie przejście z fazy G2 do mitozy jest uwarunkowane utworzeniem kompleksu CDK1 z cykliną B. Z kolei w komórkach ssaków zidentyfikowano 4 różne inhibitory: p16, p21, p24 i p27, z tego p24 stanowi homolog fosfataz działających na nie znany dotąd substrat, zaś p27 we współdziałaniu z transformującym czynnikiem TGF- β powoduje blok cyklu komórkowego poprzez hamowanie kompleksu E-CDK2. P16 wiążąc się z D1-CDK2 hamuje start cyklu komórkowego spowodowany uszkodzeniem DNA. P21 zostało zidentyfikowane jako komponent białka jądrowego PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) niezbędnego dla proliferacji komórek, występującego we wszystkich normalnych kompleksach CDK, ale nie w komórkach stransformowanych. P21 jest znane pod wieloma nazwami (CIP1, CAP20, SDI1, WAF1). Ogólny schemat działania p21 przedstawia się następująco: uszkodzenie DNA przy współudziale p53 indukuje syntezę p21 (również starzejące się komórki indukują syntezę tego białka), przyczyniając się do zahamowania proliferacji komórek. Pierwotnie p21 działa hamująco na E-CDK w fazie startu cyklu, ale może również działać hamująco na syntezę DNA w jakimkolwiek stadium tej syntezy dzięki związaniu z PCNA (PINES 1994).

Do najdawniej wykrytych inhibitorów kinaz, zależnych od cyklin (CDK), należy transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β) powodujący zatrzymanie cyklu w fazie G1 z powodu inaktywacji E-CDK2 (kinazy zależnej od cykliny E). Badania przeprowadzone na komórkach nabłonka płucnego norki wykazały, że czynnik powodujący zatrzymanie (blok) cyklu komórkowego powstaje pod wpływem TGF- β . Jest to białko o masie cząsteczkowej 27 kDa, nieaktywne

w komórkach nie poddanych działaniu TGF- β (HORST 1993, KIRSCHNER 1992, MCKINNEY i HEINTZ 1991, MURRAY 1992, NASMYTH i HUNT 1994, PINES 1994).

BIALKO P105 RB

Gen siatkówczaka *Rb-1* lub *Rb* został wyizolowany w 1987/1988 roku na chromosomie 13q14 o długości około 200 kpz i składa się z 27 eksonów. Jego mRNA po dokonanych składowaniu (splicing) wynosi 4,7 kz. Produktem tego genu jest białko p105Rb o masie cząsteczkowej 105 kDa, zaś w formie ufosforylowanej 114–115 kDa. Białko 105Rb należy do fosfoprotein. Brak aktywnego genu *Rb* występuje przede wszystkim w siatkówczaku, chociaż mniej często również w kostniako-mięsakach (osteosarcoma), w drobnokomórkowym raku płuc, raku sutka, raku gruczołu krokowego i innych. Oprócz delekcji całego genu (wskutek utraty całego chromosomu lub fragmentu zawierającego gen *Rb*) mogą występować również mutacje punktowe, które wskutek zaburzenia w składowaniu (splicing) mogą prowadzić do utraty całego eksonu, jak to opisano w przypadku raka pęcherza moczowego. Brak pierwszego eksonu genu *Rb* jest stosunkowo częstym zjawiskiem powodującym powstanie raka. Sugeruje się pewną preferencję wystąpienia mutacji *Rb* w ojcowskiej linii germinalnej. Wreszcie są znane też przypadki dziedzicznej delekcji chromosomu 13q14 i braku występowania siatkówczaka. Całość powyższych danych sugeruje, że gen *Rb* odgrywa prawdopodobnie bardziej ogólną rolę w powstawaniu raka, aniżeli tylko w odniesieniu do siatkówczaka.

Wykrycie dziedzicznego mechanizmu przenoszenia siatkówczaka (retinoblastoma) stanowi jedno z ważniejszych w onkologii. Początkowo sądzono, że gen siatkówczaka przenosi się z rodziców na potomstwo w trybie dominującym. Pogląd ten obalili KNUDSON (1971) sugerując, że dziedziczy się tylko jeden gen patologiczny, natomiast obecność drugiego prawidłowego genu zapobiega chorobie i dopiero utrata tego drugiego prawidłowego genu, czyli utrata heterozygotyczności (ang. loss of heterozygosity) powoduje wystąpienie siatkówczaka. Drugie ważne spostrzeżenie związane z występowaniem siatkówczaka polega na stwierdzeniu, że nowotwór ten powstaje jedynie u małych dzieci (od 1 do najwyżej 5 lat), kiedy w siatkówce występują retinoblasty, natomiast w późniejszym wieku, kiedy retinoblasty uległy zróżnicowaniu w retinocyty, które już się nie dzielą — nowotwór ten nie występuje. Stąd obecnie przyjmuje się, że w nowotworach wbrew dawniejszym poglądom, nie tyle występuje odróżnicowanie komórek nowotworowych, ile nowotworzeniu uległy komórki nie zróżnicowane.

Białko p105Rb jest aktywne jedynie w postaci hipofosforylowanej i to tylko we wczesnej fazie G1 cyklu komórkowego, natomiast w pozostałych fazach S, G2 i M jest ono hiperfosforylowane i tym samym nieaktywne. W stanie hipofosforylowanym p105Rb tworzy kompleksy z białkami onkowirusów (dużym antygenem wirusa SV40, polyomą i innymi). Po związaniu z onkoproteinami białko p105Rb staje się nieaktywne, podobnie jak jego postać hiperfosforylowana, występująca w fazach S, G2 i M cyklu komórkowego. Dla swej aktywności przeciwnowotworowej białko p105Rb wymaga skompleksowania z bliżej nie

znanym białkiem jądrowym. Inaktywacja białka p105Rb umożliwia proliferację komórek, w tym również proliferację komórek nowotworowych.

Fosforylacja białka p105Rb odbywa się pod wpływem kinaz zależnych od cyklin (CDK — ang. cyclin dependent kinases), z których każda jest aktywowana tylko w określonej fazie cyklu komórkowego. Białko to ma 10 miejsc fosforylacji seryny i treoniny. Inicjacja fosforylacji p105Rb następuje pod wpływem cykliny E, pojawiającej się w punkcie startu cyklu przed końcem fazy G1. Również cyklina A wpływa na fosforylację p105Rb, zwłaszcza w fazie S. Wreszcie cykliny D, wpływające na start cyklu komórkowego, wiążą się z białkiem p105Rb w jego specyficznym miejscu wiązania z onkoproteinami. Zmutowane białko p105Rb (często tylko z pojedynczą mutacją w miejscu wiązania onkoprotein) ekstrahowane z niewirusowych nowotworów nie wiąże się z onkoproteinami, jak to występuje w przypadku prawidłowego p105Rb. Zmutowane p105Rb nie wiąże się również z jądrowym białkiem zakotwiaczającym, podobnie jak hiperfosforylowane p105Rb, a stając się nieaktywnym nie hamuje proliferacji komórek.

Do najlepiej scharakteryzowanych białek wiążących się z p105Rb należy komórkowy czynnik transkrypcji E2F, który w prawidłowej komórce pośredniczy w ekspresji genów służących wzrostowi komórek w fazie G1. Kompleks p105Rb-E2F występuje tylko w fazie G1 cyklu komórkowego, kiedy p105Rb jest hipofosforylowane. Łączenie się E2F z p105Rb budzi szereg wątpliwości w tłumaczeniu jego roli w hamowaniu proliferacji komórek, zwłaszcza, że białka tworzące kompleksy z p105Rb wykazują duże podobieństwo do wiążących się w tym samym miejscu cząsteczki p105Rb z onkoproteinami i proto-onkogenami. Z kolei jednak p105Rb aktywuje ekspresję czynnika TGF- β 2 o działaniu hamującym proliferację komórek (TGF — ang. transforming growth factor — czynnik powodujący transformację komórek). Wiążąc się z cykliną A tworzy się kompleks wpływający na transkrypcję w fazie S cyklu komórkowego. Białko o zbliżonej strukturze — p107, tworząc kompleksy z onkoproteinami (antygeny T wirusów SV40 i polyoma) oraz cykliną A i E2F, stanowi czynnik wpływający na transkrypcję, będący prawdopodobnie swoistym antagonistą białka p105Rb, hamującym transkrypcję (COBRINK i współaut. 1992, HAMEL i współaut. 1992).

BIĄŁKO P53

Białko p53 zostało wykryte w 1979 roku, a ponieważ było skompleksowane z antygenem T SV40, kompleks ten miał działanie onkogenu. Dopiero w 10 lat później Levine wykazał, że zmutowane p53 jest onkogenem, natomiast niezmutowane jest silnym czynnikiem przeciwnowotworowym (LEVINE i współaut. 1991). Odtąd nastąpiło olbrzymie zainteresowanie białkiem p53, ukazały się tysiące prac na ten temat, a znane pismo naukowe *Science* ogłosiło je molekułą roku 1993. Delecje lub mutacje p53 wykryto w licznych nowotworach (raki płuc, jelit, przelyku, a zwłaszcza różnego rodzaju raki, mięsaki i białaczki w zespole Li-Fraumeni'ego).

Heterozygotyczny gen p53 znajduje się na ramieniu krótkim ludzkiego chromosomu 17-ego. Do nowotworzenia dochodzi podobnie jak w przypadku siatkówczaka (retinoblastoma) na skutek utraty heterozygotyczności, to jest

mutacji lub utraty prawidłowego allela tego genu przy istniejącym (dziedziczenie) zmutowanym pozostałym allelu. Do najczęściej stwierdzonych mutacji tego genu należą delecje lub mutacje punktowe powodujące przesunięcia „ramy odczytu”, wskutek czego dochodzi do syntezy białka nieprawidłowego lub o skróconym łańcuchu z powodu pojawienia się sygnału „stop”, powodującym syntezę jedynie początkowych nieaktywnych fragmentów tego białka.

Wprowadzenie p53 typu „dzikiego” do hodowli komórek nowotworowych powoduje zahamowanie wzrostu tych komórek w fazie G1 lub M cyklu komórkowego. Fibroblasty szczurze transformowane przez wrażliwe na temperaturę mutanty p53 przestają rosnąć, nie dochodząc do fazy S cyklu. W temperaturze 37°C–39, 5°C wymienione mutanty znajdują się w cytoplazmie, natomiast w temperaturze 32°C w jądrze komórkowym, gdzie zachowują się jak typ „dziki”, powodując zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych. Sugeruje się, że w tym wypadku obniżenie temperatury spowodowało prawdopodobnie przewagę transkrypcji allelu „dzikiego” nad zmutowanym.

Wobec gromadzenia danych o defektach genu białka p53, dowodzących niemal powszechnego występowania tego zaburzenia w nowotworach — pytanie dlaczego tak się dzieje, stanowiło jeden z podstawowych problemów do rozwiązania. Już pierwsze obserwacje dowodziły, że inaktywacja p53 występowała na skutek jego skompleksowania z różnymi onkoproteinami (antygen T wirusa SV40, adenowirus E1b, papilloma E6 i inne). Bezpośredniego dowodu dostarczyło badanie ludzkiego homologu mysiego białka MDM2 (dominujący transformujący onkogen), zmapowanego na ludzkim chromosomie 12. Okazało się, że w około jednej trzeciej przypadków wystąpiła jego amplifikacja, powodując wskutek skompleksowania produktu tego genu z białkiem p53 inaktywację tego ostatniego. Swoją funkcję przeciwnowotworową pełni białko p53 dzięki związaniu z DNA, wpływając regulująco na transkrypcję. Miejscem zadziałania p53 w pierwszym rzędzie jest faza G1 cyklu komórkowego, w której następuje zatrzymanie cyklu w przypadku zmutowanego DNA — dzięki czemu występujące opóźnienie przejścia cyklu z fazy G1 do S, czyli reduplikacji DNA, umożliwia jego reparację. W razie niemożności reparacji, również dzięki udziałowi p53, dochodzi do apoptozy, czyli zaprogramowanej śmierci komórki. Ta czynność białka p53 zdaniem niektórych badaczy predestynuje białko p53 do roli „strażnika” prawidłowego genomu, zapobiegającego przekazywaniu zdefektowanego DNA do reduplikacji w fazie S cyklu komórkowego i tym samym do wyprodukowania komórek potomnych o nieprawidłowym DNA, prowadzącym do powstawania komórek niezdolnych do wykonywania prawidłowej funkcji lub do procesu nowotworowego z powodu utraty mechanizmów regulujących proliferację komórek potomnych.

Doniosła rola p53 występuje również w drugim punkcie cyklu komórkowego, mianowicie w przejściu z fazy G2 do M, czyli mitozy. W razie nie dokończonyj syntezy DNA w fazie S następuje zatrzymanie cyklu komórkowego, gdyż komórki potomne mogłyby być pozbawione pewnych genów, na przykład genów produkujących białka przeciwnowotworowe (jak p53, p105Rb i innych). Innymi słowy powstałaby sytuacja opisana w przypadku siatkówczaka w postaci utraty heterozygotyczności, prowadzącej do powstania raka. Tak więc rola p53, polegająca na zapobieganiu powstawania nowotworów, sprowadza się do działania na

dwóch punktach cyklu komórkowego, to jest w punkcie przejścia z fazy G1 do S, gdzie czynność p53 polega na zapobieganiu syntezy zdefektowanego DNA oraz na przejściu z fazy G2 do M, kiedy czynność p53 znów sprowadza się do zatrzymania cyklu komórkowego dla zapobiegnięcia utraty heterozygotyczności z powodu nie dokończonego podwojenia DNA w fazie S (HORST 1993).

Tetramer p53 znajduje się w sąsiedztwie genów produkujących czynniki transkrypcji genów hamujących proliferację i inwazyjność komórek. Stąd mutacje p53, powodując zmniejszoną ekspresję genów produkujących czynniki hamujące proliferację, przyczyniają się do proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych. Mutacje z przesunięciem ramy odczytu, powodującym całkowity brak białka p53, opisano w licznych przypadkach raka, których główną przyczyną wydaje się być brak czynników hamowania proliferacji. U zwierząt całkowicie pozbawionych genu p53, w odróżnieniu od braku białka p105Rb, u których występują zaburzenia rozwojowe, rozwój zarodków jest prawidłowy, natomiast w bardzo wysokim odsetku występują nowotwory, prowadzące do wczesnej śmierci tych zwierząt.

Nowsze badania wykazały, że pod wpływem białka p53 powstaje białko o masie cząsteczkowej 21 kDa (p21) znane pod różnymi nazwami. Ostatnio sugeruje się nazwę PIC1 (ang.: p53 regulated inhibitor of CDKs). Istnieje szereg danych, że PIC1 tworząc stabilny trójskładnikowy kompleks wiąże CDK2 związane z cyklinami D1, A i E. W stransformowanych komórkach PIC1 nie występuje, umożliwiając reakcje CDK na negatywne sygnały wzrostowe, prowadzące do powstania nowotworu. W starzejących się komórkach poziom mRNA dla PIC1 wzrasta 10–20-krotnie, podobnie w komórkach przechodzących w stan spoczynkowy. Nadprodukcja PIC1 hamuje wzrost różnych ludzkich komórek nowotworowych. Działanie PIC1 może być zniwelowane przez nadmiar dużego antygeny T wirusa SV40 (PINES 1994).

Następne białko inhibitorowe cyklu komórkowego CIP2, zwane również CDI1, wykryto poprzez jego wiązanie z CDK2 (lub CDC2) o masie cząsteczkowej 24 kDa i budowie pokrewnej z fosfatazą cdc25, aktywującą cykl komórkowy poprzez aktywację czynnika MPF (powoduje przejście pre-MPF w MPF). mRNA CIP2 pojawia się w późnej fazie G1, a jego nadprodukcja powoduje opóźnienie cyklu w fazie G1 (zbadane na komórkach HeLa i komórkach drożdży) (PINES 1994).

WT1 (ANG. WILMS TUMOR GENE PRODUCT)

Oprócz produktów genów przeciwnowotworowych p53 i p105Rb, również Wt1, delecja produktu genu zlokalizowanego na chromosomie 11p13, powoduje powstanie nowotworu nerek (*nephroblastoma*) poprzez działanie na czynnik transkrypcji. Białko WT1 rozpoznaje tę samą sekwencję DNA (5'-CGCCCCCGC-3') co białko EGR-1 (od ang. extracellular signal regulated kinases), którego akumulacja w jądrze komórkowym wpływa na transkrypcję czynników aktywujących mitogenezę i różnicowanie komórek nerkowych (*nephroblastów*) oraz tkanek gonadalnych. Kontrola transkrypcji przez WT1 polega na jego skompleksowaniu z EGR, powodując poprzez jego represję kontrolę transkrypcji. Następstwem braku produktu genu WT1 jest powstanie nowotworu nerki (*nephroblastoma*).

BIAŁKO P16

W 1992 roku grupa Skolnicka wykazała, że segment chromosomu 9p21 zawiera gen, którego delekcja powoduje powstanie czerniaka skóry. Kiedy sekwencjonowano ten fragment okazało się, że fragment ten zawiera już wcześniej poznaną sekwencję (1993 r.) kodującą białko p16, które wiążąc się z kinazą zależną od cyklin CDK4 powodowało zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 przed jego startem. Na szczególną uwagę zasługuje supresorowe działanie p16 na znaczną liczbę nowotworów, stąd obecne we fragmencie chromosomu 9p21 geny określono jako MTS1 i MTS2 (od ang. multiple tumor suppressor 1 i 2). W szeregu hodowlach ludzkich komórek nowotworowych (glejaków, raków pęcherza, piersi, jajnika, nerek, płuc, czerniaka skóry, białaczki i innych) wykazano delekcje lub inne zmiany w segmencie chromosomu 9p21, co wskazuje na bardziej generalny mechanizm działania przeciwnowotworowego białka p16 (KAMB i współaut. 1994, NOBORI i współaut. 1994).

Przyjmując liczbę znanych już przeszło 100 onkogenów, szacuje się istnienie około połowy tej liczby również produktów genów przeciwnowotworowych. Do mniej poznanych należą:

TGF- β (transforming growth factor beta), którego działanie przeciwnowotworowe polega na zatrzymaniu cyklu komórkowego w późnej fazie G1 z powodu hamowania utworzenia kompleksu cykliny E z kinazą 2 (CDK2), czego następstwem jest brak fosforylacji białka p105Rb powodującej zatrzymanie cyklu.

Szczególny przypadek stanowią nowotwory jelita grubego, wśród których trzeba wyróżnić nowotwory powstające na bazie genu APC rodzinnej polipowatości (familial adenomatous polyposis — FAP), gdzie sugeruje się utratę co najmniej kilku genów zlokalizowanych na różnych chromosomach, co poprzez stopniowe zmiany prowadzi do powstania raka — i tak utrata genu APC na chromosomie 5p21 prowadzi do FAP, następnie mutacja onkogenu ras prowadzi do powstania gruczolaka II stopnia, po czym utrata genu DCC (ang. deleted in colorectal carcinoma) na chromosomie 18 prowadzi do powstania gruczolaka III stopnia i wreszcie utrata genu p53 na 17 chromosomie prowadzi do powstania raka. Tak więc transformacja rodzinnej polipowatości wymaga prawdopodobnie utraty produktów kilku genów przeciwnowotworowych. Istnieją również doniesienia, że rak jelita grubego może być spowodowany utratą innych genów. Takim przykładem jest występowanie raków jelita grubego na skutek utraty genów zlokalizowanych na chromosomie 8p21.

Z innych poznanych produktów genów przeciwnowotworowych należy wymienić: NF1 będący aktywatorem GTPazy oraz NF2 wiążący się z cytoszkieletem; następnie RET będący receptorem kinazy tyrozynowej, którego brak powoduje raka tarczycy; inhibinę (hormon jądrowy hamujący czynność przysadki), który jednocześnie hamuje powstanie guzów jądra; 2-metoksyestradiol (pochodny estrogenu) hamuje powstanie guzów jajnika i wiele innych.

OGÓLNE WNIOSKI

W myśl obecnych poglądów powstanie nowotworu zależy z jednej strony od obecności onkogenów zarówno ustrojowych, jak i pozaustrojowych, z drugiej zaś strony od niedoboru lub utraty produktów genów przeciwnowotworowych, przy czym zagadnienie coraz bardziej skłania się ku mechanizmowi proliferacji komórek, odbywającej się w cyklu komórkowym. Nowsze badania wykazały, że nawet same czynniki cyklu komórkowego mogą być onkogenami, głównie kinazy sprzężone z cyklinami CDK (CDK4 aktywowaną przez cyklinę D1 w fazie startu cyklu, CDK2 aktywowane przez cykliny D i E w późnej fazie G1 oraz CDK2 w fazie S aktywowaną przez cyklinę A). Według nowszej nomenklatury pre-MPF i MPF są zastępowane przez nazwę CDK. Z kolei czynnikami hamującymi cykl komórkowy są białka p105Rb i p53, a zwłaszcza omówione poprzednio inhibitory będące elementami cyklu, zwłaszcza białko p16.

Powstaje pytanie, czy omówione produkty genów przeciwnowotworowych będą nadawać się do terapii nowotworów. Dotychczasowe badania z komórkami nowotworowymi w hodowli stwarzają pewną nadzieję — jednak do zastosowania ich w formie leku wydaje się być jeszcze daleko. Również druga droga polegająca na unieszkodliwieniu onkogenów dotąd nie dawała większych rezultatów. Ostatnio wydaje się, że poczyniono pewien postęp właśnie w tej dziedzinie. Jak wiadomo zmutowany onkogen ras, łącząc się na trwałe z błoną komórkową z powodu niemożności jego hydrolizy z powodu mutacji — na trwałe pobudza cyklazę adenylanową, powodując proliferację komórek aż do powstania nowotworu. Ostatnio dwie grupy badaczy wykazały, że do łączenia się onkogenu ras z błoną komórkową, co jest warunkiem jego działania, jest niezbędny drobny fragment farnezolu (liniowy półtoraterpen), który pod wpływem transferazy farnezylu ulega wbudowaniu do nieaktywnego prekursora ras. Gdyby udało się zahamować tę reakcję, nie doszłoby do wiązania onkogenu ras z błoną i tym samym usunięto by przyczynę powodującą powstanie raka pod wpływem onkogenu ras. Okazało się, że dojrzałe białko ras z wbudowanym fragmentem farnezolu łączy się z błoną komórkową poprzez peptyd CAAX (cysteina z następującymi dwoma alifatycznymi i trzecim jakimkolwiek innym aminokwasem). Są czynione próby zniwelowania peptydu CAAX przez zastąpienie go cząsteczką o podobnym kształcie (np. AA w CAAX zastąpione przez benzodiazepinę), co zapobiegałoby łączeniu się onkogenu ras z błoną komórkową, a co jest warunkiem jego rakotwórczego działania. Zrealizowanie tego problemu byłoby ogromnym sukcesem i drogą do leczenia nowotworów wywołanych poprzez działania onkogenu ras.

PRODUCTS OF THE TUMOR SUPPRESSOR GENES

S u m m a r y

According to the present views generation of carcinomas can be caused by excess of constitutional or environmental carcinogenic agents (oncogenes and mutagens) or by deficiency of anti-carcinogenic agents (products of tumor suppressor genes). Both these substances act upon cell

proliferation taking place within the cell cycle. Even substances of the cell cycle may act as carcinogenic agents e.g. cyclins, especially cyclin D1 active at the starting point of the cell cycle. Products of tumor suppressor genes (p53, p105Rb, p16 and others) act principally as inhibitors of the cell cycle, inhibiting cell proliferation, the principal feature of neoplasmas.

