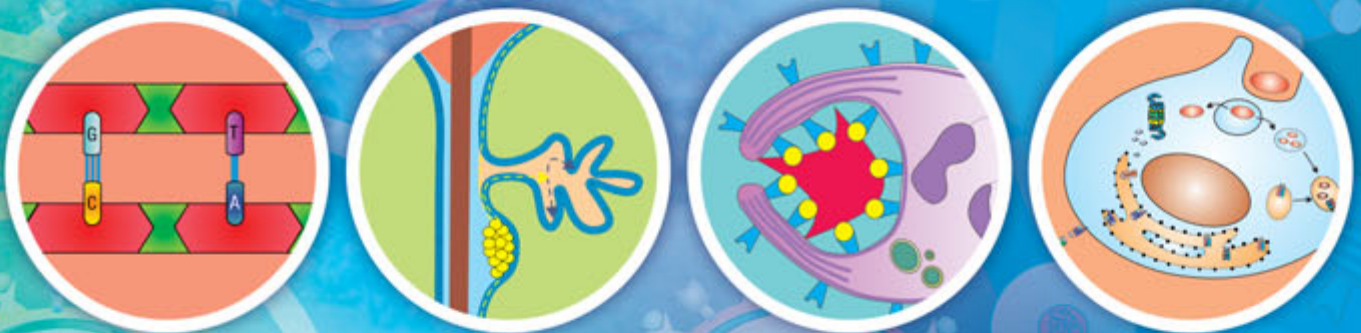


SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII

dla studentów medycyny,
weterynarii i biologii



SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII

Podręcznik dla studentów medycyny,
weterynarii i biologii

Redakcja
Maciej Zabel
Jerzy Kawiak

Wydanie III

Wszelkie prawa zastrzeżone, szczególnie prawo do przedruku i tłumaczenia na inne języki. Żadna z części tej książki nie może być w jakiegokolwiek formie publikowana bez uprzedniej pisemnej zgody Wydawnictwa. Dotyczy to również sporządzania fotokopii, mikrofilmów oraz przenoszenia danych do systemów komputerowych.

© Copyright by Edra Urban & Partner, Wrocław 2021

Redakcja naukowa wydania III
prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel
prof. dr hab. Jerzy Kawiak

Autorzy wydania III

prof. dr hab. Hieronim Bartel (rozdz. 1)
prof. dr hab. Jacek Bigda (rozdz. 2)
prof. dr hab. Piotr Dzięgiel (rozdz. 12)
dr Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk (rozdz. 11)
dr Grażyna Hoser (rozdz. 5)
dr hab. Anna Hyc (rozdz. 4)
prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka (rozdz. 10)
dr n. przyr. Ewa Jagoda (rozdz. 13)
dr hab. Lucyna Kaszubowska (rozdz. 3)
prof. dr hab. Jerzy Kawiak (rozdz. 6, 8, 14)
dr hab. Bartosz Kempisty (rozdz. 15)
prof. dr hab. med. Zbigniew Kmieć (rozdz. 3)
prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz (rozdz. 5, 7)

prof. dr hab. Jan A. Litwin (rozdz. 15)
prof. dr hab. Jacek Malejczyk (rozdz. 11)
dr hab. med. Agnieszka Malińska (rozdz. 13)
prof. dr hab. Stanisław Moskalewski (rozdz. 9)
prof. dr hab. Michał Nowicki (rozdz. 12)
prof. dr hab. Stanisław Orkisz (rozdz. 1)
dr hab. Tadeusz Pacuszka (rozdz. 6)
dr hab. Małgorzata Piasecka (rozdz. 10)
prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okolów (rozdz. 12)
prof. dr hab. Wojciech Sawicki (rozdz. 3)
prof. dr hab. Cezary Wójcik (rozdz. 4, 9)
prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel (rozdz. 5, 7, 8, 14)
dr hab. med. Anna J. Żaczek (rozdz. 2)

Prezes Zarządu: Giorgio Albonetti
Redaktor naczelny: lek. med. Edyta Błażejewska
Redaktor prowadzący: Renata Wręczycka
Skorowidz: Justyna Szamrowicz
Projekt okładki: Beata Poźniak
Opracowanie graficzne rycin – mgr inż. Monika Świerczewska

ISBN 978-83-66548-50-3

Edra Urban & Partner
ul. Kościuszki 29, 50-011 Wrocław
tel. 71 726 38 35
biuro@edraurban.pl

www.edraurban.pl

Łamanie i przygotowanie do druku: Anna Noga-Grochola
Druk i oprawa: Drukarnia LCL, Łódź