LITERATURA

- BISHOP J. M., 1991. *Molecular Themes in Oncogenesis*, Cell, 64, 235–248.
- CANTLEY L. C., AUGER K. E., CARPENTER C., DUCKWORTH B., GRAZIANI A., KAPELLER R., SOLTOFF S., 1991. *Oncogenes and Signal Transduction*. Cell 64, 281–302.
- COBRINK K., DOWDY S. F., HINDS P. W., MITTNACHT S., WEINBERG R., 1992. *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. TIBS, 17, 312–315.
- CROSS M., DEXTER T. M., 1991. *Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis*. Cell, 64, 271–280.
- HAMEL P. A., GALLIE S. L., PHILLIPS R. A., 1992. *The retinoblastoma protein and cell cycle regulation*. TIG, 8, 180–185.
- HORST A., 1993. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. Post. Biol. Kom. 20, 311–329.
- KAMB A., GRUIS N. A., WEAVER-FELDHAUS J., LIU Q., HARSHAM K., TAVTIGIAN S. V., STOCKERT E., DAY III R. S., JOHNSON B. E., SKOLNICK M. H., 1994. *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science, 264, 436–439.
- KIRSCHNER M., 1992. *The cell cycle then and now*. TIBS, 17, 281–285.
- MARSHALL C. J., 1991. *Tumor Suppressor Genes*. Cell, 64, 313–326.
- McKINNEY J. D., HEINTZ N. 1991. *Transcriptional regulation in the eukaryotic cell cycle*. TIBS, 16, 430–435.
- MURRAY A. W., 1992. *Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls*. Nature, 359, 599–604.
- NASMYTH K., HUNT T., 1993. *Dams and sluices*. Nature, 366, 634–635.
- NOBORI T., MIURA K., WU D. J., LOIS A., TAKABAYASHI K., CARSON D. A. 1994. *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature 368, 753–735.
- PINES J., 1994. *Arresting developments in cell-cycle control*. TIBS, 19, 143–145.
- PINES J., 1994. *p21 inhibits cyclin shock*. Nature, 369, 520–521.
- SAGER R., 1989. *Tumor Suppressor Genes: The Puzzle and the Promise*. Science, 246. 1406–1411.
- WEINSTEIN R. A., 1991. *Tumor Suppressor Genes*. Science, 254, 1138–1145.

ANDRZEJ L. PAWLAK

Zakład Genetyki Człowieka PAN
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

DZIEDZICZENIE PODATNOŚCI NA NOWOTWORY I CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA RYZYKO ZACHOROWANIA

GENETYCZNE ZRÓŻNICOWANIE WRAŻLIWOŚCI NA NOWOTWORY

O ile poznanie genetycznych mechanizmów transformacji nowotworowej ma ogromne znaczenie dla postępu metod leczenia nowotworów, to poznanie genetycznie uwarunkowanych podatności na nowotwory ma ogromne znaczenie dla osób wykazujących taką podatność ze względu na możliwość specyficznego postępowania profilaktycznego z powodu określonego defektu genetycznego.

Wrażliwość osobnicza na nowotwory może być spowodowana indywidualnymi cechami metabolizmu chemicznych karcynogenów, reperacji DNA, stabilności genomu oraz dziedzicznie uwarunkowaną, zmienioną ekspresją protoonkogenów względnie genów supresorowych wobec transformacji nowotworowej. Wymienione procesy należą do funkcji organizmu, których integralność i regulacja stanowią istotny warunek przeżycia ustroju. Oznacza to, że zmiany leżące u podłoża genetycznej wrażliwości na nowotwory mają charakter subtelny, często trudny do określenia w zakresie zmiany funkcji. Stąd duże oczekiwania wiążą się z poznawaniem zmian molekularnych DNA powodujących tę wrażliwość.

Polimorfizmy genetyczne, które wpływają na wrażliwość na nowotwory mogą oddziaływać na etapy powstawania uszkodzeń DNA, reperacji tych uszkodzeń oraz kontroli proliferacji zmienionych komórek. Nakreślony schemat trzech etapów transformacji nowotworowej, na których może ujawniać się wrażliwość, odpowiada w zarysie niżej przedstawionemu podziałowi dziedzicznie uwarunkowanych podatności na nowotwory w oparciu o typ defektu. Proponowany podział, skorelowany z etapami transformacji nowotworowej, można więc uzasadniać nie tylko odmiennością wymienionych form podatności w zakresie typu ich dziedziczenia ale również zależnością od czynników środowiskowych.

GENY WARUNKUJĄCE WRAŻLIWOŚĆ NA KANCEROGENY ŚRODOWISKOWE

Spośród enzymów biorących udział w biotransformacji powszechnie występujących w środowisku produktów niepełnego spalania (głównie wielopierście-

niowe węglowodory aromatyczne — WWA) tylko nieliczne wykazują zróżnicowanie genetyczne w populacji.

Dioksyiny, najaktywniejsze toksyny środowiskowe wyżej opisanej serii, oddziałują z organizmami za pośrednictwem receptora cytoplazmatycznego Ahr, który po związaniu z ligandem, tworzy z białkiem transportowym ARNT heterodimer o wysokim powinowactwie do sekwencji DRE DNA w obrębie promotora genu *CYP1A1*. Gen *Ahr* reguluje ekspresję szeregu indukowanych przez dioksyiny genów, jak transferazy UDP-glukuronylowej, inhibitora aktywacji plazminogenu czy czynnika transformacji nowotworów α , ale indukcja pod wpływem dioksyn jest najwydajniejsza wobec genu *CYP1A1*. Na istnienie genetycznie uwarunkowanego polimorfizmu locus *Ahr* wskazują do tej pory głównie badania fenotypu indukowalności hydroksylazy węglowodorów aromatycznych. Ze względu na regulacyjną funkcję genu w badaniach molekularnych jest niezbędne stosowanie stosunkowo złożonych testów. Niemniej, stosując ilościowe pomiary produktów PCR — fragmentów genu *CYP1A1* otrzymanych w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji RNA, izolowanego z badanych tkanek, można już potwierdzić istnienie znaczących różnic międzyosobniczych w ekspresji tego genu po zadziałaniu dioksyn (VANDEN-HEUVEL i współaut. 1993).

Badania polimorfizmu locus *CYP1A1*, a właściwie polimorfizmów sprzężonych z tym genem strukturalnym przyniosło do tej pory najwięcej informacji o genetycznych różnicach wrażliwości na nowotwory związane z tym genem w ludzkiej populacji japońskiej. Stwierdzono tam występowanie u ponad 10% badanych dodatkowego miejsca cięcia przez enzym restrykcyjny *MspI* w regionie końca 3' genu *CYP1A1* i powiązano tę cechę ze zwiększoną podatnością na raka płuca (KAWAJIRI i współaut. 1990). Wśród Europejczyków opisany wariant występuje sporadycznie (poniżej 1%) i, być może z tego powodu, nie wykazano jego powiązania z rakiem płuca (WEDLUND i współaut. 1994). Inny polimorfizm związany z tym genem stwierdzono w populacji ludzkiej USA (COSMA i współaut. 1993).

Modelowym polimorfizmem genetycznym ze względu na dostępność zarówno molekularnych, jak farmakologicznych metod fenotypizacji jest polimorfizm hydroksylazy debrizochiny. W populacji rozkład aktywności tego enzymu jest dwumodalny, a metody oparte na pomiarach szybkości metabolizmu tego substratu pozwalają stosunkowo skutecznie rozpoznać fenotypy o szybkiej i wolnej hydroksylacji. Genem determinującym tę aktywność jest *CYP2D6*, którego odmiana delecyjna spowodowana mutacją na granicy 3 intronu i 4 eksonu (alel B) cechuje się obniżoną aktywnością hydroksylazy. Oprócz tej delecji fenotyp wolnej hydroksylacji debrizochiny stwierdza się u homozygot mutacji punktowych, które mogą występować w obu głównych allelach. Osoby szybko metabolizujące debrizochinę są albo homozygotami prawidłowego allela AA, albo heterozygotami BA. Wczesne badania oparte na ocenie szybkości eliminacji leku wskazywały na asocjację pomiędzy szybkim metabolizmem debrizochiny a wrażliwością na raka płuca. Kolejni badacze różnili się w ocenie tej asocjacji. Wyniki największej z dotychczasowych serii badań delecji genu *CYP2D6* i fenotypu hydroksylacji debrizochiny w populacji chorych na raka płuca (218 osób) i zdrowych osób kontrolnych (289) sugerują nawet związek w kierunku asocjacji pomiędzy

wolnym metabolizmem debrizochiny a wrażliwością na raka płuca, co stanowiłoby wniosek przeciwny do pierwotnego (TEFRE i współaut. 1994, tabela 1).

Polimorfizm GST1 dotyczy powszechnie występującej delecji genu determinującego izoenzym GST1 μ . Przyjmując istotny udział transferaz glutationowych w reakcjach detoksykacji genotoksycznych produktów aktywacji metabolicznej powszechnie występujących w środowisku produktów niepełnego spalania, oczekiwano relatywnie większych efektów kancerogennych u osób z niedoborem GST1. O ile pierwsze doniesienia na ten temat wydawały się potwierdzać przypuszczenie (tabela 1), to najnowsze doniesienia nie potwierdzają pierwotnych założeń. W grupach 117 chorych z rakiem płuca i 200 chorych grupy kontrolnej, po uwzględnieniu efektów palenia, płci i wieku, nie stwierdzono wpływu genotypu GST1 w klasie μ na ryzyko zachorowania na ten nowotwór (BROCKMÖLLER i współaut. 1993).

Tabela 1

Geny polimorficzne biorące udział w determinacji metabolizmu ksenobiotyków o potencjalnym znaczeniu w kształtowaniu osobniczej wrażliwości na kserogenne działanie WWA; zestawienie wczesnych obserwacji o postulowanych markerach wrażliwości i zakres potwierdzenia hipotezy przez innych badaczy czy na innych populacjach

Gen	Funkcja	Allele	Częstość występowania	Wzrost ryzyka związany z markerem	Weryfikacja hipotezy
<i>Ahr</i>	cytoplazmatyczny receptor TCDD (dioksyn, WWA)	fenotyp wysokiej indukowalności hydroksylazy BP	około 0,1	około 10 $\times$ (rak płuca)	spośród licznych badań, w połowie potwierdzono hipotezę
<i>CYP1A1</i>	hydroksylaza benzopirenu	CYP1A1	0,1 w Japonii; 0,01 w Europie	około 2,5 $\times$ (rak płuca w Japonii)	nie stwierdzono efektu w populacji europejskiej
<i>CYP2D6</i>	hydroksylaza debrizochiny	CYP2D6B (fenotyp wolnej hydroksylacji)	0,05–0,1 w Europie	0,2–0,3 $\times$ (rak płuca w Europie)	1,2 $\times$ rak płuca w Europie
<i>GSTmu</i>	transferaza glutationowa	GST1 μ (-)	0,45	2,7 $\times$ (rak płuca płasko- i drobnokomórkowy w Japonii)	nie potwierdzono na populacji europejskiej

W sumie, poza polimorfizmem związanym z CYP1A1, pozostałe wymienione w tabeli mają tylko ograniczone znaczenie jako ewentualne markery wrażliwości. Z drugiej strony, występowanie potencjalnie wrażliwych genotypów w kombinacji, jak na przykład CYP1A 1m1/m1 i GST1 wzmacnia cechę wrażliwości. W przypadku współwystępowania wysokiej indukowalności CYP1A1 i GST1(-) stwierdza się podwyższone ryzyko raka płuca (ANTTILA i współaut. 1992). Oznacza to, że w grupie chorych o wysokiej indukowalności CYP1A1 można zaobserwować wpływ polimorfizmu GST na częstość zachorowań na raka płuca, co nie było możliwe w populacji ogólnej.

Jako zupełnie odmienną postać dziedzicznej wrażliwości na karcynogeny środowiskowe można wymienić wrażliwość na karcynogenne działanie wirusa EBV. Zespół limfo-proliferacyjny sprzężony z chromosomem X (X-linked lympho-proliferative syndrome — XLP) jest rzadko występującym (głównie u chłopców) typem białaczki, uwarunkowanym ekspresją genu zlokalizowanego na chromosomie X. Zespół ten stanowi interesujący przykład nowotworu, który rozwija się na podłożu silnej predyspozycji genetycznej, jednak transformacja złośliwa, przeważnie w kierunku chłoniaka, następuje wyłącznie w wyniku zadziałania czynnika zewnętrznego, w tym wypadku zakażenia wirusem Epstein-Barra. Ze względu na wzajemne relacje pomiędzy czynnikami istotnymi dla patogenezy transformacji nowotworowej omawiana choroba należy do defektów o charakterze dziedzicznych wrażliwości na czynnik i środowiskowe, a więc mieści się w obszarze badań ekogenetyki. Gen *XLP* zlokalizowano na odcinku terminalnym ramienia długiego chromosomu X dystalnie wobec markera DXS 11 i proksymalnie wobec locus *HPRT* (SHARE i współaut. 1989).

RECESYWNE GENY PODATNOŚCI NA NOWOTWORY

W przebiegu transformacji nowotworowej jedną z charakterystycznych zmian funkcjonalnych są zaburzenia procesów reparacji DNA. Zaburzenie reperacji jako podstawową przyczynę zespołu podatności na nowotwory stwierdza się obecnie głównie w *xeroderma pigmentosum* (XP) oraz zespole Fanconiego. Badania tych recesywnie uwarunkowanych chorób w swoim czasie zwróciło uwagę badaczy na funkcje reparacji uszkodzeń DNA w komórkach prawidłowych. Istotnym osiągnięciem lat ostatnich jest zmapowanie locus genowego XP grupy C (LEGERSKI i PETERSON 1992, THOMSON i współaut. 1990).

Procesy reperacji uszkodzeń DNA stanowią podstawowy atrybut życia i aktualne badania tych procesów w recesywnych podatnościach na nowotwory wskazują na związki funkcjonalne pomiędzy reparacją a transkrypcją i replikacją. Z drugiej strony, badania tych samych chorych w kierunku wrażliwości na czynniki genotoksyczne pozwalają określać związki pomiędzy funkcją genów reperacji DNA a toksycznością względnie mutagennością elementów środowiska (tabela 2).

Do najbardziej znaczących zespołów wrażliwości na nowotwory należy *ataxia telangiectasia* (AT). Nazwa wywodzi się od widocznych objawów: zaburzeń równowagi i zborności ruchowej (*ataxia*) oraz rozszerzeń naczyń krwionośnych, głównie na gałce ocznej, a u osób dorosłych także na skórze twarzy (telangiectazje), a znaczenie wynika z niezwykle wysokiej wrażliwości na promieniowanie jonizujące oraz liczby nosicieli genu (od 0,7% do 5% w różnych populacjach). Wrażliwość ta prowadzi do fatalnych konsekwencji zastosowania radioterapii w przypadkach częstych nowotworów u tych chorych (30% przyczyn zgonów). Na poziomie komórkowym wrażliwość na indukcję aberracji chromosomowych i zwiększona letalność ekspozycji na promieniowanie jonizujące współlistnieje z paradoksalną reakcją braku hamowania proliferacji po ekspozycji na promienie X. Przypuszcza się, że nie występowanie bloku cyklu komórkowego w okresie G2 jest jedną z przyczyn niezdolności komórek AT do naprawy uszkodzeń

spowodowanych przez radiację. Spośród reakcji naprawy DNA stwierdzono w AT niedobór łączenia złamań dwuniciowych DNA (NORTH i współaut. 1990).

Ze względu na powiązanie defektów reparacji DNA z wrażliwością na specyficzne czynniki genotoksyczne również bezobjawowi nosiciele omawianych genów recesywnych mogą odznaczać się zwiększoną zachorowalnością na nowotwory w wyniku ekspozycji na te czynniki. W *xeroderma pigmentosum* i *ataxia telangiectasia* wrażliwość dotyczy odpowiednio promieni UV i X (SWIFT i współaut. 1993, PAWLAK i współaut. 1990). Nie stwierdzono natomiast zwiększonej wrażliwości na specyficznie toksyczne dla homozygot związki, wytwarzające wiązania między niciami DNA u heterozygot anemii Fanconiego.

Tabela 2

Wrażliwość na czynniki genotoksyczne i karcynogenne w dziedzicznie uwarunkowanych recesywnych defektach reparacji/różnicowania

Defekt	Czynnik genotoksyczny	Wzrost wrażliwości <i>in vitro</i> (krotność)	Wzrost ryzyka nowotworu
<i>xeroderma pigmentosum</i> (XP) (A, C, D)	UV, kancerogeny chemiczne	5–10	100% przy ekspozycji
XP wariant	UV	1,6	obniżone w porównaniu do XP
zespół Cockayne	UV	4,6	nie stwierdza się
<i>ataxia telangiectasia</i> (AT)	promienie jonizujące (promienie X)	3,0–3,5	przy wysokiej ekspozycji przeważa toksyczność bezpośrednia
heterozygotci AT	jak wyżej	1,2	zwiększone u osób ekspozowanych na dawki diagnostyczne
anemia Fanconiego	mitomycyna C, związki alkylujące, tworzące wiązania pomiędzy niciami DNA	4–15	wysokie u chorych, niezmiennione u heterozygot

Znaczenie aktualnych badań dziedzicznie uwarunkowanych defektów reparacji DNA dla poznania roli specyficznych uszkodzeń i procesów reparacji w procesie karcynogenezy można zilustrować obserwacjami dokonanymi w zespole Cockayne. Jest to odmiana genetycznej wrażliwości na promienie UV, w której poza zmianami skórnymi obserwuje się ogólne wycieńczenie i zaburzenia neurologiczne. Od *xeroderma pigmentosum* zespół Cockayne'a różni się tym, że chorzy nie wykazują zwiększonej zachorowalności na nowotwory. Na poziomie molekularnych mechanizmów zespół Cockayne'a wyróżnia się defektem preferencyjnej reparacji genów aktywnych (VENEMA i współaut. 1990). Tego rodzaju wybiórcza naprawa była obserwowana powszechnie w organizmach wyższych i przyciągała uwagę badaczy zainteresowanych wpływem specyficznych typów reparacji DNA na toksyczność i karcynogenność uszkodzeń DNA. Z badań zespołu Cockayne'a wynika, że wspomniany defekt wybiórczej naprawy genów

aktywnych prowadzi do zwiększonej toksyczności promieni UV, nie zwiększając podatności chorych na nowotwory.

DOMINUJĄCE GENY PODATNOŚCI NA NOWOTWORY

KNUDSON wysunął w roku 1971 teorię powstawania nowotworu na drodze dwóch mutacji, z których pierwsza może być przekazywana dziedzicznie. W tych przypadkach mamy do czynienia z dziedzicznie uwarunkowaną podatnością na nowotwory, w której ryzyko rozwinięcia się nowotworu jest bardzo wysokie. Pierwszą weryfikacją tej hipotezy było poznanie dziedziczenia siatkówczaka (gen *Rb* od retinoblastoma).

W dalszych badaniach funkcję genu *Rb*, której utrata powoduje rozwój nowotworu, zaliczono do klasy antyonkogenów, czyli genów-supresorów onkogenezy. Tylko nieliczne spośród tych genów występują w formie mutacji przekazywanej dziedzicznie (tabela 3). Dominujący autosomalny charakter dziedziczenia znajdował potwierdzenie w większości badanych rodowodów siatkówczaka. Wyjątkiem od tej reguły były jednak stosunkowo częste odosobnione przypadki

Tabela 3

Dziedziczne uwarunkowania podatności na nowotwory spowodowane utratą funkcji genów supresorowych

Choroba	Nazwa genu	Lokalizacja chromosomowa	Funkcja/aktywność, regulacja ekspresji	Lokalizacja guza
Siatkówczak	<i>Rb</i>	13q4	reguluje transkrypcję czynników E2F/DRTF1, przewaga występowania u płci męskiej (płétno genomowe)	gałka oczna, mięsak kostny, piers, płuco (rak drobno-komórkowy)
Zespół Li-Fraumeni	<i>p53</i>	17p13.1	regulator cyklu życiowego komórki, włącza program apoptozy	jelito grube, piers, płuca
Zespół WAGR z anirią (brakiem tęczówki)	<i>WT1</i>	11p13		nerka (guz Wilmsa)
Zespół Wiedemanna i Beckwitha	<i>WT2</i>	11p15.5	guz powstaje w wyniku wyłącznie ojcowskiej kontroli pletna genomowego genu <i>WT2</i>	nerka (guz Wilmsa)
Neurofibromatosis 1 (choroba Recklinghausena)	<i>NF-1</i>	17q	GTPaza aktywująca białko ras	włókniakonerwiaki o dowolnej lokalizacji
Rodzinnna polipowatość jelita grubego	<i>APC</i> (adenomatous polyposis coli)	5q21	utrata funkcji APC następuje na wczesnych etapach transformacji nowotworowej również w sporadycznych rakach jelita grubego	rak jelita grubego

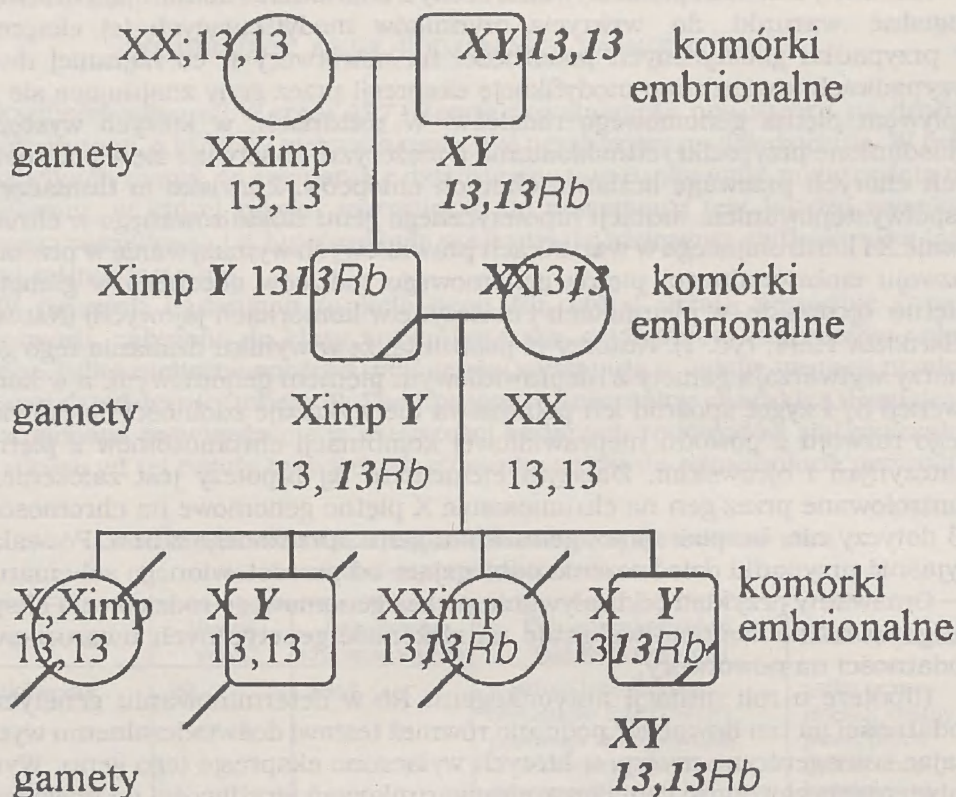
siatkówczaka u mężczyzn. Chorzy ci stosunkowo często przekazują gen *Rb* w linii męskiej.

Klarowny schemat przekazywania cechy o charakterze dominującym stwarza dogodne warunki do wykrycia czynników modyfikujących jej ekspresję. W przypadku genetycznych podatności na nowotwory w co najmniej dwóch przypadkach stwierdzono modyfikację ekspresji przez geny znajdujące się pod wpływem piętna genomowego rodziców. W rodzinach, w których występują odosobnione przypadki retinoblastoma u mężczyzn, obserwuje się w potomstwie tych chorych przewagę liczbową chorych chłopców. Zjawisko to tłumaczy się współwystępowaniem mutacji hipotetycznego genu zlokalizowanego w chromosomie X i kontrolującego w warunkach prawidłowych wymazywanie w przebiegu rozwoju embrionalnego, piętna genomowego rodziców obecnego w gametach (piętno ojcowskie w plemnikach i matczyne w komórkach jajowych) (NAUMOVA i SAPIENZA 1994, ryc. 1). Autorzy ci postulują, że w wyniku działania tego genu chorzy wytwarzają gamety z nieprawidłowym piętnem genomowym, a w konsekwencji 3/4 zygot spośród ich potomstwa nie wykazuje zdolności do prawidłowego rozwoju z powodu nieprawidłowej kombinacji chromosomów z piętnem matczynym i ojcowskim. Dalszym elementem tej hipotezy jest założenie, że kontrolowane przez gen na chromosomie X piętno genomowe na chromosomie 13 dotyczy nie, bezpośrednio, genu *Rb*, a genu sprzężonego z nim. Pozwala to wyjaśnić przypadki dziedziczenia odbiegające od przedstawionego schematu.

Omawiany przykład oddziaływania piętna genomowego rodziców na ekspresję genu retinoblastoma wskazuje na złożoność genetycznych uwarunkowań podatności na nowotwory.

Hipotezę o roli mutacji antyonkogenu *Rb* w determinowaniu genetycznej podatności na ten nowotwór poddano również testowi doświadczalnemu wytwarzając transgeniczne myszy, u których wyłączono ekspresję tego genu. Wyniki potwierdzają złożoność genetycznych uwarunkowań wrażliwości na nowotwory. U wspomnianych myszy stwierdzono taką wrażliwość, jednak nastąpiła zmiana specyficzności w odniesieniu do typu nowotworu: zamiast siatkówczaków u tych myszy rozwijają się gruczolaki przysadki (JACKS 1992). Z drugiej strony wiadomo, że u podatnych na nowotwory myszy transgenicznych, wykazujących niekontrolowaną ekspresję genu SV40, typowym nowotworem jest właśnie retinoblastoma (HARLOW 1992).

Przełomem w badaniach dominujących genów podatności na nowotwory było stwierdzenie, że zespół rodzinnego występowania nowotworów (zespół Li-Fraumeni) jest spowodowany mutacją genu *p53* (MALKIN i współaut. 1990). Zespół ten cechuje się rodzinnym występowaniem nowotworów, w tym guzów wieku dziecięcego, mięsaków tkanek miękkich i kości, guzów mózgu, raka piersi, białaczki i raka kory nadnerczy. Z kolei gen *p53*, znany również jako regulator cyklu życiowego komórki i programowanej śmierci komórki (apoptozy), niezwykle często (w ponad 50% badanych guzów) wykazuje zmiany (mutacje somatyczne) w tkance nowotworowej. Wypadnięcie funkcji tego genu prowadzi do osłabienia kontroli proliferacji i stanowi znaczący (ale raczej późny) etap procesu transformacji nowotworowej. Dominujący charakter mutacji genu *p53* w zespole Li-Fraumeni wynika z unieczynniania produktu prawidłowego genu *p53* poprzez tworzenie nieaktywnych heterodimerów z produktem genu zmutowanego. Za-



Ryc. 1. Skutki mutacji i utraty funkcji hipotetycznego genu (na przedstawionym schemacie oznaczony *imp*) zlokalizowanego w chromosomie X i kontrolującego w warunkach prawidłowych wymazywanie piętna genomowego rodziców w przebiegu rozwoju embrionalnego (według NAUMOVEJ i SAPIENZA 1994).

Chromosomy wpisane w symbole reprezentujące poszczególne osoby przedstawiają zapis piętna chromosomów komórek somatycznych we wczesnych stadiach rozwoju embrionalnego. Poniżej tych symboli są przedstawione zapisy genomu plemników i komórek jajowych. Chromosomy gamet różnią się od chromosomów komórek somatycznych piętnem genomowym, co zaznaczono czcionką standardową (piętno matczyne) lub pogrubionym *italikiem* (piętno ojcowskie). W komórkach somatycznych dla prawidłowego różnicowania i funkcji niezbędne jest współwystępowanie komplementarnych zestawów chromosomów naznaczonych jeden — piętnem ojcowskim drugi — matczynym.

Chory mężczyzna przekazuje potomstwu chromosomy X i 13 z nie zmienionym żeńskim piętnem genomowym, jakie otrzymał od matki. W potomstwie tego mężczyzny, któremu matka przekazała z chromosomem X również nieprawidłowy gen kontrolujący procesy wymazywania piętna genomowego, przeważać będą zygoty o letalnych kombinacjach chromosomów nie zrównoważonych pod względem piętna genomowego. Spośród możliwych kombinacji genowych w potomstwie omawianego chorego trzy zygoty wykazują taki letalny brak zrównoważenia; zdolność przeżycia wykazuje tylko syn, który od ojca, razem z prawidłowym chromosomem Y, otrzyma chromosom 13 o również o prawidłowym piętnie ale z genem *Rb*.

skakujący był wynik doświadczonego wyłączenia ekspresji obu aleli genu *p53* u myszy — zwierzęta rozwijały się prawidłowo. (DONEHOWER i współaut. 1992). Wobec blisko 100% penetracji dominującego genu, determinującego zespół Li-Fraumeni można było oczekiwać letalności tej zmiany. Z drugiej strony, zgodnie z oczekiwaniami, w wieku do 6 miesięcy u tych myszy rozwijały się chłoniaki, mięsaki, guzy nadnerczy lub gonad.

Rodzinnie występujące guzy nerek zaliczono do nowotworów powstających zgodnie ze schematem Knudsona dwóch mutacji w jednym locus. Chory z dziedzicznie uwarunkowanym guzem nerki (guz Wilmsa) pierwszą mutację dziedziczy od rodziców, czym różni się od chorych z guzami indukowanymi przez czynniki zewnętrzne, u których ten etap transformacji ma charakter mutacji somatycznej. Druga mutacja, zgodnie z teorią Knudsona, tak w przypadkach uwarunkowanych czynnikami zewnętrznymi (sporadycznych), jak w przypadkach dziedzicznych predyspozycji, ma z reguły charakter mutacji somatycznej. Nowsze badania wykazały, że guz Wilmsa może powstawać w wyniku mutacji w co najmniej 3 loci genowych (MOUTOU i współaut. 1993):

1. Gen *WT1*, mieszczący się w locus sprzężonym, ale nie identycznym, z locus aniridii (11p13); guzy Wilmsa determinowane przez gen *WT1* występują jako element zespołu WAGR (guz Wilmsa, aniria, genito-urinary abnormalities, mental retardation).

2. Gen *WT2*, mieszczący się w regionie 11p15.5, występuje u chorych z zespołem Wiedemanna-Beckwitha (WBS), w którym predyspozycji do nowotworów, w tym do guza Wilmsa, towarzyszą liczne wady rozwojowe, w tym najbardziej charakterystyczne — zaburzenia symetrii wzrostu i przerost języka.

3. Gen do tej pory nie zmapowany, jednak na jego istnienie wskazuje znaczna liczba przypadków dziedzicznego guza Wilmsa nie sprzężonego z loci genowymi *WT1* i *WT2*.

Jednym z elementów złożoności patogenezy guzów Wilmsa jest fakt, że obraz kliniczny zespołu Wiedemanna-Beckwitha (WBS) rozwija się na podłożu przewagi piętna genomowego ojca w wyniku występowania w obu chromosomach 15 chorego dziecka genu *WT2* (a najprawdopodobniej również szeregu sprzężonych genów) pochodzenia ojcowskiego.

U chorych z guzem Wilmsa nie obciążonych występowaniem tego nowotworu w rodzinie, w około 1/3 przypadków stwierdza się utratę alleli *WT1* lub *WT2*.

Ważnym rodzajem wrażliwości na nowotwory są dziedziczone jako cechy dominujące podatności na specyficzne typy nowotworów, takie jak niektóre formy polipowatości jelita grubego a także w podatności na raka tarczycy. W przypadkach tych prawdopodobieństwo zachorowania nosicieli takich genów jest bliskie 100%. Rodzinna polipowatość jelita grubego (FAP — familial adenomatous polyposis, albo APC — *adenomatous polyposis coli*) występuje z częstością od 3 do 15 przypadków na 100 tysięcy osób, co stanowi w przybliżeniu 1/3 wszystkich dziedzicznie uwarunkowanych raków jelita grubego. Cechą wyróżniającą ten defekt jest możliwość rozpoznania nosiciela genu obciążonego 100% ryzykiem transformacji złośliwej na podstawie występowania charakterystycznych mnogich polipów poprzedzających rozwój raka. Chorzy ci od kilku lat mają możliwość poddania się profilaktycznej operacji usunięcia jelita grubego i śluzówki odbytnicy z wszczępieniem w miejsce tej śluzówki pętli jelita krętego

i zachowaniem odbytu. Operacje te wykonuje się w Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej w Poznaniu. Jej wykonanie stwarza choremu szansę znacznie dłuższego przeżycia i uniknięcia bardziej obciążającej operacji, jaka byłaby konieczna po wystąpieniu zmian złośliwych.

Gen APC zlokalizowano w regionie q21-22 chromosomu 5. Produkt tego genu jest supresorem proliferacji a wypadnięcie jego funkcji odgrywa decydującą rolę w powstawaniu raka jelita grubego u chorych nosicieli mutacji (GRODEN i współaut., 1991). Klasyczna teoria Knudsona zakładała, że komórki heterozygotyczne są chronione przed niedoborem funkcji genu APC i warunkiem transformacji nowotworowej jest zmutowanie prawidłowego allele APC. Obecnie, przyjmując, że transformacja nowotworowa jest skutkiem łańcucha mutacji genów o synergistycznym działaniu na procesy proliferacji, można założyć, że wzrost gruczolaków (polipów) może następować również w wyniku zmienności ekspresji genu APC w komórkach heterozygot, która może prowadzić do miejscowych niedoborów supresora (produktu genu APC). Kluczowe znaczenie genu APC w patogenezie raka jelita grubego zachęca do diagnostyki molekularnej tych defektów. Przy zastosowaniu znanych podejść diagnostycznych jest to możliwe w 30%–50% przypadków. Ponieważ rozpoznanie takie może nastąpić znacznie wcześniej aniżeli rozpoznanie oparte na obecności polipów w śluzówce jelita grubego otwiera ono nowe możliwości przed profilaktyką opartą na hamowaniu procesu transformacji przy użyciu leków przeciwnowotworowych.

Pozostałe, poza rodzinną polipowatością jelita grubego, przypadki dziedzicznie uwarunkowanych raków jelita grubego (hereditary non-polyposis colon cancer — HNPCC) cechują się tym, że stany przedrakowe nie manifestują się w nich w tak wyraźnej formie, jak to ma miejsce w polipowatości: nie stwierdza się polipów ani takich objawów sygnalizujących podatność na raka, jak zmiany barwnikowe siatkówki, które występują u osób z genem APC. Dziedzicznie uwarunkowane raki jelita grubego bez polipowatości łączy się z mutacjami powodującymi zwiększoną częstość mutacji (tzw. geny mutatorowe, jeden z nich zlokalizowano w chromosomie 2). Ich rozpoznawanie przedobjawowe nie może więc opierać się na objawach klinicznych i cała nadzieja w tym zakresie w rozwoju diagnostyki molekularnej. Dotychczas jedyną dostępną metodą rozpoznawania podatności w tych rodzinach jest oznaczanie dziedziczenia sprzężonych z poznanymi genami HNPCC markerów molekularnych. Takie podejście badawcze wymaga jednak pełnych danych o badanej rodzinie i tylko wyjątkowo duże rodziny dostarczają informacji wystarczających dla postawienia prognozy.

GENETYCZNE ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI A POZIOMY DOPUSZCZALNYCH EKSPOZYCJI TOKSYCZNYCH

Pytanie o przyczyny zachorowania danej osoby różni się zasadniczo od pytania o przyczyny częstego występowania jakiegoś nowotworu w określonej populacji. Z powyższym wiąże się różnica podejść badawczych pomiędzy medycyną profilaktyczną a epidemiologią (ROSE 1985).

Metody molekularne, definiując różnice genetyczne na poziomie sekwencji genów, zwiększają zakres interpretacji ich wpływu na osobniczą podatność na

nowotwory o badania porównawcze populacji różniących się pulą genową (przykładem mogą być badania polimorfizmu sprzężonego z locus CYP1A1 u Japończyków).

Badania epidemiologiczne dużych grup stosunkowo często wykazują wpływ niektórych czynników na ryzyko zachorowania na nowotwory, ponieważ znamienność wzrostu ryzyka związanego z nosicielstwem markera może być funkcją liczebności badanej grupy. Dla oceny ryzyka indywidualnego ważniejsza, od statystycznej znamienności różnic międzygrupowych, jest amplituda wzrostu ryzyka związana z markerem.

Identyfikacja osób podatnych na nowotworzenie jest możliwa w oparciu o markery wzrostu ryzyka wskazujące na wrażliwość nie tylko znacząco wyższą, ale również wielokrotnie przewyższającą wartości kontrolne.

Szczególne znaczenie ma rozpoznawanie wrażliwości na promieniowanie jonizujące w celu unikania szkód spowodowanych zbędną ekspozycją diagnostyczną (kobiety heterozygoty AT wykazują zwiększone ryzyko zachorowania na raka piersi w wyniku mammografii) a także negatywnych efektów jatrogennych radioterapii nowotworów.

Genetycznie uwarunkowane osobnicze różnice metabolicznej aktywacji wwa i innych produktów niepełnego spalania prowadzą do znaczących różnic w biologicznie efektywnych poziomach ekspozycji i powinny być brane pod uwagę przy ustalaniu dopuszczalnych poziomów ekspozycji, to jest norm obejmujących całość populacji.

Odrębną od oceny indywidualnego ryzyka sprawą jest identyfikacja i ocena znaczenia specyficznych czynników genetycznych, które wpływają na częstość zachorowań na nowotwory w populacji.

Nakreślone rozróżnienie podejść badawczych w poradnictwie genetycznym i zawodowym z jednej strony i w epidemiologii z drugiej znajduje swoje odbicie również w stosowanych metodach.

Testy różnic zagrożenia nowotworem oparte na analizie zawartości adduktów związków genotoksycznych do DNA wykazują szereg zalet takich jak czułość i możliwości przechowywania materiału badanego. Postuluje się wzajemną pozytywną zależność pomiędzy wysoką aktywnością enzymów wytwarzających aktywne metabolity wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (wwa) a zawartością adduktów DNA. Addukty nie są jednak bezpośrednimi produktami interesujących nas polimorficznych enzymów, co sprawia, że do wspomnianych wyżej źródeł zmienności aktywności dołącza się zmienność zależna od kinetyki łańcucha dalszych przemian tych produktów *in vivo*, a także od złożonej procedury laboratoryjnej. Wnioski z oznaczania adduktów, przydatne do oceny różnicowania populacji pod względem zagrożenia związanego z ekspozycją (m.in. na WWA), do tej pory nie mogą być wykorzystane do prognozowania osobniczej podatności.

W badaniach osobniczych różnic w zakresie mikrosomalnych oksygenaz, zależnych od cytochromów P450, metodą z wyboru jest obecnie badanie zmian aktywności specyficznych białek połączone z badaniami mutacji w omawianych genach a także polimorfizmów DNA sprzężonych z tymi genami. Testy oparte na ocenie aktywności polimorficznych białek napotykają na utrudnienie wynikające z pozagenetycznych źródeł zmienności, takich jak indukowalność syntezy

enzymów przez liczne elementy środowiska, tkankowa specyficzność ekspresji genów, a także zmienność aktywności w zależności od pory dnia i roku. Pomimo złożoności, stosunkowo dobrą rozdzielczością cechują się testy *in vivo* oparte na różnicach aktywności polimorficznych białek. Przykładem jest test kofeinowy, który może służyć do określania fenotypu indukowalności hydroksylazy benzopirenu.

INHERITED SUSCEPTIBILITY TO CANCER AND OTHER FACTORS INFLUENCING OCCURRENCE OF CANCER

Summary

The types of defects and polymorphisms leading to hereditary susceptibility to cancer include: proneness to increased DNA damage, recessive syndromes of faulty DNA repair and differentiation, as well as dominant mutations of cell cycle and control of proliferation. The cancer susceptibility syndromes inherited in a dominant fashion are caused by mutations in tumor suppressor genes. These genes are recessive in relation to wild type alleles. In two syndromes of hereditary mutations in tumor suppressor genes (*Rb* and *WT2*), their expression *in vivo* may be influenced by the sex of the transmitting parent, what points to modulation by imprinting.

Genetic heterogeneity of the population in susceptibility to genotoxic agents is related to the individual variation in acceptable levels of exposure to agents and factors, such as products of incomplete combustion (PIC), UV (*xeroderma pigmentosum*) and ionizing radiation (*ataxia telangiectasia*).

DNA damage and adducts are considered to be indicative of genotoxic exposure and its effect, as well as of modulation of carcinogenic damage by genetic polymorphisms. Gene and protein polymorphisms are considered as markers of increased individual risk.

Since environmental factors are considered to be liable to control, the individual susceptibility to enhanced DNA damage and environmentally induced cancers could be counteracted by decreasing the levels of contamination or exposure. This explains the wide interest in markers of this individual sensitivity. Most of the postulated markers of sensitivity to PIC do not, however, prove to be generally applicable in that sense. Their prognostic value is limited either by low amplitude of the effect, or by their character specific either to the population or to the cancer type. The polymorphisms most relevant to cancers induced by PIC exposures may be those of inducibility of benzopyrene hydroxylase, and some other DNA polymorphisms concerning the *CYP1A1* gene.

LITERATURA

- ANTTILA S., VAINIO H., HIETANEN E., CAMUS A.-M., MALAVEILLE C., BRUN G., HUSGAFEL-PURSIANEN K., HEIKKILA L., KARJALAINEN A., BARTSCH H., 1992. *Immunohistochemical detection of pulmonary cytochrome P450IA and metabolic activities associated with P450IA1 and P450IA2 isozymes in lung cancer patients*. Environm. Health Persp. 98, 179-182.
- BROCKMÖLLER J., KERB R., DRAUKOULIS N., NITZ M., ROOTS I., 1993. *Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class isoenzymes and in lung cancer patients and controls*. Cancer Res., 53, 1004-1011.
- COSMA G., CROFTS F., TAIOLI E., TONIOLO P., GARTE S., 1993. *Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene*. J Toxicol Environ Health. 40, 309-16.
- DONEHOWER L. A., HARVEY M., SLAGLE B. L., MCARTHUR M. G., MONTGOMERY C. A., JR., BUTEL J. S., BRADLEY A., 1992. *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature 356, 215-221.
- GRODEN J., THLIVERIS A., SAMOWITZ W., CARLSON M., GELBERG L., ALBERTSEN H., JOSLYN G., STEVENS J., SPIRIO L., ROBERTSON M., SARGEANT L., KRAPCHO K., WOLFF E., BURT R., HUGHES J. P., WARRINGTON J., MCPHERSON J., WASUMITH J., LE PASLIER D., ABDERRAHIM H., COHEN D., LEPPERT M., WHITE R., 1991. *Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene*. Cell 66, 589-600.
- HARLOW E., 1992. *For our eyes only*. Nature 359, 270-271.

- JACKS T., FAZELI A., SCHMITT E. M., BRONSON R. T., GOODELL M. A., WEINBERG R. A., 1992. *Effects of an Rb mutation in the mouse*. *Nature* 359, 295–300.
- KAWAJIRI K., NAKACHI K., IMAI K., YOSHII A., SHINODA M., WATANABE J., 1990. *Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene*. *FEBS Lett.* 263, 131–133.
- KNUDSON A. G. Jr., 1971. *Mutation and cancer statistical study of retinoblastoma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820–823.
- LEGERSKI R., PETERSON C., 1992. *Expression cloning of a human DNA repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C*. *Nature* 359, 70–73.
- MALKIN D., LI F. P., STRONG L. C., FRAUMENI J. F. JR., NELSON C. E., KIM D. H., KASSEL J., GRYKA M. A., BISCHOFF F. Z., TAINSKY M. A. i współaut., 1990. *Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcoma, and other neoplasms*. *Science* 250, 1233–1238.
- MONTOU C., CHOMPRET A., HOCHER J., TOURNADE M.-F., ZUCKER J. -M., LEMERLE J., JUNIEN C., BONAITI-PELLIÉ C., 1993. *Testing genomic imprinting in Wilms' tumor*. *Eur. J. Hum. Genet.* 1, 190–205.
- NAUMOVA A., SAPIENZA C., 1994. *The Genetics of Retinoblastoma, Revisited*. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 264–273.
- NORTH P., GANESH A., THACKER J., 1990. *The rejoining of double strand breaks in DNA by human cell extracts*. *Nucleic Acid Res.* 18, 6205–6210.
- PAPADOPOULOS N., NICOLAIDES N. N., WEI Y-F., RUBEN S. M., CARTER K. C., ROSEN C. A., HASELTINE W. A., FLEISCHMANN R. D., FRASER G. M., ADAMS M. D. i współaut., 1994. *Mutation of mutL homolog in hereditary colon cancer*. *Science* 263, 1625–1628.
- PAWLAK A. L., IGNATOWICZ R., KOTECKI M. 1990. *Increased frequency of chromatid breaks in lymphocytes of heterozygotes of ataxia telangiectasia after in vitro treatment with caffeine*. *Mutation Res.*, 230, 197–204.
- ROSE G., 1985. *Sick individuals and sick populations*. *Int. J. Epidemiol.* 14, 32–38.
- SWIFT M., HEIM R. A., LENCH N. J., 1993. *Genetic aspects of ataxia telangiectasia*. *Adv. Neurol.* 61, 115–125.
- SYLLA B. S., WANG Q., HAYOZ D., MCCOY Z., MILLER C. R., LUCIER G. W., BELL D. A. 1989. *Multipoint linkage mapping of the Xq25-q26 region in a family affected by the X-linked lymphoproliferative syndrome*. *Clin Genet.* 36, 459–62.
- TEFRE T., DALY A. K., ARMSTRONG M., LEATHART J. B. S., IDLE J. R., BROGGER A., BORRESEN A.-L., 1994. *Genotyping of CYP 2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and controls*. *Pharmacogenetics*, 4, 47–57.
- THOMPSON L. H., BROOKMAN K. W., JONES N. J., CARRANO A. V., 1990. *Molecular cloning of the human XRCC-1 gene which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange*. *Mol. Cell Biol.* 10, 6160–6171.
- VANDEN-HEUVEL J. P., CLARK G. C., THOMPSON C., LATHROP G. M., LENOIR G. M., 1993. *CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes*. *Carcinogenesis* 14, 2003–2006.
- VENEMA J., MULLENDERS L. H. F., NATARAJAN A. T., VAN ZEELAND A. A., MAYNE L. V., 1990. *The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with defect in repair of UV-induced damage in transcriptionally active DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4707–4711.
- WEDLUND P. J., KIMURA S., GONZALEZ F. J., NEBERT D. W., 1994. *1462V mutation in the human CYP1A1 gene: lack of correlation with either the Msp I 1,9kb (M2) allele or Cyp1A1 inducibility in three-generation family of East Mediterranean descent*. *Pharmacogenetics* 4, 21–26.