Spis treści

Przedmowa do wydania trzeciego	ix
Autorzy	xi
Miary oraz skróty aminokwasów używane w biologii komórki	xiii
Wykaz skrótów	xv
Rozdział 1	
Organizacja i funkcjonowanie jądra komórkowego	1
Stanisław Orkisz, Hieronim Bartel	
Jądro komórkowe – dane ogólne	2
Otoczka jądrowa	2
Macierz jądrowa	5
Funkcja macierzy jądrowej	5
Struktura kwasów nukleinowych	6
Replikacja DNA	8
Naprawa DNA	9
Organizacja strukturalna chromatyny	12
Strefa interchromatyny	14
Jąderko – struktura i funkcja	17
Odczytywanie informacji genetycznej	18
Biogeneza rybosomów	19
Rozdział 2	
Geny – lokalizacja, struktura, funkcja, dziedziczenie. Inżynieria genetyczna	25
Jacek Bigda, Anna J. Żaczek	
Chromatyna i chromosomy	25
Organizacja i funkcjonowanie genów	26
Rozdział 3	
Cykl komórkowy i starzenie komórkowe	43
Zbigniew Kmieć, Lucyna Kaszubowska, Wojciech Sawicki	
Podstawowe mechanizmy regulacji cyklu komórkowego	45
Fazy cyklu komórkowego	49
Rodzaje populacji komórkowych	65
Komórkowe podstawy procesu starzenia	65
Starzenie komórkowe	65
Procesy charakteryzujące starzenie komórek	68
Zmiany w metabolizmie komórkowym	70

Rozdział 4**Apoptoza i autofagia** 77

Cezary Wójcik, Anna Hyc

Apoptoza a martwica	78
Autofagia	85
Rys historyczny	86
Wprowadzenie	86
Podsumowanie	92

Rozdział 5**Mechanizmy rozwoju i różnicowania komórek** 95

Maciej Zabel, Janusz Kubrakiewicz, Grażyna Hoser

Stabilność genomu w czasie różnicowania	97
Zróżnicowana ekspresja genów – podstawa specjalizacji strukturalnej i funkcjonalnej komórek	98
„Dialog międzykomórkowy” w różnicowaniu	101
Informacja pozycyjna	103
Pamięć komórkowa	105
Odnowa i przebudowa tkanek i narządów	105

Rozdział 6**Błony biologiczne i transport przez błony** 111

Jerzy Kawiak, Tadeusz Pacuszka

Błona komórkowa – oddzielenie środowiska wewnętrznego komórki od otoczenia	112
Środowisko wewnątrz komórki podzielone błonami (u eukariota)	112
Dwuwarstwa fosfolipidowa – podstawowa struktura błon biologicznych	113
Białka błonowe	118
Błona erythrocytu i szkielet błony	121
Białko integralne leukocytów – CD45	123
Glikokaliks	123
Transport cząstek przez błony biologiczne	123
Endocytoza i kaweole	133
Oporność wielolekowa	133
Zjawisko fuzji błon	134

Rozdział 7**Cytoskielet** 137

Maciej Zabel, Janusz Kubrakiewicz

Mikrotubule	139
Filamenty pośrednie	146
Mikrofilamenty	149

Rozdział 8**Cząsteczki adhezyjne i składniki substancji międzykomórkowej** 163

Maciej Zabel, Jerzy Kawiak

Cząsteczki adhezyjne	164
Białka wewnątrzkomórkowe związane z CAM	168
Cząsteczki międzykomórkowe	169
Błona podstawna	174
Połączenia międzykomórkowe	175
Znaczenie CAM w fizjologii i patologii	180

Rozdział 9**Wybrane procesy cytoplazmatyczne** 187

Cezary Wójcik, Stanisław Moskalewski

Wprowadzenie	188
Adresowanie białek w komórce	188
Translokacja białek do siateczki śródplazmatycznej	190
Modyfikacja białek w siateczce śródplazmatycznej	191
Sortowanie białek organelli błoniastych	191
Transport pęcherzykowy	193
Sortowanie białek w komórkach spolaryzowanych	194
Import białek do peroksysomów	195
Import białek do mitochondriów	195
Transport jądrowo-cytoplazmatyczny	196
Krople lipidowe	197
Białka opiekuńcze	198
Ubikwitynacja białek	199
Proteasomy	200
Degradacja związana z siateczką śródplazmatyczną (ERAD)	201
Odpowiedź rozfałdowanych białek (UPR)	201

Rozdział 10**Morfologia i funkcja mitochondriów** 205

Lilla Hryniewiecka, Małgorzata Piasecka

Morfologia mitochondriów	206
Funkcja mitochondriów – mitochondria jako organelle wytwarzające ATP	212

Rozdział 11**Komunikacja międzykomórkowa – odbiór i przekazywanie sygnałów z udziałem receptorów** 223

Jacek Malejczyk, Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk

Komunikacja międzykomórkowa	224
Przekazywanie sygnałów przez synapsy	245

Rozdział 12**Śródbłonek** 255

Piotr Dzięgiel, Michał Nowicki, Marzenna Podhorska-Okołów

Ogólna charakterystyka komórek śródbłonna	255
Regeneracja śródbłonna	257
Dysfunkcja komórek śródbłonna a choroby układu krążenia	258
Rola śródbłonna w procesie angiogenezy	259
Rola śródbłonna w chorobach nowotworowych	260
Rola komórek śródbłonna w procesie zapalnym	262