KRZYSZTOF SZYFTER

Zakład Genetyki Człowieka PAN

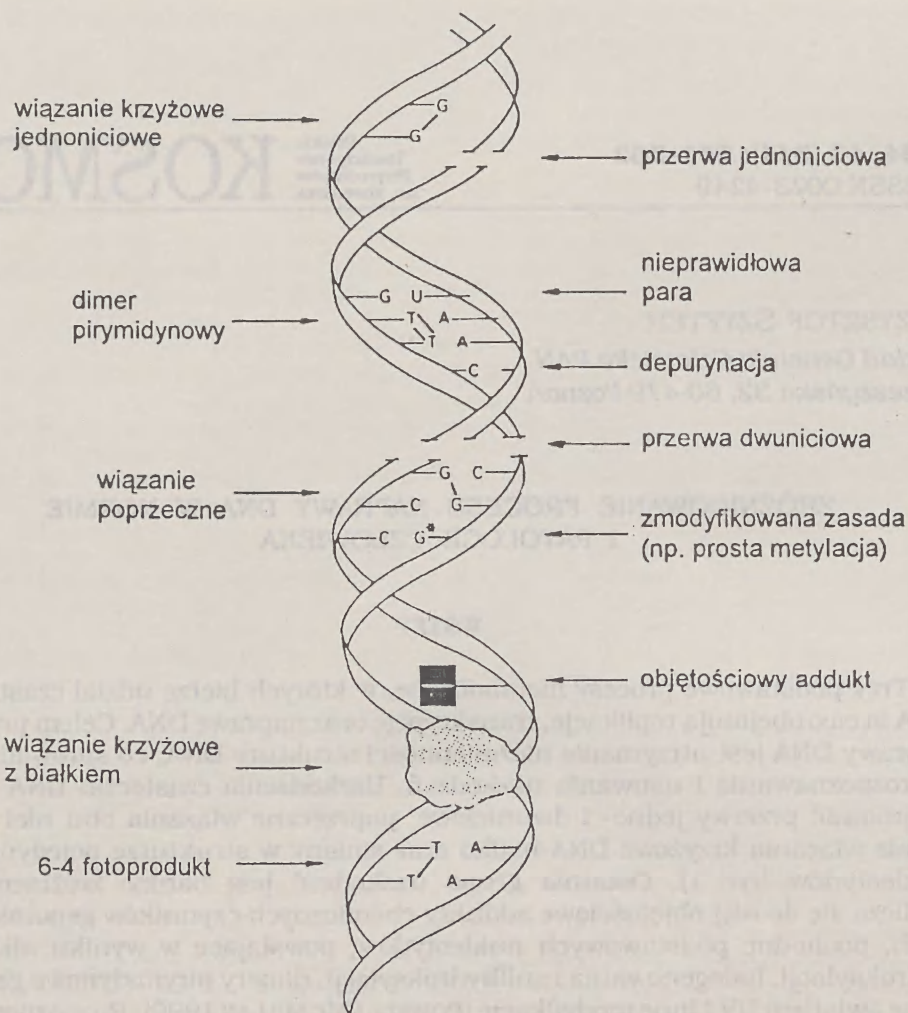
Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

ZRÓŻNICOWANIE PROCESU NAPRAWY DNA W NORMIE I PATOLOGII CZŁOWIEKA

WSTĘP

Trzy podstawowe procesy metaboliczne, w których bierze udział cząsteczka DNA *in vivo* obejmują replikację, transkrypcję oraz naprawę DNA. Celem procesu naprawy DNA jest utrzymanie niezmienności struktury DNA, co sprowadza się do rozpoznawania i usuwania uszkodzeń. Uszkodzenia cząsteczki DNA mogą obejmować przerwy jedno- i dwuniciowe, poprzeczne wiązania obu nici DNA, trwale wiązania krzyżowe DNA-białko oraz zmiany w strukturze pojedynczych nukleotydów (ryc. 1). Ostatnia grupa uszkodzeń jest bardzo zróżnicowana i zalicza się do niej objętościowe addukty chemicznych czynników genotoksycznych, pochodne podstawowych nukleotydów, powstające w wyniku alkilacji, hydroksylacji, halogenowania i sulphydroksylacji, dimery pirymidynowe generowane światłem UV i inne modyfikacje (POWELL i McMILLAN 1990). Rozpoznawanie i usuwanie uszkodzeń następuje w wyniku szeregu mechanizmów dostosowanych do rodzaju uszkodzenia a określanych łącznie jako naprawa DNA.

Celem artykułu jest wykazanie zróżnicowania procesu naprawy DNA w populacji ludzkiej, dotyczącego zarówno poziomu całego genomu, fragmentów cząsteczki DNA a nawet sięgającego po różnice w obrębie pojedynczego genu. Na zróżnicowanie procesu DNA ma wpływ szereg czynników identyfikowanych na różnych poziomach od molekularnego, przez komórkowy po fizjologię organizmu. Znaczny jest udział czynników genetycznych, bowiem wiele enzymów uczestniczących w procesie naprawy DNA ma charakter polimorficzny. Czynniki patogeniczne uwiadczenia się poprzez wpływ na aktywność enzymów naprawczych w chorobach nowotworowych. Natomiast wiek osobniczy jest traktowany jako czynnik gospodarza. Przegląd czynników wpływających na zróżnicowanie naprawy DNA w populacji ludzkiej stanowi treść niniejszego artykułu. Poza ramami tego opracowania znajduje się natomiast omówienie różnic w szybkości i wydajności naprawy poszczególnych typów uszkodzeń.



Ryc. 1. Rodzaje uszkodzeń DNA powstających pod wpływem czynników genotoksycznych.

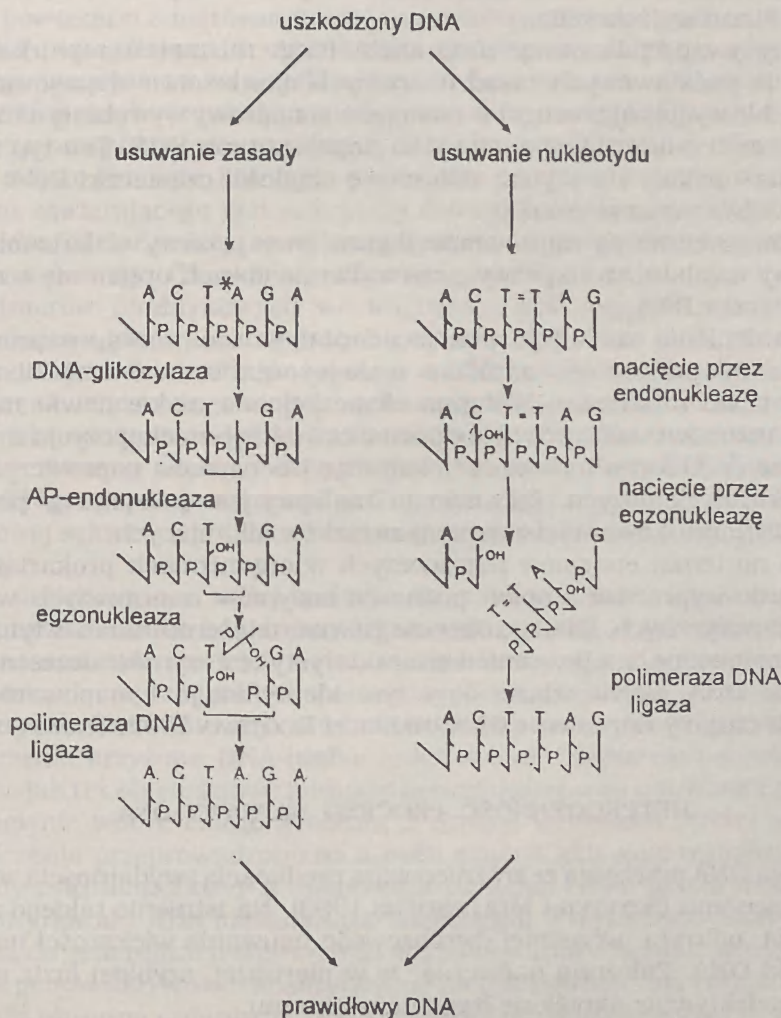
MECHANIZMY PROCESU NAPRAWY DNA

Jak wspomniano wyżej, istnieje kilka mechanizmów naprawy DNA dostosowanych do korygowania poszczególnych typów uszkodzenia DNA (DEFAIS 1990, LINDAHL 1990).

Bezpośrednie i jednostopniowe usuwanie uszkodzeń ma zasięg ograniczony do naprawy niektórych fotouszkodzeń oraz metylacji nukleotydów. Pierwszy proces jest znany pod nazwą fotoreaktywacji. Natomiast grupa alkilowa (w pierwszym rzędzie metylowa) może podlegać wycięciu przy udziale alkilotrans-

ferazy i przeniesieniu na jedną z reszt cysteinowych enzymu. Postulowano także istnienie enzymu odpowiedzialnego za wstawianie puryn w miejsca apurynowe.

Zdecydowana większość uszkodzeń jest usuwana na drodze naprawy przez wycinanie. Pierwszym etapem jest rozpoznanie i usunięcie uszkodzenia, ale charakter uszkodzenia wpływa na wybór jednego z dwóch wariantów znanych jako usuwanie zasady lub usuwanie nukleotydu (ryc. 2). Warianty różnią się między sobą na tym właśnie etapie. Podczas naprawy przez usuwanie zasady przy udziale DNA-glikozylaz powstaje miejsce apurynowe, usuwane w dalszym ciągu wraz z towarzyszącymi kilkoma nukleotydami przy udziale AP-endonukleazy. W odróżnieniu od AP-endonukleaz, cechujących się niską specyficznością, DNA-glikozylazy stanowią grupę enzymów o znacznej specyficzności, bowiem na



Ryc. 2. Schematyczny mechanizm naprawy DNA przez wycinanie. Po lewej stronie widnieją kolejne etapy naprawy DNA przez wycinanie zasady a po prawej stronie przedstawiono naprawę DNA opartą o wycinanie nukleotydu.

ogół rozpoznają tylko jeden, określony typ uszkodzenia. Wśród DNA-glikozylaz na osobną wzmiankę zasługuje DNA glikozylaza formamido-pirymidynowa — enzym odpowiedzialny za usuwanie uszkodzeń DNA związanych z genotoksycznością wolnych rodników tlenowych. Natomiast naprawa uszkodzenia przez usuwanie nukleotydu obejmuje najpierw nacięcie jednej nici DNA po stronie 5', co wywołuje częściowe rozplecenie podwójnej helisy, a następnie usunięcie uszkodzonego nukleotydu we fragmencie jednej nici o długości do kilkudziesięciu nukleotydów. W bakteriach taką funkcję pełni, na przykład, UVRABC nukleaza. Na tym etapie jest konieczne współdziałanie helikaz. W obu wariantach następuje naówczas wypełnianie powstałej luki przy udziale polimerazy DNA z wykorzystaniem drugiej, nie uszkodzonej nici jako matrycy syntezy DNA. Na tej drodze następuje odtworzenie pierwotnej struktury DNA, czyli całkowity powrót do stanu wyjściowego.

Odrębny wyspecjalizowany mechanizm (ang. mismatch repair) służy do korygowania podstawowych zasad tworzących niewłaściwie dopasowane pary. Sytuacje takie występują na ogół w następstwie naprawy wywołanej silną dawką mutagenu, co u bakterii jest znane jako naprawa typu SOS. Ten typ naprawy DNA jest nastawiony na szybką odbudowę ciągłości cząsteczki DNA kosztem wierności odtworzenia sekwencji.

Ponadto odrębnie są naprawiane dwuniciowe przerwy w łańcuchu DNA. Podstawowy mechanizm naprawy przerw dwuniciowych opiera się o rekombinację cząsteczek DNA.

Na wymienienie zasługuje jeszcze adaptatywność procesu naprawy DNA. W skrócie adaptatywność odróżnia reakcję organizmu (komórki) na małe i wysokie dawki mutagenu. Wstępna ekspozycja na niskie dawki mutagenu nadaje organizmowi cechę pewnej odporności. Późniejsza ekspozycja na wysoką dawkę może dodatkowo indukować ekspresję izoenzymów naprawczych, łagodzących skutki ekspozycji. Zjawisko to najlepiej jest poznane w przypadku naprawy DNA indukowanej działaniem związków alkilujących.

Wiedza na temat enzymów naprawczych w organizmach prokariotycznych zdecydowanie wyprzedza stopień poznania enzymów naprawczych w organizmach eukariotycznych. Dlatego obecnie główne natężenie badań w tym kierunku jest nastawione na poznanie i charakterystykę enzymów uczestniczących w naprawie DNA. Ściśle wiąże się z tym identyfikacja i mapowanie genów kodujących enzymy naprawcze (HOEJMAKERS i BOOTSMA 1992, THOMPSON 1991).

HETEROGENNOŚĆ PROCESU NAPRAWY DNA

Naprawa DNA przebiega ze zróżnicowaną prędkością i wydajnością w różnych częściach genomu (SZYFTER i MULLENDERS 1993). Na istnienie takiego zjawiska wskazywała odkryta wcześniej dwufazowość usuwania większości uszkodzeń z cząsteczki DNA. Założono naówczas, że w pierwszej, szybkiej fazie naprawie podlegają selektywnie określone fragmenty genomu.

Badania tego zagadnienia przez kilka lat były ograniczone do uszkodzeń indukowanych światłem UV. Opracowano metodę monitorowania powstawania i usuwania dimerów pirymidynowych z DNA. Metoda ta obejmuje napromienio-

wanie komórek światłem UV, izolację DNA, trawienie enzymami restrykcyjnymi. W tym punkcie próbkę dzieli się na dwie części i jedną z nich poddaje się trawieniu endonukleazą V faga T4, specyficzną wobec dimerów pirymidynowych. Następnie próbki trawioną i nietrawioną endonukleazą V rozdziela się elektroforetycznie, poddaje transferowi techniką Southerna i hybrydyzuje ze specyficznymi sondami DNA. Porównanie sygnału próbki trawionej i nietrawionej pozwala na ocenę ilościową dimerów tymidynowych. Technika ta umożliwia nie tylko ocenę ilościową poziomu dimerów w genomie lecz także w poszczególnych genach a nawet w ich fragmentach (HANAWALT 1991).

Po raz pierwszy różnice szybkości naprawy DNA wykryto porównując całkowity DNA naczelných i sekwencje alfa, składające się z wysokopowtarzalnych elementów strukturalnych. Naprawa przebiegała wolniej w sekwencjach alfa. Różnice powiązano z nierównomiernym udziałem obu wymienionych klas DNA w procesie transkrypcji i stąd dalsze badania zmierzały w tym kierunku. W szeregu pomysłowo zaprojektowanych doświadczeń wykazano, że rejony aktywnie transkrybowane ulegają naprawie w pierwszej kolejności.

W celu zweryfikowania powyższej hipotezy porównano szybkość naprawy DNA w całym genomie komórek chińskiego chomika z szybkością naprawy segmentu zawierającego gen reduktazy dwuhydrofolianowej (*DHFR*) z tego samego źródła. Dodać należy, że wybrany gen jest aktywny podczas wszystkich faz cyklu komórkowego. Okazało się, że po upływie 26 godzin od napromieniowania liczba dimerów tymidynowych we fragmencie zawierającym gen *DHFR* spadła o 2/3, podczas gdy w całym genomie pozostawało jeszcze około 85% dimerów. Analogicznie przedstawiała się sytuacja w badanym później genomie ludzkim.

W obrębie tego samego modelu wykazano różnice szybkości naprawy pomiędzy nicią aktualnie transkrybowaną a nie transkrybowaną. Badania rozszerzono na analizę domeny naprawy DNA. Wykazano, że rejon preferencyjnej naprawy genu *DHFR* grupuje się wokół końca 5' i przyległego segmentu. Dotyczy to zatem początkowej sekwencji transkrybowanego genu, sekwencji promotorowej i regulatorowej.

O ile przedstawione wyżej badania dotyczyły usuwania dimerów pirymidynowych, to w ostatnich latach przybyło znacznie więcej przykładów. Korzystając z wypracowanego modelu wykazano preferencyjną naprawę genu *DHFR* w komórkach uprzednio eksponowanych na cisplatynę, nitrogranulogen, 8-metoksypsoralen i aktywny metabolit benzo(a)pirenu. Udowodniono, że zarówno połączenia krzyżowe DNA-białko indukowane działaniem psoralenu i cytotatyków, jak też objętościowe addukty benzo(a)pirenu są usuwane z genu *DHFR* preferencyjnie wobec całego genomu. Z drugiej natomiast strony analogiczne doświadczenia przeprowadzono na innych genach aktywnie transkrybowanych przez cały cykl komórkowy a mianowicie na genie *HPRT* (fosforybotransferaza hipoksantynowa) i *ADA* (dezaminaza adeninowa). Przytoczone fakty są solidną podstawą do generalizacji obserwacji i sformułowania wniosku, że preferencyjna naprawa genów aktywnie transkrybowanych jest powszechna i stanowi naturalną reakcję obronną organizmu wobec czynników genotoksycznych. Zjawisko to łączy się ze zmianami struktury chromatyny podczas transkrypcji, co ułatwia dostęp enzymom naprawczym.

Preferencyjną naprawę aktywnego genu wykazano wobec ludzkiej metalotioneiny. Model ten był bardziej skomplikowany, gdyż metylotioneina jest aktywna tylko w pewnych fazach cyklu komórkowego, a na aktywność wpływa obecność jonów cynku (+2). Wykazano preferencyjność naprawy DNA tylko w odniesieniu do okresu faktycznej aktywności tego genu. Doświadczenia oparte o całkowicie inną metodykę przeprowadzono w odniesieniu do usuwania (6-4)-fotodimerów z genu insuliny. Również i w tym przypadku aktywność transkrypcyjna łączyła się z preferencyjną naprawą DNA.

Teza powyższa uległa pewnemu ograniczeniu po odkryciu, że dodatkowe grupy metylowe wprowadzone do DNA w wyniku ekspozycji na bezpośrednio działające czynniki metylujące są usuwane z tą samą szybkością z genu *DHFR* i całkowicie z genomu. Odkrycie to jest tłumaczone przez naprawę tych uszkodzeń na drodze mechanizmu przez wycinanie zasady. Zatem preferencyjność naprawy w genach transkrybowanych byłaby ograniczona do naprawy przez wycinanie nukleotydu, ale skądinąd wiadomo, że jest to najczęstszy mechanizm usuwania uszkodzeń z DNA.

Dodatkowe przekonywujące potwierdzenie preferencyjności naprawy DNA w genach aktywnych uzyskano jeszcze na innym modelu. Badano usuwanie dimerów pirymidynowych z linii fibroblastów mysich. W DNA tych komórek zlokalizowano dwa proto-onkogeny: aktywnie transkrybowany *c-abl* i nieaktywny *c-mos*. Liczba fotodimerów powstałych w wyniku naświetlenia promieniowaniem UV była w obu genach porównywalna. Jednak po 24 godzinach liczba fotodimerów znacząco zmalała w onkogenie *c-abl*, podczas gdy w onkogenie *c-mos* naprawa była praktycznie niezauważalna.

Wydaje się, że najbardziej spektakularne doświadczenie dotyczyło porównania przeżywalności komórek poddanych działaniu światła UV i zdolności naprawy DNA. Przedmiotem porównania były normalne ludzkie fibroblasty, fibroblasty chorego na *xeroderma pigmentosum* (opis choroby poniżej) zdefektowane pod względem naprawy DNA i komórki chomika, które naturalnie cechuje niski poziom naprawy DNA *in vitro*. Naprawa DNA w obrębie genu *DHFR* była wydajna w normalnych komórkach ludzkich i w komórkach chemicznych. Wysoka była też przeżywalność obu typów komórek normalnych w przeciwstawieniu do komórek linii XP. Wnioskuje się zatem, że o przeżywalności w warunkach ekspozycji na światło UV decyduje zdolność naprawy DNA w znaczących rejonach genomu, tożsamy z aktywnie transkrybowanymi genami. Natomiast ogólna zdolność naprawy DNA w całym genomie ma drugorzędne znaczenie.

W ramach badań porównawczych nad naprawą DNA w różnych klasach DNA w pracowni V. A. Bohra (LEDoux 1992) przeanalizowano naprawę szeregu uszkodzeń w jądrowym (nDNA) i mitochondrialnym (mtDNA) DNA. Autorzy mieli na uwadze między innymi zweryfikowanie ugruntowanego przekonania o braku naprawy DNA w mtDNA. Stwierdzono brak naprawy dimerów pirymidynowych i silnych modyfikacji wywołanych działaniem związków alkilujących oraz minimalną naprawę adduktów cisplatyny w mtDNA. Natomiast poprzeczne wiązania nici DNA przy udziale cisplatyny oraz pojedyncze ugrupowania N-metylowe na zasadach purynowych były wydajnie naprawiane. Konkluzją opisanych badań jest stwierdzenie, że usuwanie uszkodzeń z mtDNA jest w wysokim stopniu funkcją typu uszkodzenia. Wydaje się, że w mtDNA przebiega tylko proces

naprawy DNA przez wycinanie zasad a mechanizm naprawy przez wycinanie nukleotydu, odpowiedzialny za usuwanie objętościowych adduktów, nie funkcjonuje w mitochondriach. Ponieważ mtDNA nie koduje enzymów naprawczych wnioskuje się, że za naprawę DNA są odpowiedzialne enzymy importowane z jądra komórkowego.

Na podkreślenie zasługuje znaczenie badań prowadzonych w zespole Ph. Hanawalta (Stanford, California), które w najwyższym stopniu przyczyniły się do poznania zjawiska heterogenności procesu naprawy DNA.

MIĘDZYOSOBNICZE RÓŻNICE W SPRAWNOŚCI PROCESU NAPRAWY DNA

Efekty genotoksyczne wykazują ogromne zróżnicowanie indywidualne w populacji ludzkiej, co tłumaczy się jej polimorfizmem genetycznym. Udział czynników genetycznych w modulacji efektu genetycznego wykazano w odniesieniu do wszystkich trzech podstawowych etapów oddziaływania czynników genotoksycznych z materiałem genetycznym (HARRIS 1987). Charakter polimorficzny wykazują enzymy biorące udział w aktywacji metabolicznej chemicznych genotoksykantów (faza I), detoksykacji zaktywowanych genotoksykantów (faza II) oraz naprawy DNA. O ile różnice aktywności enzymów fazy I w leukocytach ludzkich sięgają 1000 razy, to według danych różnych autorów różnice UDS nie przekraczają na ogół kilku razy (VAHAKANGAS i współaut. 1984). Leukocyty krwi obwodowej składają się z różnych subpopulacji komórkowych, co może mieć wpływ na poziom UDS. Jednak w znacznie bardziej homogennej populacji keratynocytów także obserwowano indywidualne zróżnicowanie UDS indukowanego mutagenami chemicznymi, działającymi bezpośrednio i wymagającymi aktywacji metabolicznej (LAWRENCE i BENFORD 1993). Indywidualne zróżnicowanie naprawy DNA wykrywane jako różnice UDS znajduje potwierdzenie w obserwacjach usuwania adduktów z DNA. Przykładowo, w zespole Oescha (OESCH i współaut. 1987) określono wydajność usuwania adduktów metylowanych oraz PAH: DNA w różnych odcinkach czasowych, stwierdzając istnienie różnic indywidualnych zarówno u palaczy tytoniu, jak i osób niepalących, gdzie zróżnicowanie miało większy zasięg.

Obserwowane różnice stanowią rodzaj wypadkowej pomiędzy zróżnicowaniem aktywności szeregu enzymów współuczestniczących w naprawie DNA. Dlatego określono także różnice aktywności konkretnych enzymów w leukocytach ludzkich. Dla DNA-glikozylazy uracylowej stwierdzono rozrzut aktywności od 1 do 45 razy a dla O⁶-alkilo-guanino-DNA alkilotransferazy od 1 do 90 razy (VAHAKANGAS i współaut. 1991).

Jednocześnie wykazano, że istnieje cały szereg czynników wpływających na sprawność mechanizmu naprawy DNA u człowieka. Istotnym czynnikiem jest charakter ekspozycji obejmującej także palenie tytoniu, bowiem istnieje możliwość wywołania odpowiedzi adaptatywnej, omówionej w punkcie dotyczącej mechanizmów naprawy DNA. Również sposób i składniki pożywienia człowieka wpływają na proces naprawy DNA. W badaniach modelowych na zwierzętach laboratoryjnych wykazano podniesienie sprawności naprawy DNA u szczurów, których dieta miała obniżony poziom tłuszczu i całkowitą wartość kaloryczną.

Stwierdzono zmienność sezonową procesu naprawy DNA. Istotnym czynnikiem jest ogólny stan zdrowia, gdyż obserwowano obniżenie sprawności procesu naprawczego w takich przypadkach, jak choroba Alzheimera czy zespół Downa. W ostatnim przypadku poziom naprawy DNA można było korygować doustnym podawaniem siarczanu cynku. Rola dwóch dalszych czynników, a mianowicie wieku i występowania chorób nowotworowych zostanie omówiona obszerniej w dalszej części.

WPLYW WIEKU NA SPRAWNOŚĆ NAPRAWY DNA

Podwyższona częstość występowania chorób somatycznych indukowanych czynnikami genotoksycznymi sugerowała kumulowanie się uszkodzeń DNA wraz z wiekiem. Konsekwentnie wydedukowano obniżanie się sprawności naprawy DNA w starszym wieku (SETLOW 1983).

Postulowany negatywny wpływ wieku na system naprawy DNA opisali bardzo wcześnie LAMBERT i współpracownicy (1979) na przykładzie syntezy naprawczej DNA indukowanej *in vitro* w leukocytach krwi obwodowej, ekspozowanych na światło UV. Dalsze badania poszerzyły tę korelację na inne typy komórek (m.in. fibroblasty, hepatocyty, neurony). Zwrócono uwagę, że negatywny wpływ na sprawność procesu naprawy DNA ma nie tylko wiek organizmu, ale także wiek komórki. Zastosowanie specyficznych inhibitorów naprawy DNA, działających na poszczególne etapy procesu, pozwoliło na stwierdzenie, że najwyższy stopień zależności od wieku cechują wczesne etapy naprawy fotouszkodzeń, a mianowicie rozpoznanie uszkodzenia oraz nacięcie DNA. Udało się także powiązać wpływ wieku i diety na naprawę DNA. W doświadczeniach na szczurach wykazano, że dieta o obniżonej wartości kalorycznej redukuje utratę sprawności naprawy DNA pojawiającej się wraz z wiekiem.

Wzięto także pod uwagę inne rodzaje ekspozycji (KNUDSEN 1992). Dużo uwagi poświęcono usuwaniu alkilacji puryn z uwagi na wysoki stopień zmetylowania DNA towarzyszący (indukujący ?) procesowi kancerogenezy. Naprawę zalkilowanych puryn cechowała negatywna zależność od wieku jeszcze silniejsza niż w przypadku fotouszkodzeń. Sygnalizowano jednak także brak powiązania poziomu metylacji DNA z wiekiem pacjentów, u których rozpoznano niektóre choroby nowotworowe.

Obniżanie się sprawności procesu naprawy DNA wraz z wiekiem koresponduje z danymi epidemiologicznymi, wskazującymi na zwiększoną częstość występowania większości chorób nowotworowych w starszym wieku.

JEDNOSTKI CHOROBOWE ZWIĄZANE Z NIEDOBOREM SYNTEZY NAPRAWCZEJ DNA

Opisano szereg jednostek chorobowych, w których stwierdzano całkowity lub częściowy brak syntezy naprawczej DNA (HANAWALT i SARASIN 1986). Jak zostanie to wykazane poniżej, jest to zróżnicowana grupa chorób genetycznie uwarunkowanych, których cechą wspólną — oprócz niedoboru syntezy naprawczej DNA — jest zwiększona częstość występowania określonych chorób nowotworowych.

Najwcześniej rozpoznana została *xeroderma pigmentosum* (XP), która (podobnie jak i inne niżej omawiane jednostki chorobowe) dziedziczy się jako choroba recesywna, autosomalna. Cechą, która pozwoliła na wyróżnienie XP, jest nadwrażliwość na światło słoneczne, a zwłaszcza jego ultrafioletową komponentę. W częściach ciała eksponowanych na światło rozwijają się różne postaci raków skóry. Opis pozostałych licznych wad morfologicznych i fizjologicznych, obejmujących przede wszystkim układ neurologiczny, nie mieści się w granicach niniejszego opracowania. Jednak w obrębie cech klinicznych XP wyprowadzono 9 komórkowych klas komplementacyjnych XP, różniących się typem defektu naprawy DNA. Badania przy zastosowaniu inhibitorów poszczególnych etapów naprawy DNA oraz tak zwanej komplementacji komórkowej (korygowanie błędów w danym klonie komórkowym za pomocą innego klonu) wskazują na zdefektowanie etapu nacinania DNA w sąsiedztwie fotouszkodzenia w większości klas XP. Nie jest to jeszcze pełna odpowiedź, bowiem nie tłumaczy istnienia aż tylu różnych klas XP (CLEAVER 1990).

W zespole Blooma także występuje nadwrażliwość na światło słoneczne a ponadto zahamowanie wzrostu sięgające po karłowatość oraz niedobory immunologiczne. Ze wszystkich zespołów chorobowych, w których ma miejsce brak lub niedobór syntezy naprawczej DNA zapadalność na choroby nowotworowe jest najwyższa w zespole Blooma. Najczęściej są to ostre białaczki limfatyczne. Istnieją wskazania, że niedobór syntezy naprawczej DNA jest spowodowany zdefektowaniem DNA-ligazy I i DNA-glikozylazy uracylowej.

Chorobę *ataxia telangiectasia* (AT) cechuje nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące oraz szereg innych czynników uszkadzających DNA. Prawdopodobnie ma to wpływ na wysoką mutabilność i częste występowanie aberracji chromosomowych. Wyróżnia się co najmniej 4 grupy komplementarne AT. Defekt molekularny prowadzi do wad układów neurologicznego i immunologicznego. Towarzyszące zespołowi choroby nowotworowe (np. chłoniaki) dotyczą najczęściej komórek immunologicznie kompetentnych. Także część pacjentek z rakiem piersi można zakwalifikować do zespołu AT. Niemniej, do dzisiaj — mimo bardzo intensywnych badań — nie udało się precyzyjnie ustalić błędów w mechanizmie naprawy DNA.

Anemia Fanconiego ma charakter postępujący w kierunku pancytopenii. Nadwrażliwość na działanie czynników genotoksycznych ogarnia szeroki zakres i znajduje odbicie w wysokim poziomie aberracji chromosomowych i spontanicznych wymian chromatyd siostrzanych. Poziom ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych, głównie ostrej nieлимfatycznej białaczki w niewielkim tylko stopniu przewyższa statystyczne ryzyko.

Niektóre cechy zespołu Cockayne (CS) przypominają zespół Blooma. Jednak oprócz karłowatości i nadwrażliwości na światło słoneczne do cech stałych zalicza się niedorozwój umysłowy i przedwczesne starzenie. Wyróżniono trzy grupy komplementacyjne. Zespołowi CS nie przypisano żadnej określonej choroby nowotworowej, a ryzyko wystąpienia nie odbiega od statystycznego.

Do chorób, w których występuje całkowity lub częściowy niedobór syntezy naprawczej DNA zalicza się też dziedziczną retinoblastomę. Ryzyko wystąpienia nowotworu gałki ocznej wielokrotnie przekracza w tym przypadku tło statystyczne.

czne. W odróżnieniu od wymienionych wyżej chorób retinoblastoma dziedziczy się jako cecha autosomalna dominująca.

Opisane wyżej choroby należą do jednostek rzadkich. Niemniej w znaczący sposób wpływają na zróżnicowanie populacji ludzkiej w zakresie sprawności syntezy naprawczej DNA. Oprócz wymienionych jednostek chorobowych donoszono o częściowym niedoborze syntezy naprawczej DNA w przypadku wielu innych chorób, na przykład w schizofrenii, zespole znamion dysplastycznych, zespole zaburzeń rogowacenia, zespole Downa czy w chorobie Alzheimera.

NAPRAWA DNA W CHOROBACH NOWOTWOROWYCH

Przyjęcie założenia o powiązaniu chorób nowotworowych z ekspozycją na egzogenne lub endogenne czynniki karcynogenne zwróciło uwagę na rolę naprawy DNA, jako czynnika zabezpieczającego przed powstawaniem zmian w strukturze DNA a prowadzących w konsekwencji do transformacji nowotworowej. Rozumowanie to dotyczy tylko genotoksycznych czynników karcynogennych, ale większość z nich posiada taki charakter i działa w następującym ciągu wydarzeń:

czynnik genotoksyczny → uszkodzenie DNA →
mutacja → zmiana genotypu → zmiana fenotypu

Jak wykazano, niedoborowi syntezy naprawczej DNA w omówionych wyżej jednostkach chorobowych towarzyszy zwiększona częstość występowania chorób nowotworowych. Całkowicie koresponduje z tym obniżenie aktywności enzymów naprawczych w materiale klinicznym uzyskiwanym z nowotworów oraz w komórkowych liniach wyprowadzonych z nowotworów. Stwierdzono znaczne obniżenie aktywności O⁶-metyloguanino-DNA metylotransferazy w limfocytach krwi obwodowej pacjentów z nielinfatyczną białaczką. Ten sam enzym wykazywał również obniżoną aktywność w komórkach nowotworów mózgu. Obniżenie aktywności naprawczej DNA występowało jednocześnie w sąsiednich komórkach, rozpoznanych histopatologicznie jako normalne (SILBER i współaut. 1993).

Wydaje się, że zjawisko to ma charakter ogólny, bo fakt częściowego niedoboru syntezy naprawczej DNA odnotowano w odniesieniu do różnych typów nowotworów, między innymi raka okrężnicy i raka jelita grubego. Interesujące jest dalsze rozszerzenie tej obserwacji na zdrowych krewnych w rodzinach, w których występował rak jelita grubego i rak piersi (PERO i współaut. 1989). Analogicznie stwierdzono obniżoną naprawę DNA u córek pacjentek z rakiem piersi. Odkryto również obniżenie naprawy DNA towarzyszące wtórnym nowotworom.

Niemniej, ostatnio zwrócono uwagę na fakt, że nie ma jasności, czy obniżenie aktywności enzymów naprawczych jest skutkiem procesu nowotworzenia, czy też pierwotny częściowy niedobór syntezy naprawczej DNA przyczynił się do rozwoju choroby nowotworowej.

Z drugiej jednak strony komórki nowotworowe cechuje znacznie zwiększona (w porównaniu z komórkami normalnymi) aktywność metaboliczna. Wysoka proliferacja, której towarzyszy intensywna synteza replikacyjna DNA ułatwia naprawę DNA poprzez zwiększenie dostępności miejsc uszkodzonych dla enzymów naprawczych (STEWART 1992). Mamy zatem do czynienia z dwoma przeciw-

epigenetyczne, modyfikujące przebieg tego procesu — kokarcinogeny (czynniki wzmacniające działanie mutagenów) i czynniki antymutagenne / antykarcynogenne (zapobiegające wpływowi czynników mutagennych na DNA i inne makromolekuły komórkowe, stymulujące procesy naprawy mutacji, lub zmniejszające aktywność biologiczną mutagenów) (HARRIS 1991).

W świetle powyższych rozważań, szczególnego znaczenia nabiera problem dokładnego poznania właściwości mutagennych i karcynogennych związków chemicznych wprowadzanych do środowiska w związku z rozwojem przemysłu, a także wykrywania wczesnych efektów biologicznych działania tych związków na człowieka — monitorowanie biologiczne.

BIOLOGICAL EFFECTS OF MUTAGENIC AGENTS

Summary

There is an increasing body of evidence that mutagenic agents (biological, chemical and physical) play an important role in the etiology of human diseases. Mutations may occur in the germinal as well as in the somatic cells.

Mutations of the germ cells may result on infertility or fertilization of damaged cells, the later leading to abortion or birth of a malformed fetus.

Somatic-cells mutations may have various biological effects, depending on the period of the human life at which the mutation occurs. If it occurs during the prenatal life, a teratogenic or carcinogenic effect will be observed. If the somatic cell is damaged during the postnatal life, this will lead to neoplastic transformation.

Therefore it is extremely important to know the mutagenic, teratogenic and carcinogenic effects of various biological, chemical and physical agents in order to eliminate them from our environment.

LITERATURA

- BRENT L. R., 1986. *Definition of a Teratogen and the Relations of Teratogenicity to Carcinogenicity*. Teratology 34, 359–360.
- CHUNG C. S., MYRIANTHOPOULOS N. C., 1987. *Congenital Anomalies: Mortality and Morbidity, Burden and Classification*. American Journal of Medical Genetics 27, 505–523.
- DWORKIN P. H., 1993. *Pediatric Urban & Partner*, Wydawnictwo Medyczne, Wrocław, 211–261.
- HARRIS C. C., 1991. *Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990s*. Cancer Res. (Suppl.) 51, 5023–5044.
- HORST A., 1993. *Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego*. Postępy Biologii Komórki, 20, 311–329.
- ŁASSOTA Z., 1989. *Biologia Molekularna*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 463–486.
- PATHAK S., 1989/1990. *Cytogenetic abnormalities in cancer: with special emphasis on tumor heterogeneity*. Cancer and Metastasis Rev. 8, 299–318.
- PITOT H. C., 1993. *The Molecular Biology of Carcinogenesis*. Cancer, 72, 3, 962–970.
- SORSA M., YAGER J. W., 1987. *Cytogenetic Surveillance of Occupational Exposures*. Cytogenetics. Red. by G. OBE and A. BASLER, Springer Verlag, 345–360.
- SPITZ M. R., BONDY M. L., 1993. *Genetic Susceptibility to Cancer*. Cancer, 72, 3, 991–995.
- TREJBALOVA M., ZIDEK S., TREJBAL E., 1986. *Ryzyko farmakoterapii w ciąży*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 11–15.
- YARNOLD J. R., 1992. *What are Cancer Genes, and how do they Upset Cell Behaviour?* Eur. J. Cancer, 28, 1, 251–255.
- YUNIS J. J., TANZER J., 1993. *Molecular Mechanisms of Hematologic Malignancies*. Critic. Rev. in Oncogenesis, 4(2), 161–190.

stawnymi procesami w komórkach nowotworowych. Porównanie uszkodzeń DNA w komórkach nowotworowych i normalnych najczęściej wskazywało na wyższy ich poziom w komórkach normalnych niż nowotworowych. Można to interpretować jako przewagę ułatwionej naprawy DNA, związanej z szybką proliferacją komórek nowotworowych nad efektem obniżenia aktywności enzymów naprawczych w komórkach neoplastycznych. Potwierdzenie tej obserwacji znaleźliśmy także w badaniach własnych nad adduktami DNA generowanymi ekspozycją na dym papierosowy u pacjentów z rakiem krtani. Poziom zmetylowania reszt guanozynowych w normalnej tkance krtani przewyższał analogiczne wartości uzyskane dla tkanki guza krtani. Podobne obserwacje poczyniono porównując poziom adduktów PAH:DNA w tkance normalnej i nowotworowej w przypadku raków: języka, warg i jamy ustnej u palaczy tytoniu.

UWAGI KOŃCOWE

Populacja ludzka jest głęboko zróżnicowana pod względem syntezy naprawczej DNA. Ponieważ proces ten ma określone zadania na rzecz komórki a dalej tkanki i organizmu niedobory syntezy naprawczej DNA mają określone konsekwencje (HEMMINKI 1993). W artykule wykazano powiązania sprawcze niedoborów syntezy naprawczej DNA z nowotworzeniem i starzeniem.

Badania nad mechanizmami naprawy DNA oprócz efektów poznawczych przyniosły też skutki praktyczne. Indukcję syntezy naprawczej DNA uznano za biomarker generacji uszkodzeń DNA (ASHBY 1988). Pozwoliło to na opracowanie ilościowej oceny przebiegu procesu naprawy DNA (WATERS 1984). Po zahamowaniu syntezy replikacyjnej DNA mierzy się inkorporację znakowanej tymidyny do komórek, co odpowiada tak zwanej nieprogramowanej syntezie DNA (ang. *unscheduled DNA synthesis* — UDS) traktowanej jako miernik ilościowy procesu naprawy DNA. Alternatywnie syntezę naprawczą ocenia się techniką autoradiografii, która lokalizuje miejsca naprawy w komórce. Ocena syntezy naprawczej DNA jest istotnym parametrem w analizie czynników genotoksycznych.

PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL VARIABILITY OF DNA REPAIR IN HUMAN

Summary

DNA repair plays a crucial role in protection of human genetic material against genotoxic agents including carcinogens, ensuring genome stability.

Variability of DNA repair was observed on many levels. There are several mechanisms of damage removal and a number of enzymes taking part in the specific steps of DNA repair. Hence, variations in efficiency of DNA repair among healthy individuals can be explained in terms of genetic polymorphism. There are also some exogenous and endogenous factors affecting the DNA repair machinery in human organism. The first group includes diet and genotoxic exposure whereas the second comprises age (negative linear correlation) and health status. Within the group of health status factors neoplasticity and diseases with hereditary DNA repair deficit are discussed extensively.

The well documented heterogeneity of DNA repair inside the genome concerns differences between classes of DNA (e.g. nuclear *v.* mitochondrial or repetitive *v.* single copy) and preferential repair of actively transcribed genes.

The main message of the article is that DNA repair should be recognized as fairly individual and, moreover, as being modulated by many factors.

LITERATURA

- ASHBY J., 1988. *Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals*. Mutat. Res., 204, 543-551.
- BOHR V. A., 1991. *Gene specific DNA repair*. Carcinogenesis, 12, 1983-1992.
- CLEAVER J. E., 1990. *Do we know the cause of Xeroderma pigmentosum?*, Carcinogenesis, 11, 875-882.
- DEFAIS M., 1990. *Mechanisms of repair in mammalian cells*. W: *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis II* (red.) COOPER C. S. i GROVER P. L., Springer Verlag, Berlin, 51-70.
- HANAWALT Ph. C., 1991. *Heterogeneity of DNA repair at the gene level*. Mutat. Res., 247, 203-211.
- HANAWALT Ph. C., SARASIN A., 1986. *Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities*. Trends in Genetics, May 1986, 124-129.
- HARRIS C. C., 1987. *Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair*. Carcinogenesis, 10, 1563-1566.
- HEMMINKI K., 1993. *DNA adducts, mutations and cancer*. Carcinogenesis, 14, 2007-2012.
- HOEJMAKERS J. H., BOOTSMAN D., 1992. *DNA repair: two pieces of the puzzle*. Nature Genetics, 1, 313-314.
- KNUDSEN L. E., 1992. *Evaluation of UDS in human lymphocytes as an indicator of genotoxic exposure*. Ph. D. Thesis, Copenhagen Univ.
- LAMBERT B., RINGBORG U., SKOOG L., 1979. *Age-related decrease of UV-induced DNA repair synthesis in human leukocytes*. Cancer Res., 39, 2792-2795.
- LAWRENCE J. N., BENFORD D. J., 1993. *Chemically-induced UDS in cultures of adult human epidermal keratinocytes*. Mutat. Res., 291, 105-115.
- LEDoux S. P., WILSON G. L., BEECHAM E. J., STEVENSNER K., BOHR V. A., 1992. *Repair of mtDNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells*. Carcinogenesis, 13, 1967-1973.
- LINDAHL T., 1990. *Repair of intrinsic DNA lesions*. Mutat. Res., 238, 305-313.
- OESCH F., AULMANN W., PLATT K. L., DOERJER G., 1987. *Individual Differences in DNA repair capacities in man*. Arch. Toxicol., Suppl. 10, 172-179.
- PERO R. W., JOHNSON D. B., MARKOVITZ M., DOYLE G., LUND-PERO M., SEIDEGARD J., HALPER M., MILLER D. G., 1989. *DNA repair synthesis in individuals with and without a family history of cancer*. Carcinogenesis, 10, 683-697.
- POWELL S., McMILLAN T. J., 1990. *DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation*. Radiotherapy and Oncology, 19, 95-108.
- SETLOW R. B., 1983. *Variations in DNA repair among humans*. W: *Human Carcinogenesis* (red.) HARRIS C. C., ATRUP H., Academic Press, New York 231-254.
- SILBER J. R., MUELLER B. A., EWERS T. G., BERGER M. S., 1993. *Comparison of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain*. Cancer Res., 53, 3416-3420.
- STEWART B. W., 1992. *Role of DNA in carcinogenesis*. W: *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. (red.) VAINIO H., MAGEE P. N., MCGREGOR D. B., McMICHAEL A. J., Int. Agency Res. Cancer, Lyon, 307-320.
- SZYFTER K., MULLENDERS L. H. M., 1993. *Genome heterogeneity in mutagen-induced DNA repair*. Current Topics in Biophys., 16, 53-61.
- THOMPSON L. H., 1991. *Properties and applications of human DNA repair genes*. Mutat. Res., 247, 191, 213-219.
- VAHAKANGAS K., ATRUP H., HARRIS C. C., 1984. *Interindividual variation in carcinogen metabolism, DNA damage and DNA repair*. Int. Agency Res. Cancer, 59, 85-98.
- VAHAKANGAS K., TRIVERS G. E., PLUMMER S., HAVES R. B., KROKAN H., ROWE M., SWARTZ R. P., YEAGER H. J. R., HARRIS C. C., 1991. *O⁶-metGuo DNA methyltransferase and uracil DNA glycosylase in human broncho-alveolar and peripheral blood mononuclear cells from tobacco smokers and non-smokers*. Carcinogenesis, 12, 1389-1394.
- WATERS R., 1984. *DNA repair tests in cultured mammalian cells*. W: *Mutagenicity testing. A practical approach*. (red.) VENITT S. i PARRY J. M., IRL Press, Oxford-Washington, 99-117.

MARIA SĄSIADK¹, JÓZEF JAGIELSKI²

¹Katedra i Zakład Patofizjologii
Śniegockiego 33, 52-414 Wrocław

²Akademia Medyczna we Wrocławiu
Marcinkowskiego 1, 50-368 Wrocław

BIOLOGICZNE SKUTKI DZIAŁANIA CZYNNIKÓW MUTAGENNYCH

Postęp wiedzy, który zrewolucjonizował świat ma swoje pozytywne i negatywne strony. Wprowadzenie do codziennego życia niezliczonej wprost ilości związków chemicznych sprawiło, że znajdują się one obecnie w powietrzu, wodzie, żywności, kosmetykach i używkach. Wszyscy jesteśmy narażeni na ich szkodliwe działanie. Działanie, którego bardzo często dokładnie nie znamy, a którego nie można uniknąć. Wiemy jednak, że działanie tych związków może prowadzić do bardzo poważnych konsekwencji dla zdrowia i życia ludzi narażonych na ich działanie, takich jak: poronienia, urodzenie dziecka z wadami wrodzonymi lub też rozwój choroby nowotworowej.

Pierwotną zmianą, leżącą u podłoża tych nieprawidłowości może być uszkodzenie informacji genetycznej (CHUNG i współaut. 1987, SPITZ i współaut. 1993).

Wiele czynników, działając na organizmy żywe może spowodować zmiany informacji genetycznej — mutacje. Pod pojęciem mutacji rozumiemy zmianę powstającą nagle, wskutek zmiany genu (mutacja genowa albo punktowa), zmiany struktury chromosomu (mutacja chromosomowa strukturalna), czy też zmiany liczby chromosomów (mutacja liczby chromosomów). Mutacje mogą pojawiać się spontanicznie, przypadkowo, na przykład, w wyniku błędu zachodzącego podczas syntezy DNA, lub też być wywołane poprzez czynnik uszkadzający materiał genetyczny (którym jest kwas dezoksyrybonukleinowy — DNA). Mutagenami nazywamy czynniki indukujące powstawanie mutacji znacznie ponad poziom uszkodzeń spontanicznych. Istnieją mutageny, które zwiększają poziom mutacji ponad 1000-krotnie.

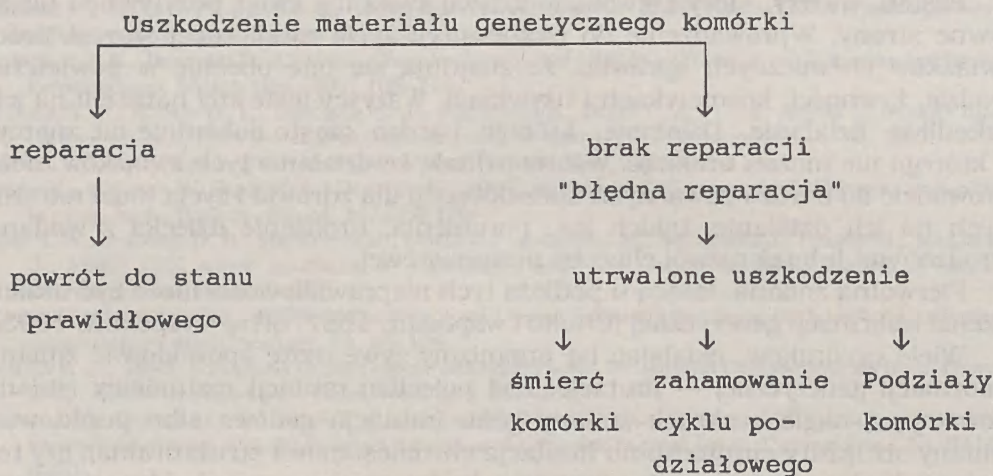
Wzrastające znaczenie badań nad wpływem czynników biologicznych (np. wirusy różyczki), chemicznych (np. iperyt) i fizycznych (np. promieniowanie X) na organizm człowieka jest związane z postępem wiedzy o skutkach ich działania (LASSOTA i współaut. 1989).

Większość mutacji zachodzących w organizmie zostaje usunięta za pomocą systemów reparacyjnych komórek. Jeśli mutacja nie ulegnie naprawie, lub podczas procesów reparacji uszkodzenie DNA nie zostanie usunięte, zmiana genetyczna może zostać utrwalona. W ten sposób może dojść do rozwoju linii

komórek wywodzących się z komórki pierwotnie uszkodzonej, co będzie prowadziło do ujawnienia biologicznych skutków zmiany informacji genetycznej.

Konsekwencje biologiczne mutacji możemy analizować w odniesieniu do pojedynczej komórki, lub w odniesieniu do całego organizmu.

Mutacja może doprowadzić do zaburzenia podstawowych funkcji życiowych komórki i być przyczyną jej śmierci. Jeśli mutacja nie doprowadzi do śmierci komórki, ale spowoduje tak poważne zaburzenia funkcji życiowych, że zahamuje jej podział, powstanie tak zwana „zmiana drzemiąca”, czy też „komórka drzemiąca”. Po zadziałaniu kolejnych czynników mutagennych, czyli promotorów pobudzających podziały komórkowe, może dojść do „obudzenia komórki”, która ponownie wejdzie w cykl podziałowy. Wskutek podziałów zmutowanej komórki dochodzi do utworzenia linii komórek potomnych, obarczonych tą samą zmianą genetyczną, co komórka macierzysta, o nieprawidłowych funkcjach biologicznych. Niekiedy mutacja będzie prowadziła bezpośrednio do niekontrolowanych podziałów komórki. Taka zmiana informacji genetycznej może stanowić ważne ogniwo w kaskadzie zmian genetycznych, odpowiedzialnych za proces transformacji nowotworowej komórki (ryc. 1) (SORSA i współaut. 1987).



Ryc. 1. Skutki działania czynników mutagennych na komórki organizmów żywych (SORSA 1985).
Uszkodzenie materiału genetycznego komórki.

Jeśli skutki działania czynników mutagennych będziemy analizować w odniesieniu do całego organizmu, to pojawi się problem klinicznych konsekwencji mutacji.

Skutki kliniczne działania czynników mutagennych są zróżnicowane. Uszkodzeniu mogą ulec komórki rozrodcze lub też pozostałe komórki organizmu, czyli komórki somatyczne.

Gdy uszkodzeniu ulegną komórki rozrodcze, to skutek biologiczny może być dwojaki: uszkodzenie będzie tak znaczne, że obniży zdolności życiowe komórki — przy uszkodzeniu odpowiednio dużej liczby komórek rozrodczych może dojść do obniżenia płodności osoby narażonej na działanie czynnika mutagennego. Jeżeli natomiast uszkodzenie nie zmniejszy potencjału życiowego komórki —

może ona wziąć udział w procesie zapłodnienia. Może to prowadzić do poronienia lub też urodzenia dziecka z wadą genetyczną, występującą we wszystkich komórkach, w tym również w komórkach rozrodczych dziecka. W ten sposób nowa mutacja może stać się zmianą dziedziczną, przekazywaną z pokolenia na pokolenie.

Jeśli natomiast mutacji ulegnie komórka somatyczna to zmiana będzie powtarzała się jedynie w linii komórek wywodzących się z nieprawidłowej komórki i nie będzie zmianą dziedziczną.

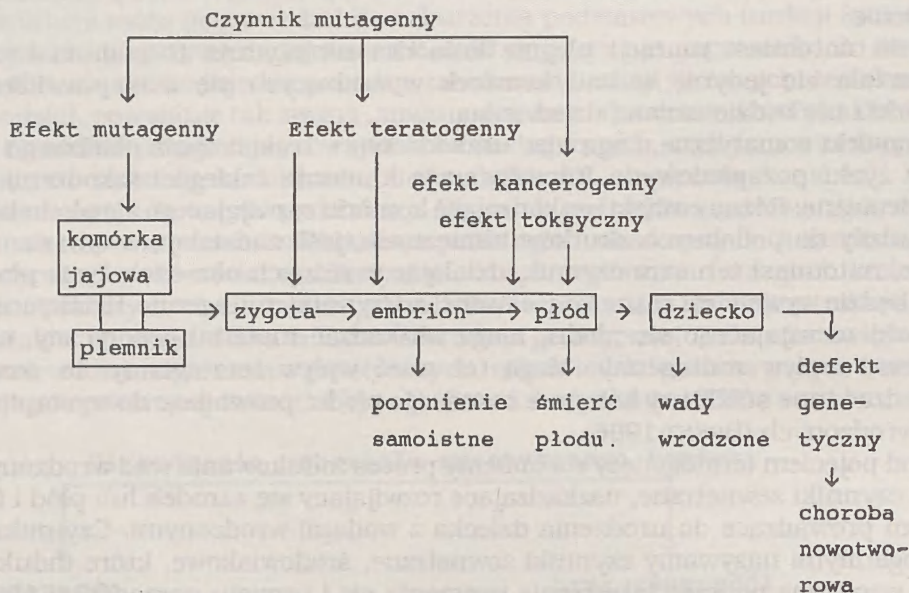
Komórki somatyczne mogą ulec uszkodzeniu w trakcie życia płodowego lub też w życiu pozapłodowym. Konsekwencje kliniczne takiego uszkodzenia są zróżnicowane. Różne związki uszkadzające komórki rozwijającego się płodu będą prowadziły do podobnych skutków klinicznych, jeśli zadziałają w tym samym czasie, natomiast ten sam czynnik, działając w różnych okresach życia płodowego będzie wywoływał różne konsekwencje. Czynniki mutagenne, działające na komórki rozwijającego się płodu, mogą uszkadzać materiał genetyczny, czyli wywierać wpływ mutageny. Mogą też mieć wpływ teratogeny, to znaczy uszkadzać inne struktury komórek rosnącego płodu, prowadząc do wystąpienia wad wrodzonych (BRENT 1986).

Pod pojęciem teratogenezy rozumiemy proces indukowania wad wrodzonych przez czynniki zewnętrzne, uszkadzające rozwijający się zarodek lub płód i tym samym prowadzące do urodzenia dziecka z wadami wrodzonymi. Czynnikami teratogennymi nazywamy czynniki zewnętrzne, środowiskowe, które indukują wady wrodzone poprzez zaburzenie tworzenia się i rozwoju narządów u płodu. Do takich zmian prowadzą zaburzenia podziałów i funkcji komórek w trakcie życia płodowego, bądź też uszkodzenie (pierwotnie prawidłowo ukształtowanych) tkanek zarodka. To, czy czynniki środowiskowe, uszkadzając komórki rozwijającego się organizmu, wywołują efekt mutageny czy też teratogeny, będzie zależało od wieku ciążowego — czyli od stopnia rozwoju płodu (ryc. 2) (SORSA i współaut. 1987). Jak to już zostało wspomniane powyżej, efekt kliniczny takiego uszkodzenia zależy od etapu rozwoju płodu, na jakim zadziała czynnik uszkadzający (DWORKIN 1993).

Pierwsze 10 do 14 dni po okresie zapłodnienia jest to tak zwany okres preinplantacyjny. W tym czasie zapłodniona komórka jajowa korzysta z własnych zapasów odżywczych i jest stosunkowo mało wrażliwa na działanie czynników zewnętrznych. Jeśli jednak ulegnie uszkodzeniu, dochodzi zwykle do jej obumarcia.

Mniej więcej od 14 do 56 dnia po zapłodnieniu trwa proces organogenezy. Po implantacji jaja płodowego poszczególne grupy komórek ulegają różnicowaniu. Tworzą się zawiązki narządów, a następnie dochodzi do ich rozwoju. W tym właśnie okresie rozwijający się płód jest najbardziej wrażliwy na działanie teratogenne. W zależności od momentu zadziałania czynnika uszkadzającego może dojść do uszkodzenia różnych narządów. Tak więc, ponieważ rozwój układu nerwowego zachodzi pomiędzy 15 a 28 dniem ciąży, każdy czynnik uszkadzający rozwijający się płód w tym czasie spowoduje przede wszystkim wady układu nerwowego. Dla układu krążenia natomiast, najbardziej krytyczny okres przypada na czas pomiędzy 20 a 40, dla oczu pomiędzy 24 a 40, dla kończyn pomiędzy 24 a 46 dniem życia płodowego.

Po ukończeniu 8 tygodnia ciąży rozpoczyna się okres płodowy. W tym czasie narządy rozwijającego się dziecka są już wykształcone i do ukończenia ciąży zachodzi dalszy ich rozwój.



Ryc. 2. Skutki działania związków mutagenicznych na komórki rozrodcze oraz na komórki somatyczne na poszczególnych etapach życia płodowego (SORSA 1985).

W zależności od fazy rozwojowej, w której nastąpiło uszkodzenie mówimy o:

- genopatii, jeśli czynnik mutageniczny zadziałał przed zapłodnieniem na komórki rozrodcze prowadząc do powstania mutacji;
- blastopatii, jeśli doszło do uszkodzenia zapłodnionej komórki jajowej w okresie do 14 dnia po zapłodnieniu, co zwykle prowadzi do utraty ciąży;
- embriopatii — skutek wad wrodzonych, które powstały na skutek zadziałania czynnika uszkadzającego w okresie między 14 a 60 dniem od zapłodnienia;
- fetopatii — skutek zmian wywołanych zadziałaniem czynników uszkadzających po 60 dniu od zapłodnienia (TREJBALOVA i współaut. 1986).

Jak więc wynika z powyższych rozważań procesy teratogenezy i mutagenezy są indukowane przez te same czynniki, a efekt biologiczny (mutageniczny czy też teratogeniczny) zależy od momentu ich zadziałania na rozwijający się płód. Te dwa procesy wykazują szereg podobieństw i różnic (BRENT 1986). Najważniejsze z nich zostały przedstawione w tabeli 1.

Działanie związków mutagenicznych na komórki somatyczne w życiu płodowym po okresie organogenezy lub też w życiu pozapłodowym, może prowadzić do ich transformacji nowotworowej komórek (procesu kancerogenezy).

Proces karcynogenezy jest genetycznie uwarunkowanym, wieloczynnikowym i wielostopniowym procesem, w przebiegu którego wyróżniamy główne etapy:

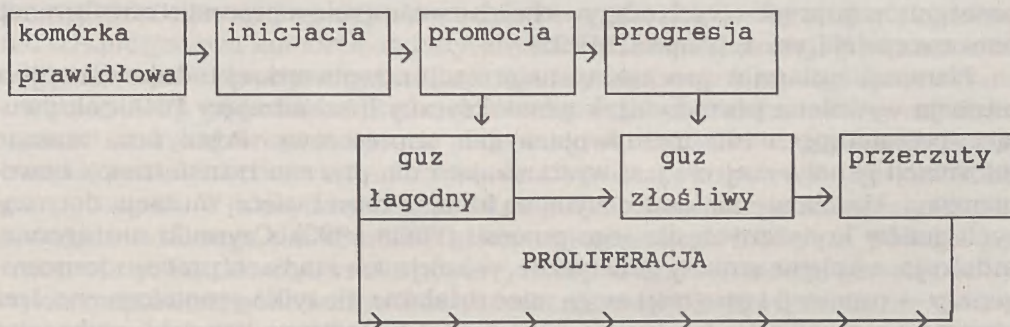
inicjacja (pierwsza zmiana, zwykle genetyczna, zapoczątkowująca proces transformacji nowotworowej), promocja (etap proliferacji pierwotnie uszkodzonej komórki) i progresja (nabycie przez linię komórek cech biologicznych charakterystycznych dla nowotworów) (HARRIS 1991, PATHAK 1989, PITOT 1993).

Tabela 1

Najważniejsze podobieństwa i różnice między procesami mutagenazy i teratogenezy (według BRENTA 1986)

Mutagenaza	Uszkodzenie pojedynczej komórki	Uszkodzenie DNA	Mutacja — choroba nowotworowa	Nie ma dawki bezpiecznej	Częstość występowania patologii wzrasta wraz ze wzrostem dawki, ale nie zmienia się przebieg kliniczny indukowanej choroby
Teratogeneza	Uszkodzenie wielokomórkowe	Uszkodzenie DNA i innych makromolekuł w komórkach	Wady wrodzone, opóźnienie rozwoju psychofizycznego, śmierć	Poniżej wartości progowej — dawka bezpieczna	Wraz ze wzrostem dawki wzrasta częstość i ostrość przebiegu klinicznego

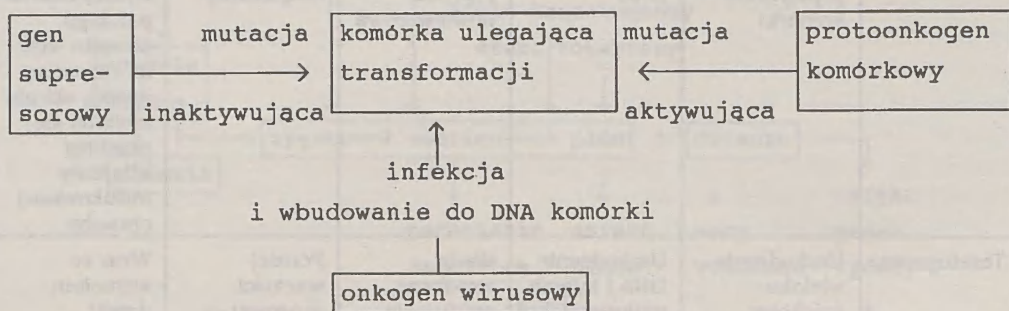
Niektórzy autorzy wyodrębniają proliferację komórek, jako oddzielne stadium. Wydaje się jednak, że proliferacja, która jest jedną z podstawowych cech biologicznych komórek nowotworowych i zachodzi na wszystkich etapach procesu transformacji, powinna być traktowana jako kluczowa cecha biologiczna, niezbędna dla zmiany ewolucji (ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat wielostopniowego procesu transformacji nowotworowej.

W etiologii genetycznej nowotworów, jak się obecnie uważa, podstawową rolę odgrywają dwie grupy genów: onkogeny i geny supresorowe. Onkogeny, czyli tak zwane geny nowotworowe są obecne we wszystkich komórkach organizmu

w formie nieaktywnej, jako protoonkogeny. Są to bardzo interesujące sekwencje DNA, które nie ulegały zmianom ewolucyjnym. Takie same sekwencje znaleziono w wirusach, jak i w komórkach organizmów wyższych, w tym u człowieka. Geny te są aktywne u człowieka w okresie embriogenezy, a następnie ulegają inaktywacji. Do dzisiaj nie zostały poznane mechanizmy zapoczątkowujące inaktywację protoonkogenów po okresie embriogenezy, ani mechanizmy biologiczne tej inaktywacji. Jeśli dojdzie do mutacji, aktywującej protoonkogeny w komórkach po zakończeniu embriogenezy, to mutacja taka może być zmianą pierwotną lub jedną z wielu mutacji biorących udział w transformacji nowotworowej (ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat zmiany aktywności protoonkogenów i genów supresorowych prowadzących do transformacji nowotworowej.

Geny supresorowe natomiast, zwane potocznie genami „anty-nowotworowymi” spełniają rolę „policjantów wewnątrzkomórkowych”, kontrolując cykl komórkowy. Dzięki działaniu tej grupy genów dochodzi do zwolnienia, lub nawet zahamowania cyklu podziałowego komórek obarczonych mutacją, co pozwala na usunięcie zmiany przez systemy naprawcze komórek. Jeśli uszkodzenie materiału genetycznego jest zbyt duże i nie może zostać usunięte — geny supresorowe odgrywają ważną rolę w apoptozie — kontrolowanej śmierci komórki, zwanej czasem samobójczą śmiercią komórki” (HORST 1993). Utrata aktywności genów supresorowych odgrywa bardzo ważną rolę w procesie transformacji nowotworowej (ryc. 4) (YARNOLD 1992).

Pierwszą zmianą w procesie transformacji nowotworowej indukowanej jest mutacja wywołana przez związek genotoksyczny (uszkodzający DNA), aktywująca protoonkogen lub inaktywująca gen supresorowy. Pojedyncza zmiana informacji genetycznej nie jest wystarczająca dla procesu transformacji nowotworowej. Uważa się, że koniecznymi są kilka, a nawet więcej mutacji, dotyczących genów krytycznych dla tego procesu (YUNIS 1993). Czynniki mutagenne, indukujące kolejne zmiany genetyczne, w kolejnych stadiach procesu kancerogenezy — promocji i progresji mogą mieć działanie nie tylko genotoksyczne, lecz również epigenetyczne (zmieniają właściwości biologiczne komórki, wpływając na inne niż DNA makromolekuły komórek). Związki promotorowe prowadzą do proliferacji i tym samym do rozwoju linii komórek obarczonych mutacją — czyli do wzrostu guza, zwykle o charakterze łagodnym, który następnie, pod wpływem kolejnych czynników zmieniających informację genetyczną i właściwości biologiczne komórek, ulega progresji do zmiany o charakterze złośliwym. Na każdym etapie procesu transformacji nowotworowej odgrywają ponadto rolę związki

JERZY NOWAK

Zakład Genetyki Człowieka PAN,
Strzeszyńska 32, 60–479 Poznań,

POSTĘPY TERAPII GENOWEJ CHORÓB DZIEDZICZNYCH

Olbrzymi postęp, jaki dokonał się w ciągu ostatnich kilku lat w zakresie technologii transferu genu, można wytłumaczyć niezwykle atrakcyjnością nowego podejścia metodycznego w leczeniu chorób oraz dużymi możliwościami wykorzystania terapii genowej w przyszłości (KAY i WOO 1994). Wykorzystanie inżynierii genetycznej w leczeniu chorób genetycznych przez wiele lat rozważano w sferze naukowej fantazji (CULLITON 1992). Wraz z rozwojem metod badawczych pojawiły się realne przesłanki uzasadniające podjęcie pierwszych prób korekty zaburzeń genetycznych. Pierwszy eksperyment kliniczny z transferem genu deaminazy adenozynowej w celu leczenia ciężkiego, złożonego zespołu niedoboru odporności zakończył się powodzeniem. Aktualnie obserwujemy wręcz eksplozję badań terapii genowej i prób szybkiego zastosowania u ludzi uzyskiwanych wyników doświadczalnych w warunkach *in vitro* i na zwierzętach laboratoryjnych.

Potencjalne możliwości ingerencji w informację genetyczną człowieka w celach leczniczych obejmują terapię genową komórek somatycznych, terapię genową komórek rozrodczych, wzmocnienie genetyczne oraz genetyczną eugenikę (ANDERSON 1992). Z uwagi na możliwości techniczne, a przede wszystkim ze względów etycznych podejmowane eksperymentalne próby obejmują wyłącznie terapię genową komórek somatycznych. Od terapii genowej należy wyraźnie oddzielić czysto teoretyczny termin — genetyczną eugenikę, czyli poprawianie cech populacji człowieka, takich jak: inteligencja, charakter, osobowość dokonywane pod nadzorem instytucji państwowych. Początkowo wydawało się, że terapia genowa będzie ograniczona do chorób uwarunkowanych defektami genetycznymi. W klasycznym ujęciu terapia genowa polega na wprowadzeniu genu prawidłowego do komórki, która wykazuje jego brak lub posiada gen zmutowany. Bardzo szybko okazało się, że technologia transferu genu może być wykorzystana nie tylko w chorobach uwarunkowanych genetycznie, ale również w schorzeniach nowotworowych i infekcyjnych, jak na przykład w AIDS (GUTIERREZ i współaut. 1992, GILBOA i SMITH 1994). Perspektywicznie terapia genowa stwarza jakościowo nowe możliwości leczenia wielu chorób. Znakomita większość — około 70% zatwierdzonych i przygotowywanych protokołów prób klinicznych terapii genowej dotyczy chorób nowotworowych, znacznie mniej

chorób genetycznych. Aktualnie są stosowane różne formy terapii genowej. Najczęściej terapia genowa chorób genetycznych polega na wprowadzeniu genu prawidłowego przy pozostawieniu genu z defektem. Ponadto jest możliwa modyfikacja genu *in situ* zwana „chirurgią genową”, czyli wycinanie zmutowanego genu lub sekwencji i wprowadzanie prawidłowego odcinka DNA.

Teoretycznie większość chorób wywołana brakiem lub defektem jednego genu mogłaby być leczona poprzez wprowadzenie i ekspresję prawidłowego genu do odpowiednich komórek docelowych.

Podjęmowane próby kliniczne leczenia chorób dziedzicznych transferem genu są zachęcające, w wielu przypadkach uzyskiwano znaczącą poprawę, jednakże dotychczas nie udało się całkowicie wyleczyć choroby dziedzicznej (ANDERSON 1992, MULLIGAN 1993).

Celem niniejszego opracowania jest omówienie możliwości i perspektyw zastosowania inżynierii genetycznej komórek somatycznych w leczeniu chorób genetycznych.

LECZENIE CHORÓB GENETYCZNYCH

Większość genetycznie uwarunkowanych chorób człowieka jest dziedziczona w sposób recesywny. Szereg chorób jednogenowych charakteryzuje się ciężkimi objawami obejmującymi upośledzenie umysłowe, zaburzenia widzenia i słyszenia, zaburzenia metaboliczne i związane z nimi nieprawidłowości budowy ciała, wagi i wzrostu. Leczenie chorób uwarunkowanych genetycznie w większości przypadków polega na: ograniczeniach dietetycznych, uzupełnianiu brakujących czynników, na przykład witamin, kofaktorów, usuwaniu z organizmu substancji toksycznych powstałych w wyniku zaburzonej przemiany metabolicznej (NYHAN 1991). Oprócz leczenia dietetycznego w bardzo wielu zaburzeniach metabolicznych, uwarunkowanych genetycznie jest stosowana transplantacja całych narządów lub tkanek, głównie szpiku kostnego, znacznie rzadziej wątroby i nerek. Pomimo niewątpliwie pozytywnych wyników leczenia niektórych chorób metabolicznych, uwarunkowanych genetycznie, w znakomitej większości przypadków pełne wyleczenie jest niemożliwe, a uzyskiwane efekty lecznicze są krótkotrwałe. Z wyjątkiem przeszczepu szpiku, dzięki któremu można w zasadzie wyleczyć niektóre choroby genetyczne, pod warunkiem znalezienia tkankowo-zgodnego dawcy, bardzo często osiąga się tylko częściowo korektę występujących objawów chorobowych. Niektóre choroby uwarunkowane genetycznie mogą być leczone poprzez odpowiednią dietę, która jest uzupełniana lub z której są usuwane określone składniki pożywienia (SWEETMAN 1991). Na marginesie można dodać, że w przypadku wszystkich witamin mamy analogiczne uzupełnianie diety w substancje nie produkowane przez organizm z uwagi na brak odpowiednich genów. Uzupełnienie — suplementację kofaktorów — witamin można uznać za rodzaj skutecznego leczenia braku produkcji witamin przez organizm człowieka. Innym sposobem leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie jest usuwanie z organizmu gromadzących się, szkodliwych dla organizmu substancji (SCHNEIDER 1991). Przykładem może być choroba Wilsona, w której dochodzi do odkładania się w wątrobie i centralnym układzie nerwowym złogów związków

miedzi powodujących poważne objawy chorobowe, którym można zapobiec poprzez stosowanie środków wiążących i usuwających miedź z organizmu. W ciężkiej chorobie krwi — w talasemii, w której występuje defekt genu beta globiny, dochodzi do akumulacji dużych ilości związków żelaza powodujących uszkodzenie serca i wątroby, a u dzieci dodatkowo zaburzenia dojrzewania i wzrostu. Usuwanie z organizmu substancji sprzyja poprawie klinicznej chorób. Dalszą możliwością leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie jest podawanie brakujących enzymów (HERSHFIELD 1991). Przykładem jest ciężki złożony niedobór odporności (severe combined immunodeficiency — SCID), w którym brak deaminazy adeniny prowadzi do bardzo ciężkiego zaburzenia odporności, z czym wiąże się duża skłonność do ciężkich infekcji, często kończących się śmiertelnie już w pierwszych latach życia. Podawanie deaminazy adenozyiny łącznie z glikolem polietylenowym wyraźnie poprawia stan zdrowia chorego, jednakże terapia ta jest niezwykle kosztowna. Inną możliwością leczenia chorób genetycznych są przeszczepy komórek lub tkanek (PARKMAN 1991). Wspomniany wyżej zespół SCID może być skutecznie wyleczony pod warunkiem przeszczepu szpiku kostnego całkowicie zgodnego antygenowo z chorym dzieckiem. Pomimo istnienia tylu możliwości terapii chorób uwarunkowanych genetycznie, koncepcja wprowadzenia funkcjonalnego genu do komórek lub tkanek chorego i całkowitego wyleczenia choroby genetycznej, jest niezwykle atrakcyjna zarówno dla badaczy, klinicystów i oczywiście samego pacjenta.

W wielu przypadkach chorób genetycznie uwarunkowanych nie jest wymagana ścisła regulacja poziomu brakującego enzymu, jak również utrzymywanie jego stężenia na poziomie identycznym do obserwowanego u osób zdrowych. W licznych chorobach metabolicznych objawy kliniczne nie występują w przypadku bardzo znacznego obniżenia stężenia brakującego enzymu, na przykład w hemofilii stężenie czynnika krzepnięcia IX w granicach 10%–20% wartości stwierdzanych u zdrowych osobników nie wywołuje żadnych objawów klinicznych. Dopiero dalszy spadek poniżej 1% wiąże się z podwyższonym ryzykiem wystąpienia spontanicznych krwiaków dostawowych i zaburzeniami krzepnięcia niezwykle groźnymi w przypadku nawet drobnych urazów (skaleczenie, wyrwanie zęba). Leczenie transferem genu chorób metabolicznych na obecnym etapie wydaje się stosunkowo trudne. W większości przypadków do uzyskania efektu terapeutycznego jest konieczne wprowadzenie genu do komórki z defektem, która nie zawsze jest łatwo dostępna (np. komórki wątrobowe). Można przypuszczać, że w niektórych chorobach, jak na przykład w hemofilii ektopowa produkcja czynników krzepnięcia skutecznie usunie wszelkie objawy kliniczne. Natomiast w przypadku fenyloketonurii trudno sobie wyobrazić, żeby hydroksylaza fenyloalaniny produkowana w innym niż fizjologicznym miejscu, to jest w wątrobie, mogłaby wpłynąć na zmianę objawów chorobowych.

UWARUNKOWANIA TERAPII GENOWEJ CHORÓB DZIEDZICZNYCH

Pierwsza próba terapii genowej talasemii, podjęta w roku 1980 przez Martina Clina zakończyła się niepowodzeniem, co było bezpośrednim powodem wstrzymania prób klinicznych na prawie 10 lat (LARRICK i BURCK 1991). W tym czasie

rozwój technologiczny sprawił, że transfer genów został znacznie dopracowany pod względem technicznym. Paradoksem jest, że obecnie leczeniem z wyboru talasemii jest przeszczep szpiku, a nie transfer genu. Nie wszystkie choroby genetyczne mogą być na równi poddawane terapii genowej. Przed podjęciem prób klinicznych jest konieczne spełnienie szeregu warunków oraz przeprowadzenie niezbędnych doświadczeń *in vitro* i *in vivo* na zwierzętach laboratoryjnych.

Wybór choroby do zastosowania eksperymentalnej terapii genowej jest uwarunkowany wieloma czynnikami. Na obecnym etapie rozwoju terapii genowej chorób uwarunkowanych genetycznie w zasadzie obiektem zainteresowań są wyłącznie schorzenia jednogenowe dziedziczone w sposób recesywny. Dalszym warunkiem jest brak alternatywnego leczenia, co może wiązać się z wysoką zapadalnością i umieralnością osób dotkniętych chorobą. Oczywiście sprawą jest zlokalizowanie defektu genetycznego powodującego daną chorobę — komórka lub tkanka docelowa musi być jednoznacznie zdefiniowana. Jest konieczna również możliwość transferu genu do komórki z defektem. Transfer leczniczego genu powinien być wykonany w warunkach *in vitro* i na zwierzętach doświadczalnych. Bardzo ważnym warunkiem jest uzyskanie stabilnej ekspresji brakującego lub zmutowanego genu. W warunkach *in vitro* należy przeprowadzić doświadczenia z ludzkimi komórkami docelowymi, które po transfekcji powinny wykazywać ekspresję wprowadzonego genu. W badaniach na zwierzętach jest konieczne udowodnienie efektu terapeutycznego poprzez zmianę fenotypu patologicznego na prawidłowy (np. pojawienie się aktywności enzymatycznej). Komórka, do której ma zostać wprowadzony terapeutyczny gen, powinna posiadać zdolność do samoodnawiania. Tylko w takim przypadku jednorazowy transfer genu zapewni długotrwały efekt leczniczy (KOHN i współaut. 1989).

Podobnie jak w przypadku testowania nowych związków o działaniu terapeutycznym również w przypadku transferu genu należy ocenić występowanie ewentualnych objawów ubocznych, jak na przykład zaburzeń metabolizmu lub działania mutagennego białka produkowanego przez wprowadzony gen. Transfer genu i jego ekspresja prowadzi do pojawienia się białka, które może posiadać właściwości immunogenne. Z sytuacją taką należy się liczyć w przypadku transferu genu, który uprzednio w organizmie nie występował.

Projekt terapii genowej u człowieka każdorazowo musi ocenić ryzyko wystąpienia objawów ubocznych w stosunku do osiąganego efektu leczniczego, który należy porównać z wynikami możliwymi do osiągnięcia leczeniem alternatywnym — konwencjonalnym. W ocenie potencjalnych objawów ubocznych należy zwrócić uwagę na możliwości przeniesienia użytego wektora w układzie wertykalnym, czyli na dalsze pokolenia i horyzontalnym, czyli nie zamierzoną infekcję komórek prawidłowych (MILLER 1992).

Oprócz uzyskania zgody pacjenta lub jego prawnych opiekunów powinno się przeprowadzić analizę wpływu zastosowanej terapii genowej nie tylko na chorego, ale również na jego rodzinę. Z uwagi na możliwe niejasności, uprzedzenia oraz emocje związane z transferem genu powinno dążyć się do jak najszerzej pojętej edukacji społeczeństwa poprzez rzetelną informację w środkach masowego przekazu oraz dyskusje z udziałem przedstawicieli różnych specjalności. Istniejące już w wielu krajach ustawodawstwo wymaga uzyskania formalnej zgody odpowiednich instytucji na podejmowanie wszelkich prób klinicznych

związanych z transferem genu do komórek somatycznych człowieka (DANIELSON 1988).

TRANSFER GENU DO KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Niezbędnym warunkiem podjęcia prób terapii genowej u człowieka jest uzyskanie odpowiednich nośników — wektorów, zdolnych do transdukcji określonego genu do komórek docelowych. Wprowadzenie nowego genu do komórki docelowej i uzyskanie jego ekspresji stanowi podstawowy element terapii genowej. Stąd szybki rozwój metod transferu genu, przydatnych w terapii. Wspólną cechą wszystkich metod jest uzyskanie efektywnego dostarczenia określonego genu do komórki. Gen można wprowadzić do komórki metodami fizykochemicznymi i biologicznymi. W tabeli 1 zestawiono metody transferu genu do komórek.

Tabela 1
Zestawienie metod wprowadzania genów do komórek

I. Metody fizykochemiczne:

1. Transfekcja precypitatu DNA z fosforanem wapnia.
2. Fuzja DNA z liposomami.
3. Mikroinjekcja dojądrowa.
4. Elektroporacja.

II. Metody biologiczne:

1. Wektory wirusów DNA — adenowirusów.
2. Wektory wirusów RNA — retrowirusy.

Jedną z najważniejszych wspólnych cech wszystkich metod transferu genu do komórki jest wydajność mierzona efektywną integracją wprowadzonego DNA z genomem gospodarza. Użycie wektorów wirusowych DNA lub RNA jest zdecydowanie najbardziej wydajne. Przy wprowadzaniu DNA za pomocą wektorów wirusowych od kilkudziesięciu do 100% komórek nabywa nowy gen,

natomiast przy zastosowaniu metod fizycznych DNA jest efektywnie wprowadzany do jednej komórki na 1000, 10 000, czy nawet 1 mln. Z reguły przy stosowaniu metod fizykochemicznych wydajność jest bardzo różna. W zasadzie wszystkie fizykochemiczne metody transfekcji są stosunkowo mało skomplikowane. Geny są wprowadzane i integrują się z genomem komórek w sposób całkowicie losowy. Bardzo prostą metodą transferu DNA do komórki jest elektroporacja. Technika ta umożliwia wprowadzenie fragmentów DNA do wielkości 150 kb. Istotną wadą jest uszkodzanie błony komórkowej, prowadzące często do śmierci komórki.

Biologiczne wektory używane do transferu genu są konstruowane z naturalnie występujących wirusów. Idealny wektor wirusowy powinien transfekować praktycznie wszystkie komórki docelowe. Wektor taki powinien charakteryzować się wysokim stopniem integracji z DNA genomowym z następową ekspresją wprowadzonego genu. Wysoce pożądana byłaby możliwość fizjologicznej regulacji ekspresji wprowadzonego genu. Należy zauważyć, że wydajność transferu genu, czyli integracja z genomem komórki docelowej, nie zawsze idzie w parze z ekspresją wprowadzonego genu (LANCUVILLE i współaut. 1988).

WPROWADZANIE GENU *EX VIVO* I *IN VIVO*

W terapii genowej wprowadzenie do komórki genu prawidłowego w miejsce brakującego lub zmutowanego można dokonać w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. W układzie *in vitro* do komórek docelowych pobranych od chorego terapeutyczny gen jest wprowadzany za pomocą wektorów. Komórki genetycznie zmodyfikowane *in vitro* są następnie wprowadzane do organizmu chorego. Znacznie trudniejszym zadaniem jest wprowadzenie genu w warunkach *in vivo*.

Wektory rekombinacyjne używane w celu wprowadzania terapeutycznego genu do różnych komórek mogą być zastosowane w dwojaki sposób. Pierwszy — transfer genu *ex vivo* obejmuje pobranie od chorego komórek docelowych, wprowadzenie *in vitro* (czyli *ex vivo*) terapeutycznego genu i wprowadzenie tak zmodyfikowanych komórek z powrotem do organizmu chorego. Drugi — transfer genu *in vivo* polega na wprowadzeniu terapeutycznego genu bezpośrednio do komórek (tkanki) chorego, bez pobierania komórek docelowych. W przypadku transferu *in vivo* jest konieczne zastosowanie wektora, który z dużą wydajnością i wysoką swoistością przenosi gen terapeutyczny do komórek docelowych. Dotychczas transfer genu typu *in vivo* zastosowano jedynie przy wprowadzaniu genu *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductor) do komórek śród błonkowych jamy nosowej i pęcherzyków płucnych (ROSENFELD i współaut. 1992, HYDE i współaut. 1993).

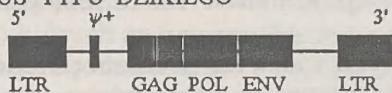
WEKTORY RETROWIRUSOWE

W pewnym uproszczeniu można powiedzieć, że są to retrowirusy, z których usunięto wszystkie geny wirusowe z wyjątkiem sekwencji promotorowych. Z tego względu białka wirusowe nie są syntetyzowane przez komórki zakażone wektorami retrowirusowymi. W miejsce sekwencji wirusowych jest wstawiony gen przeznaczony do transferu (rys. 1). Z reguły obok genu terapeutycznego do wektora jest wklonowany gen umożliwiający selekcję transfekowanych komórek w medium hodowlanym. Czynnikiem selekcyjnym często jest gen *neo* warunkujący oporność zakażonych komórek na neomycynę. W ten sposób tylko komórki z wbudowanym wektorem, wykazujące oporność na neomycynę, rozwijają się w medium selekcyjnym.

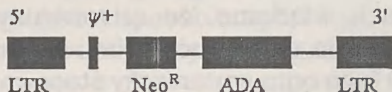
Cząsteczka retrowirusa jest złożona z podwójnej nici RNA, kodującego białko wirusowe (GAG), odwrotną transkryptazę i integrazę (POL) oraz białka otoczki wirusa (ENV). W celu utworzenia wektora są usuwane geny *gag*, *pol* i *env*, a na ich miejsce są wprowadzane nowe sekwencje. Strukturalne geny wirusa *gag*, *pol* i *env* oraz sekwencje promotorowe LTR (long terminal repeats) są niezbędne dla replikacji i transferu cząsteczek wirusowych z komórki do komórki. Sztucznie utworzony wektor retrowirusowy nie posiada zdolności do replikacji z uwagi na brak odpowiednich sekwencji. W celu wyprodukowania kompletnej cząsteczki wirusowej jest konieczne użycie tak zwanych komórek pakujących, produkujących puste otoczki wirusowe. Komórki pakujące zawierają wszystkie geny

A

WIRUS TYPU DZIKIEGO

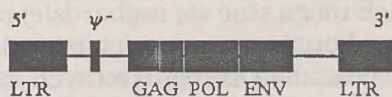


WEKTOR Z GENEM TERAPEUTYCZNYM np: ADA

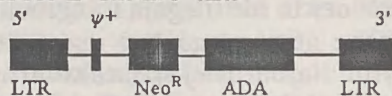


B

WEKTOR W KOMÓRKACH PAKUJĄCYCH



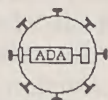
WEKTOR Z GENEM ADA



PRODUKCJA



Otoczek wirusowy

Cząsteczek wirusa
z genem ADA

Rys. 1. Schemat uzyskiwania wektorów retrowirusowych.

A. Do wirusa typu dzikiego w miejsce genów strukturalnych *gag*, *pol*, *env* jest wprowadzany gen terapeutyczny *ADA* wraz z genem oporności na neomycynę *Neo^R*. B. Komórki pakujące, ze względu na brak sekwencji Ψ , produkują puste otoczki wirusowe, do których jest „pakowany” wektor z genem *ADA*. Częsteczka wirusa z genem *ADA* jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej bez możliwości namnażania ze względu na brak strukturalnych genów wirusowych.

konieczne do syntezy białek wirusowych z wyjątkiem sekwencji Ψ i produkują otoczki wirusa bez RNA. Brak sekwencji Ψ uniemożliwia upakowanie RNA w otoczek białkowy. Po wprowadzeniu do komórek pakujących sekwencji DNA w wektorze retrowirusowym dochodzi do utworzenia cząsteczek wirionu, z wprowadzonymi sekwencjami DNA, posiadających zdolność do zakażenia komórek docelowych bez możliwości namnażania. Taka cząsteczka jest zdolna do jednokrotnego zakażenia komórki docelowej bez możliwości dalszej replikacji ze względu na brak genów wirusowych. Proces wprowadzania nowego genu przy użyciu wektora retrowirusowego nie posiadającego zdolności do replikacji określa się mianem transdukcji (HUBER i współaut. 1991), w przeciwieństwie do transfekcji-infekcji, w której dzielące się cząsteczki wirusa rozprzestrzeniają się do wielu komórek. Schemat uzyskiwania wektorów retrowirusowych przedsta-

wiono na rysunku 1. Największą zaletą wektorów retrowirusowych jest wysoka wydajność wprowadzania genów do komórek docelowych. Natomiast ich główną wadą jest niezdolność do transdukcji komórek nie dzielących się (KOHN i współaut. 1989).

Z użyciem wektorów retrowirusowych wiąże się problem potencjalnych objawów ubocznych, związanych z losową integracją retrowirusa w genom komórki gospodarza. Integracja genów retrowirusowych może wywołać zmiany o charakterze mutagennym, polegające, na przykład, na aktywacji komórkowych onkogenów. Z doświadczeń na zwierzętach wiadomo, że retrowirusy zdolne do replikacji mogą prowadzić do aktywowania onkogenów. Nie wiadomo jak duże jest prawdopodobieństwo wystąpienia tego typu zmian przy stosowaniu niezdolnych do replikacji wektorów retrowirusowych (FRIEDMANN 1989).

WEKTORY ADENOWIRUSOWE

Wektory bazujące na adenowirusach mogą stać się najbardziej popularnymi nośnikami w terapii genowej. Wektory konstruowane na bazie adenowirusów i tak zwane „adeno-associated-virus” posiadają szereg istotnych zalet. Istnieje możliwość umieszczenia w nich sekwencji DNA wielkości kilkudziesięciu kb, wykazują tropizm do różnych ludzkich komórek przy całkowitym braku patogenności. Dodatkową zaletą jest, że wektory te nie ulegają integracji z genomem gospodarza. Co więcej, raz wprowadzone geny mogą być usunięte z komórki poprzez infekcje wirusami pomocniczymi. Najbardziej spektakularnym przykładem zastosowania wektora adenowirusowego było uzyskanie ekspresji ludzkiego genu *CFTR* (cystis fibrosis transmembrane conductance regulator) po wprowadzeniu do górnych dróg oddechowych szczura jako przygotowanie do podjęcia prób leczenia mukowiscydozy. Ekspresja białka *CFTR* utrzymywała się przez kilka tygodni po wprowadzeniu wektora adenowirusowego (ROSENFELD i współaut. 1992).

KOMÓRKI DOCELOWE W TERAPII GENOWEJ

Rodzaj komórek, do których jest wprowadzany gen mający działanie lecznicze, jest uzależniony od rodzaju schorzenia. W terapii chorób genetycznych komórkami docelowymi będą te, które fenotypowo objawiają określone zaburzenia spowodowane istniejącym defektem genetycznym. W zależności od choroby genetycznej mogą to być komórki szpiku, wątroby, pęcherzyków płucnych, fibroblasty skóry i limfocyty krwi obwodowej. Komórkami docelowymi w chorobach genetycznych mogą być również inne, nie dotknięte defektem komórki lub tkanki. Jako przykład potencjalnego zastosowania transferu genu do komórek innych niż wykazujące zaburzenie genetyczne, może być uzyskanie produkcji, na przykład, insuliny lub czynników krzepnięcia krwi przez fibroblasty, które mogłyby „dawkować” brakujące czynniki. Jednakże w większości chorób genetycznie uwarunkowanych optymalna komórka docelowa powinna wywodzić się z tkanki dotkniętej zaburzeniem i posiadać zdolność do samopowielania, czyli

być w pewnym sensie nieśmiertelną, tak ażeby po jednokrotnym wprowadzeniu genu leczniczego zachował on swoją aktywność praktycznie przez całe życie (FERRAN i współaut. 1991). W przypadku terapii genowej nowotworów i AIDS komórki, do których są wprowadzane nowe geny, niekoniecznie muszą posiadać zdolność do samoodnawiania. Wręcz przeciwnie, optymalnym rozwiązaniem jest modyfikacja komórki nowotworowej w taki sposób, ażeby w miarę szybko prowadziła do uzyskania efektu leczniczego, po czym powinna sama ginać lub być niszczona. Oddzielną grupę komórek docelowych stanowią komórki mięśni, do których można w sposób bezpośredni, drogą iniekcji wprowadzać plazmidowy DNA sprzężony z terapeutycznym genem. Komórki mięśniowe, a w szczególności mioblasty, mogą być wykorzystywane do produkcji, na przykład hormonu brakującego w ustroju (WOLF i współaut. 1990).

TERAPIA GENOWA CIĘŻKIEGO ZŁOŻONEGO NIEDOBORU ODPORNOŚCI — SCID

Terapia genowa chorób genetycznych polega na wprowadzeniu do organizmu prawidłowego genu w miejsce brakującego lub uszkodzonego. Wprowadzony gen powinien ulegać ekspresji tak, ażeby jego produkt funkcjonował jak w organizmie zdrowym. Z wielu chorób genetycznych, ciężki złożony niedobór odporności SCID spełniał wszelkie warunki uzasadniające podjęcie pierwszych prób terapii genowej (FERRAN i współaut. 1991). SCID jest spowodowany defektem genu deaminazy adenozyry (ADA), w wyniku czego dochodzi do zaburzenia różnicowania limfocytów T. Defekt genetyczny występuje we wszystkich komórkach, jednakże brak ADA w czasie rozwoju grasicy powoduje selektywną toksyczność metabolitów adenozyry (jak np. trójfosforan deoksyadenozyry) dla niedojrzałych limfocytów T. SCID dziedziczy się jako cecha autosomalna recesywna, występuje z częstością 1 na 100 urodzeń. Przebieg kliniczny charakteryzuje się częstymi ciężkimi infekcjami występującymi od wczesnego dzieciństwa. Ze względu na brak odporności wszelkie infekcje mają bardzo ciężki przebieg. Nie leczony SCID prowadzi do śmierci dziecka w pierwszym lub drugim roku życia. W tabeli 2 przedstawiono krótką charakterystykę SCID. Stosowane dotychczas leczenie SCID polegało głównie na przeszczepie tkankowo-zgodnego szpiku kostnego. Ponadto było możliwe leczenie substytucyjne deaminazą adenozyry w połą-

Tabela 2
Charakterystyka ciężkiego złożonego niedoboru odporności — severe combined immunodeficiency syndrome — SCID

1. Brak enzymu deaminazy adenozyry.
2. Choroba autosomalna recesywna.
3. Częstość występowania 1:100 tys. urodzeń.
4. Ciężkie oportunistyczne zakażenia od wczesnego dzieciństwa.
5. Selektywna toksyczność metabolitów w stosunku do limfocytów T.
6. Blisko 100% śmiertelność w pierwszych latach życia.

czeniu z glikolem polietylenowym (KOHN i współaut. 1989). Uwarunkowania wyboru SCID do podjęcia klinicznych prób terapii genowej zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Przesłanki uzasadniające podjęcie klinicznych prób terapii genowej w ciężkim złożonym niedoborze odporności — SCID

1. Sklonowanie ludzkiego genu deaminazy adenozyiny — ADA.
2. Zlokalizowany defekt pojedynczego genu prowadzi do utraty aktywności enzymu ADA.
3. Wyleczenie tylko w przypadku przeszczepu szpiku całkowicie tkankowo-zgodnego.
4. Uzyskanie ekspresji genu ADA w komórkach transfekowanych *in vitro*.
5. *In vivo* transfekowane komórki rosną lepiej niż limfocyty z defektem.
6. Wykazanie terapeutycznego działania wysokich dawek enzymu ADA.
7. Szeroki zakres terapeutycznej aktywności enzymu ADA.
8. Brak objawów ubocznych przy podawaniu wysokich dawek ADA.

Pierwszego transferu genu ADA do limfocytów T czteroletniej dziewczynki, leczonej uprzednio podawaniem ADA w połączeniu z glikolem polietylenowym, dokonano 14 września 1990 roku (CULLINTON 1990). Do chwili obecnej wykonano kilka dalszych prób terapii genowej SCID. Wyniki pierwszej terapii są bardzo obiecujące — uzyskano normalizację zaburzonych parametrów odpowiedzi immunologicznej komórkowej i humoralnej, a przede wszystkim znaczną poprawę kliniczną. Leczone dzieci nie muszą już przestrzegać reżimu życia w warunkach sterylnych.

Z uwagi na stosunkowo krótki czas przeżycia limfocytów T uzyskane efekty lecznicze są krótkotrwałe i transfer genu ADA należy powtarzać co kilka tygodni lub miesięcy. Obecnie podjęto próby transferu genu ADA do komórek szpiku wzbogaconego w komórki pnia, czyli posiadających zdolność do samoodtwarzania. Jest wysoce prawdopodobne, że dzięki uzyskaniu efektywnej integracji i ekspresji genu ADA w komórkach pnia, choroba genetyczna — SCID będzie całkowicie wyleczalna po jednorazowym transferze genu (WEATHERALL 1991).

PERSPEKTYWY TERAPII GENOWEJ W CHOROBAH GENETYCZNYCH

Obiecujące wyniki terapii genowej ciężkiego złożonego niedoboru odpornościowego stwarzają realną szansę na zastosowanie analogicznego podejścia leczniczego również w innych chorobach uwarunkowanych genetycznie. Pierwsze próby u chorych z mukowiscydozą wypadły pozytywnie, co pozwala optymistycznie prognozować dalszy rozwój terapii genowej chorób dziedzicznych. W przeprowadzonych badaniach *in vitro* i na zwierzętach uzyskano ekspresję wielu genów, których defekt jest odpowiedzialny za szereg chorób genetycznych u ludzi. Należy przypuszczać, że w najbliższej przyszłości zostaną przeprowadzone pierwsze próby kliniczne w fenyloketonurii, mukowiscydozie, niedoborze alfa-1-antytrypsyny, hemofilii i innych (PENG i współaut. 1988, WILSON i CHOWDHURY 1990, DAI i współaut. 1992). W tabeli 4 zestawiono choroby uwarunkowane

genetycznie, w których w najbliższych latach będą najprawdopodobniej podjęte pierwsze próby kliniczne z terapią genową (STRAUSS 1994, YEI i współaut. 1994).

Tabela 4

Choroby uwarunkowane genetycznie, w których możliwe jest zastosowanie terapii genowej

Choroba	Komórka docelowa	Gen
Zespoły niedoboru odpornościowego	szpik kostny, limfocyty	fosforylaza purynowa deaminaza adenozyiny
Zespół Lesch-Nyhan'a	szpik kostny, fibroblasty skóry	fosforybozylotransferaza hypoksantynowoguaninowa
Fenyloketonuria	hepatocyty	hydroxylaza fenyloalaniny
Galaktozemia	hepatocyty	urydylotransferaza galaktozy, galaktokinaza
Choroba Gaucher'a	komórki szpiku	glukocerebrozydaza
Choroba Tay-Sachsa	hepatocyty	beta-galaktozydaza
Hemofilia A	fibroblasty skóry	czynnik krzepnięcia VII
Hemofilia B	fibroblasty skóry	czynnik krzepnięcia IV
Niedobór alfa-1-antytrypsyny	hepatocyty	alfa-1-antytrypsyna
Mukowiscydoza	komórki nabłonkowe	CFTR
Talasemia	komórki szpiku	beta-globina
Anemia sierpowata	komórki szpiku	beta-globina
Rodzinna hypercholesterolemia	hepatocyty	receptor LDL
Dystrofia mięśniowa Duchenne'a	komórki mięśniowe	dystrofia

OBJAWY UBOCZNE TERAPII GENOWEJ

Pomimo przedsięwzięcia szeregu środków ostrożności należy się liczyć z możliwością występowania objawów ubocznych terapii genowej. Z uwagi na całkowicie losową integrację wektora retrowirusowego przenoszącego terapeutyczny gen, istnieje możliwość, na przykład, wskutek rekombinacji wyłączenia prawidłowo funkcjonującego genu, włączenia genu nieaktywnego, a w szczególności aktywacji komórkowych onkogenów, mogącej prowadzić do transformacji nowotworowej. Tak więc w najgorszym przypadku istnieje nawet ryzyko rozwoju nowotworu. Innym potencjalnym objawem ubocznym terapii genowej może być indukcja odpowiedzi immunologicznej przeciwko białku produkowanemu przez nowo wprowadzony gen. Taka sytuacja może mieć miejsce szczególnie w chorobie genetycznej, która może być wyleczona przez produkcję brakującego w organizmie białka, które w sensie immunologicznym jest białkiem obcym. Oprócz możliwej immunogenności trudno przewidzieć następstwa znacznej, niefizjologicznej nadprodukcji białka, kodowanego przez wprowadzony gen (BOU i współaut. 1994).

Przy terapii wektorami retrowirusowymi nie można całkowicie wykluczyć produkcji wirusa typu dzikiego, co może się zdarzyć w niezamierzonym zanie-

czyszczeniu używanego wektora wirusem typu helper. Z kolei wektory adenowirusowe mogą prowadzić do bezpośredniego uszkodzenia komórek nabłonkowych. Potencjalne, ogólne objawy uboczne, jak na przykład gorączka, dreszcze, zmiana obrazu krwi, powiększenie wątroby, wysypka i inne mogą być związane z rodzajem, dawką, sposobem podania wektora, jak również z wielkością i modulacją ekspresji wprowadzonego genu (OSTROVE 1994).

ASPEKTY SOCJALNE I ETYCZNE TERAPII GENOWEJ

Przed 20-tu laty postęp w inżynierii genetycznej został tylko na bardzo krótko przyhamowany futurystycznymi przepowiedniami produkcji bezmózgowych robotów lub katastroficzną pandemią wirusem grypy przenoszącym śmiertelnośny gen rakowy. Obecnie już nikt nie kwestionuje potrzeby uzyskiwania metodami inżynierii genetycznej leków stosowanych na coraz szerszą skalę — insuliny, czynników krzepnięcia, hormonów wzrostu i szczepionki przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby. Większość kwestii etycznych dotyczy samej, całkowicie nowej technologii powodującej bezpośrednie zmiany w materiale genetycznym człowieka. Istnieje duża zbieżność pomiędzy leczeniem ciężkiego złożonego niedoboru odporności przeszczepem szpiku i terapią genową. W pierwszym przypadku wprowadzamy do organizmu obce komórki z prawidłowym genem, w drugim tylko prawidłowy gen. Terapia genowa komórek somatycznych nie wpływa na geny przekazywane potomstwu. Wysuwane są zastrzeżenia o coraz bardziej mechanistycznym traktowaniu człowieka bez zwracania uwagi na aspekty społeczne i moralne związane z życiem ludzkim. Z drugiej jednak strony lepsze poznanie genetycznych aspektów życia powinno przyczyniać się do większego poszanowania życia człowieka. Jednakże w przypadku osiągnięcia sukcesu terapii genowej w ciężkich schorzeniach, może zająć pokusa jej zastosowania nie do leczenia lecz dla „poprawiania” na przykład urody, siły mięśniowej, wzrostu, koloru oczu (MILLER 1994). Teoretycznie istnieje możliwość, że rodzice zamiast wymyślnej diety, uprawiania sportu, wykształcenia, będą chcieli dodatkowo zaaplikować swemu potomstwu terapię genową w celu posiadania „idealnego” dziecka. Rozważania nad tego typu problemami są bardzo spekulacyjne i powinny być zastępowane szeroką dyskusją na temat realnych możliwości i korzyści terapii genowej dla, jak sama nazwa wskazuje, leczenia ludzi chorych (LEDLEY 1987).

PRZYSZŁOŚĆ TERAPII GENOWEJ

Prawdopodobnie w najbliższych latach badania zostaną skoncentrowane nie na klasycznych chorobach genetycznych, a przede wszystkim na nowotworach i to zarówno w sensie leczenia, jak i zapobiegania przerzutom oraz niszczenia opornych na konwencjonalną terapię komórek rakowych, tak zwanych resztkowych.

Oprócz chorób jednogenowych, których terapia genowa będzie stanowiła leczenie przyczynowe, w chorobach wieloczynnikowych, na przykład w chorobie

Alzheimera, Parkinsona, schizofrenii będzie można zastosować genetyczne leczenie objawowe, usuwające bardzo przykre dolegliwości tych chorób.

Nie można wykluczyć, że w przyszłości terapia genowa będzie miała duże zastosowanie również w chorobach wewnętrznych, głównie w schorzeniach układu krążenia. Jako przykład można podać już rozpoczęte próby kliniczne leczenia wybranych postaci rodzinnej hypercholesterolemii poprzez transfer genów dla receptora LDL (low density lipoprotein). Wydaje się, że wraz z nowymi odkryciami dotyczącymi genetycznej predyspozycji występowania wielu chorób terapia genowa znajdzie zastosowanie również w zapobieganiu ich występowania (KARP i BRODER 1994).

Chirurgia urazowa bardzo odległa od terapii genowej może w przyszłości wykorzystywać transfer genów dla substancji biologicznie czynnych w celu szybszego gojenia się ran i „naturalnej” — bez udziału antybiotyków — ochrony przed zakażeniem (LARRICK i BURCH 1991).

Terapia genowa dopiero zaczyna się rozwijać. Dziś jeszcze nie możemy mówić o przełomie leczenia chorób dzięki inżynierii genetycznej. Nie można jeszcze stwarzać nadziei, szczególnie ciężko chorym na cudowne wyleczenie za pomocą nowej formy terapii. Można mieć natomiast pewność, że terapia genowa będzie stawała się coraz powszechniejszą i skuteczniejszą formą leczenia i zapobiegania wielu chorobom.

PROGRESS IN GENE THERAPY OF HEREDITARY DISEASES

Summary

This paper presents an overview of somatic human gene therapy, gene transfer methods and construction of appropriate vectors, present and potential target cells for gene transfer, choice of appropriate disease to be treated by gene therapy, promising candidates for somatic gene therapy, side effects, some ethical considerations and future perspectives of curing genetic diseases by somatic gene therapy.

Most of the social and ethical questions concerning gene therapy have been raised in the context of other novel medical interventions. For the first time in human history it is possible to alter the human genome directly. Somatic gene therapy does not pose ethical problems significantly different from those represented by other types of experimental therapy, such as organ transplantation, recombinant pharmaceuticals or modern surgical techniques. It can be said that the medical world is convinced of the necessity of future application of gene therapy, but information on potentials and problems of this new technology should be widely disseminated to the public.

We can hope that significant improvements in gene transfer techniques over the next few years will result in very precise human gene targeting and thus lead to effective treatment of many hereditary disorders.

LITERATURA

- ANDERSON W. F., 1992. *Human Gene Therapy*. Science, 256, 808-813.
ANDERSON W. F., 1992. *Uses and abuses of human gene transfer*, W: *Human gene therapy*. Mary Ann Liebert, Inc., Publishers. 1-2.
BOUT A., PERRICAUDET M., BASKIN G., IMLER J.-C., SCHOLTE B. J., PAVIRANI A., VALERIO D., 1994. *Lung gene therapy: In vivo adenovirus-mediated gene transfer to rhesus monkey airway epithelium*. Human Gene Therapy, 5, 3-10.
CULLITON B. J., 1989. *French Anderson's 20-Year Crusade*. Science, 246, 748.
CULLITON B. J., *Gene therapy begins*. Science, 249, 1372.

- DAI Y., ROMAN M., NAVIAUS R. K., VERMA I. M., 1992. *Gene therapy via primary myoblasts: Long-term expression of factor IX protein following transplantation in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10892-10895.
- DANIELSON H., 1988. *Gene therapy in man. Recommendations of European Medical Research Councils*. Lancet, 1271-1272.
- FERRARI G., ROSSINI S., FIAVAZZI R., GIAVAZZI R., MAGGIONI D., NOBILI N., SOLDATI M., UNGERS G., NAVILIO F., GILBOA E., BORDIGNON C., 1991. *An in vivo model of somatic cell gene therapy for human severe combined immunodeficiency*. Science, 251, 1363-1366.
- FRIEDMANN T., 1989. *Progress toward human gene therapy*. Science, 244, 1275-1280.
- GILBOA E., SMITH C., 1994. *Gene therapy for infectious diseases: the AIDS model*. TIG, 10, 139-144.
- GUTIERREZ A. A., LEMOINE N. R., SIKORA K., 1992. *Gene therapy for cancer*. Lancet, 339, 715-720.
- HERSHFIELD M. S., 1991. *Enzyme replacement therapy for inherited metabolic diseases*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 76-94.
- HUBER B. E., RICHARDS C. A., KRENITSKY T. A., 1991. *Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8039-8034.
- HYDE S. C., GILL D. R., HIGGINS C. F., CUTHBERT A. W., 1993. *Correction of the ion transport defect in cystic fibrosis transgenic mice by gene therapy*. Nature, 362, 250-255.
- KARP J. E., BRODER S., 1994. *New directions in molecular medicine*. Cancer Research, 54, 653-665.
- KAY M. A., WOO S. L. C., 1994. *Gene therapy for metabolic disorders*. TIG, 10, 253-257.
- KOHN D. B., ANDERSON W. F., BLAISE R. M., 1989. *Gene therapy for genetic diseases*. Cancer Investigation, 7, 179-192.
- LANEUVILLE P., CHANG W., KAMEL-RIED S., FAUSER A. A., DICK J. E., 1988. *High efficiency gene transfer and expression in normal human hematopoietic cells with human hematopoietic cells with retrovirus vector*. Blood, 71, 811-814.
- LARRICK J. W., BURCK K. L., 1991. *Introduction and overview of human gene therapy*. W: *Gene therapy*. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo, 1-14.
- LARRICK J. W., BURCK K. L., 1991. *Perspectives and future directions*. W: *Gene therapy*. Elsevier, New York, Amsterdam, London, Tokyo, 259-261.
- LEDLEY F. D., 1987. *Somatic gene therapy for human disease: a problem of eugenics?* TIG, 3, 112115.
- MILLER A. D., 1992. *Human gene therapy comes of age*. Nature, 357, 455-460.
- MILLER H. I., 1994. *Gene therapy for enhancement*. Lancet, 344, 316-317.
- MULLIGAN R. C., 1993. *The basic science of gene therapy*. Science, 260, 926-931.
- NYHAN L. W., 1991. *Classic approaches to the treatment of inherited metabolic disease*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1-33.
- OSTROVE J. M., 1994. *Safety testing programs for gene therapy viral vectors*. Cancer Gene Therapy, 1, 125-131.
- PARKMAN R., 1991. *Organ transplantation as therapy for genetic diseases*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 95-106.
- PENG H., ARMENTANO D., MACKENZIE-GRAHAM L., SHEN R-F., DARLINGTON G., LEDLEY F. D., WOO S. L. C., 1988. *Retroviral-mediated gene transfer and expression of human phenylalanine hydroxylase in primary mouse hepatocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 8146-8150.
- ROSENFELD M. E., YOSHIMURA K., TRAPNELL B. C., YONEYAMA K., RESENTHAL E. R., DALEMANS W., FUKAYAMA M., BARGON J., STIER L. E., STRATFORD-PERRICAUDET L., PERRICAUDET M., GUGGINO W. B., PAVIRANI A., LECOCQ J. P., CRYSTAL R. G., 1992. *In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium*. Cell, 68, 143-155.
- SCHNEIDER J. A., 1991. *Treatment of inherited metabolic diseases by chelation or other methods of toxin removal*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 62-75.
- SOONPIN Y., MITTEREDER N., TANG K. O'SULLIVAN C., TRAPNELL B. C., 1994. *Gene Therapy*, 1, 192-200.
- STRAUSS M., 1994. *Liver-directed gene therapy: prospects and problems*. Gene Therapy, 1, 156-164.
- SWEETMAN L., 1991. *Cofactor replacement*. W: *Therapy for Genetic Disease*, FRIEDMANN T. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 34-61.
- WEATHERALL D. J., 1991. *Gene therapy in perspective*. Nature, 349, 275-276.
- WILSON J. M., CHOWDHURY J. R., 1990. *Prospects for gene therapy of familial hypercholesterolemia*. Mol. Biol. Med., 7, 223-232.
- WOLFF J. A., MALONE R. W., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P. L., 1990. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 247, 1465-1468.

1. KOSMOS publikuje artykuły informujące o stanie wiedzy w różnych dziedzinach szeroko pojętej biologii i jej pogranicza z innymi naukami, opracowane przez specjalistów dla czytelników z wyższym wykształceniem, zainteresowanych problemami biologii. Jest adresowany przede wszystkim do pracowników naukowych, nauczycieli szkół średnich i wyższych oraz studentów.

2. Artykuły powinny być zatem pisane językiem naukowym lecz zrozumiałym dla niespecjalistów w danej dziedzinie. Jest wskazane wyjaśnianie specjalistycznego słownictwa a zwłaszcza wprowadzanych skrótów. Należy unikać nadmiernej liczby cytowań oryginalnych prac, odsyłając czytelników w miarę możliwości do artykułów przeglądowych.

3. Objętość artykułu nie powinna w zasadzie przekraczać 1 arkusza autorskiego, to jest około 20 stron znormalizowanego maszynopisu, łącznie ze spisem literatury, tabelami i ilustracjami. W przypadku zeszytów tematycznych, objętość artykułu należy ustalić w porozumieniu z redaktorem merytorycznym zeszytu.

4. Prace należy nadsyłać w formie maszynopisu w 2 kopiach na białym papierze formatu A4 oraz 1 kopię na dyskietce, napisaną pod dowolnym edytorem tekstu na komputerze klasy IBM PC, bez centrowania tytułów, zaznaczania akapitów, formatowania i wymuszania przenoszenia.

5. Teksty powinny być pisane z podwójnym odstępem między wierszami i lewym marginesem szerokości około 4 cm, bez używania wyróżnień (podkreślenia, spacjiowania, pisania kursywą). Wszelkie wskazówki dotyczące wyróżnień w tekście oraz miejsca włamania ilustracji należy zaznaczać zwykłym ołówkiem na marginesie maszynopisu. Wszystkie śródtytuły piszemy bez numeracji, czcionką tej samej wielkości a ich gradację zaznaczamy na marginesie ołówkiem: I-, II- lub III-rzędu. Strony należy numerować. Na oddzielnej, nie numerowanej stronie tytułowej należy podać tytuł pracy, imię (w pełnym brzmieniu) i nazwisko autora(ów), nazwę i adres zakładu pracy, adres zamieszkania, numer telefonu, telefaksu i adres poczty elektronicznej (E-mail).

6. Cytowane w tekście prace zaznaczamy przez podanie nazwiska autora(ów) i roku publikacji w nawiasie półokrągłym, np. (BROOKS i FROG 1993), (FISHER i współaut. 1992). Cytowaną literaturę należy zestawić na końcu maszynopisu bez numeracji w alfabetycznej kolejności według nazwisk autorów w następujących formatach:

— artykuł: BROOKS W. J., Frog T. K., 1993. Tytuł pracy w języku oryginału. Przyjęty skrót nazwy czasopisma, tom, strony od...do..., np.: Kosmos 43, 129-146;

— rozdział: FISHER D., KAY M. D., JUREK Z., 1992. Tytuł rozdziału. W: (tytuł książki), inicjał(y) i nazwisko(a) redaktora(ów) (red.). Nazwa wydawnictwa, miejsce wydania, strony od...do....;

—książka: WÓJCICKI B., 1993. Tytuł. Wydawnictwo, miejsce wydania, str...

7. Do maszynopisu należy dołączyć na oddzielnej kartce tytuł i krótkie streszczenie artykułu w jęz. angielskim (nie przekraczające 1 str.), informujące o zasadniczej jego treści.

8. Rysunki, schematy i fotografie (oryginały + 2 kserokopie) muszą być dostarczone łącznie z maszynopisem w formie nadającej się do reprodukcji. Na odwrocie należy zaznaczyć ołówkiem ich numerację oraz nazwisko(a) autora(ów) i kilka pierwszych słów tytułu pracy. Rysunki powinny być wykonane w skali 1:1 (maksymalna szerokość 13,5 cm a wysokość — 19,5 cm z uwzględnieniem miejsca na podpis pod rysunkiem, dostosowane do wymiarów kolumny 13,5 × 19,5 cm), lub proporcjonalnie większej, czarnym tuszem na kalce (białym papierze wysokiej jakości), a w przypadku rysunków wykonanych techniką komputerową — wydrukowane na białym papierze drukarką laserową (oryginał prosimy przysłać na dyskietce). Opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką odpowiedniej wielkości: nie mniejsza niż 12 punktów dla rysunków w skali 1:1, lub odpowiednio większą, tak aby po zmniejszeniu do druku opis był czytelny. Kolorowe ilustracje mogą być umieszczone wyłącznie na koszt Autora(ów) lub zatrudniającej instytucji.

9. Autorzy otrzymują 25 nadbitek autorskich. Dodatkowe nadbitki są odpłatne i należy je zamawiać wraz ze wzrotem korekty tekstu.

ADRESY REDAKCJI:

Redaktor Naczelny — prof. dr Kazimierz L. Wierzchowski
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
Sekretarz Redakcji — mgr Barbara Bierzyńska
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa

Adresy, pod którymi można zamówić prenumeratę lub nabyć poszczególne zeszyty KOSMOSU:

Medyczna Agencja Wydawniczo Informacyjna, Złota 60/28
Nr konta: PKO BP IX O/W-wa nr 1599-321004-136.
Amos, Zuga 12, 01-806 Warszawa
Nr konta: PKO VIII O/W-wa nr 1586-77578-136.

SPIS TREŚCI

<i>Jerzy Nowak</i> — Znaczenie i perspektywy genetyki w rozwoju nauk medycznych	347
<i>Jacek Zaremba</i> — Diagnostyka prenatalna	363
<i>Bogdan Kałużewski</i> — Czy chromosomy płciowe są nam potrzebne?	371
<i>Jolanta Kwiatkowska, Dobrawa Lisiecka, Ryszard Słomski, Barbara Siemieniako, Jadwiga Sowińska, Bożena Galas-Zgorzalewicz, Ewa Emich-Widera, Elżbieta Marszał, Tadeusz Ciesielski</i> — Diagnostyka molekularna dystrofii mięśniowej Duchenne'a/Beckera	389
<i>Michał Witt</i> — Wybrane aspekty zależności genotyp — fenotyp w mukowiscydozie	409
<i>Jerzy Bał, Dorota Maciejko</i> — Mukowiscydoza — od genu do terapii	419
<i>Jadwiga Jaruzelska</i> — Fenyloketonuria — od genotypu do kliniki	431
<i>Ewa Popowska</i> — Molekularne podłoże zespołu Huntera	445
<i>Anna Kowalska, Bożena Piłacik</i> — Niedobór alfa-1-antytrypsyny	459
<i>Małgorzata Jungerman</i> — Cukrzyca insulinozależna — skomplikowany przykład choroby uwarunkowanej wieloczynnikowo	471
<i>Ryszard Słomski, Jolanta Kwiatkowska, Hanna Chlebowska, Barbara Siemieniako, Magdalena Słomska</i> — Polimorficzne sekwencje DNA i ich zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa	479
<i>Henryk Hübner, Anna Mordalska</i> — Genomowy imprinting u człowieka	493
<i>Danuta Rożynkowa</i> — Perspektywy genetycznych badań nowotworów — odkrycia i wizje	507
<i>Antoni Horst</i> — Produkty genów przeciwnowotworowych	523
<i>Andrzej L. Pawlak</i> — Dziedziczne podatności na nowotwory i czynniki wpływające na ryzyko zachorowania	537
<i>Krzysztof Szyfter</i> — Zróżnicowanie procesu naprawy DNA w normie i patologii człowieka	551
<i>Maria Szaśniadek, Józef Jagielski</i> — Biologiczne skutki działania czynników mutagennych .	563
<i>Jerzy Nowak</i> — Postępy terapii genowej chorób dziedzicznych	571

CONTENTS

<i>Jerzy Nowak</i> — Genetics in development of medical sciences. Importance and perspectives	355
<i>Jacek Zaremba</i> — Prenatal diagnosis	363
<i>Bogdan Kalużewski</i> — Do we need sex chromosomes?	371
<i>Jolanta Kwiatkowska, Dobrawa Lisiecka, Ryszard Słomski, Barbara Siemieniako, Jadwiga Sowińska, Bożena Galas-Zgorzalewicz, Ewa Emich-Widera, Elżbieta Marszał, Tadeusz Ciesielski</i> — Molecular diagnostics of Duchenne/Becker muscular dystrophy	389
<i>Michał Witt</i> — Selected aspects of genotype — phenotype relationship in cystic fibrosis	409
<i>Jerzy Bał, Dorota Maciejko</i> — Cystic fibrosis from gene to therapy	419
<i>Jadwiga Jaruzelska</i> — Phenylketonuria — from genotype to the clinic	431
<i>Ewa Popowska</i> — Molecular basis of the Hunter syndrome	445
<i>Anna Kowalska, Bożena Pilacik</i> — Deficiency of alpha-1-antitripsin	459
<i>Małgorzata Jungerman</i> — Insulin-dependent diabetes mellitus — an example of a complicated multifactorial disorder	471
<i>Ryszard Słomski, Jolanta Kwiatkowska, Hanna Chlebowska, Barbara Siemieniako, Magdalena Słomska</i> — Polymorphic DNA sequences and their application in paternity testing	479
<i>Henryk Hübner, Anna Mordalska</i> — Genomic imprinting in man	493
<i>Danuta Rożynkowa</i> — Perspectives in cancer genetic research — discoveries and visions	507
<i>Antoni Horst</i> — Products of the tumor suppressor genes	523
<i>Andrzej L. Pawlak</i> — Inherited susceptibility to cancer and other factors influencing occurrence of cancer	537
<i>Krzysztof Szyfter</i> — Physiological and pathological variability of DNA repair in human	551
<i>Maria Sęsiadek, Józef Jagielski</i> — Biological effects of mutagenic agents	563
<i>Jerzy Nowak</i> — Progress in gene therapy of hereditary diseases	571