Rozdział 13**Podstawy immunologii** 265

Agnieszka Malińska, Ewa Jagoda

Mechanizmy odporności wrodzonej (nieswoistej)	266
Mechanizmy odporności nabytej (swoistej)	272
Regulacja odpowiedzi immunologicznej	283
Przykłady chorób immunizacyjnych	285

Rozdział 14**Kancerogeneza** 289

Jerzy Kawiak, Maciej Zabel

Podstawowe zaburzenia w komórce nowotworowej	290
Komórki odpornościowe czynne immunologicznie zwalczają komórki nowotworowe	290
Model klonalnej ewolucji nowotworu	290
Nowotwory łagodne i złośliwe	291
Onkogeny, onkogeny wirusowe	291
Powstawanie onkogenów w komórkach niezakażonych retrowirusem	292
Geny supresorowe nowotworów	294
Apoptoza i geny mutatorowe	296
Telomery	297
Przykład rozwoju nowotworu złośliwego	297
Zmieniona obrona immunologiczna w chorobie nowotworowej	298
Leczenie nowotworów	299

Rozdział 15**Metody badań budowy i funkcji komórek** 303

Jan A. Litwin, Bartosz Kempisty

Wstęp	304
Metody przygotowania komórek do badań	304
Badania mikroskopowe	313

Odpowiedzi 327**Skorowidz** 338

Przedmowa do wydania trzeciego

Czas płynie szybko, a 7 lat od drugiego wydania Seminariów z cytofizjologii w nauce to olbrzymi postęp wiedzy. Dlatego też postanowiliśmy, że to czas najwyższy na nasze starania o następne wydanie podręcznika i uzgodniliśmy, że sterowanie tego wydania przejmie prof. Maciej Zabel. Jak poprzednio, staraliśmy się nie powiększać objętości podręcznika. Zachowaliśmy wszystkie rozdziały, chociaż ich kolejność czy tytuł nieco się zmieniły. Wprowadziliśmy również drobne ogólne zmiany, jak pytania na końcu rozdziałów.

Jesteśmy niezmiernie wdzięczni Wydawnictwu Edra Urban & Partner za trud włożony w przygotowanie tego wydania. Szczególne podziękowania należą się Pani Renacie Wręczyckiej.

Będziemy zobowiązani, jak zawsze, za wszelkie uwagi krytyczne i uwzględnimy je w kolejnych dodrukach.

Grudzień 2020 r.
Jerzy Kawiak, Maciej Zabel

Autorzy

Prof. dr hab. Hieronim Bartel

Katedra Biostruktury, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (rozdział 1)

Prof. dr hab. Jacek Bigda

Katedra Biotechnologii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny (rozdział 2)

Prof. dr hab. Piotr Dzięgiel

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 12)

Dr Jolanta Godlewska-Jędrzejczyk

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 11)

Dr Grażyna Hoser

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Studium Kliniczno-Dydaktyczne, Zakład Cytologii Klinicznej, Warszawa (rozdział 5)

Prof. dr hab. Lilla Hryniewiecka

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (rozdział 10)

Dr hab. Anna Hyc

Zakład Histologii i Embriologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (rozdział 4)

Dr n. przyr. Ewa Jagoda

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 13)

Dr hab. Lucyna Kaszubowska

Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny w Gdańsku (rozdział 3)

Prof. dr hab. Jerzy Kawiak

Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN, Warszawa (rozdział 6, 8, 14)

Dr hab. Bartosz Kempisty

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Chirurgii Weterynaryjnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (rozdział 15)

Prof. dr hab. Zbigniew Kmieć

Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny w Gdańsku (rozdział 3)

Prof. dr hab. Janusz Kubrakiewicz

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Zoologiczny, Wrocław (rozdział 5, 7)

Prof. dr hab. Jan A. Litwin

Katedra Histologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków (rozdział 15)

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 11)

Dr hab. med. Agnieszka Malińska

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, (rozdział 13)

Prof. dr hab. Stanisław Moskalewski

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa (rozdział 9)

Prof. dr hab. Michał Nowicki

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (rozdział 12)

Prof. dr hab. Stanisław Orkisz

Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Katedra Biostruktury (rozdział 1)

Dr hab. Tadeusz Pacuszka

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego; Studium Kliniczno-Dydaktyczne; Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Warszawa (rozdział 6)

Dr hab. Małgorzata Piasecka

Katedra i Zakład Histologii i Biologii Rozrodu, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie (rozdział 10)

Prof. dr hab. Marzenna Podhorska-Okołów

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu (rozdział 12)

Prof. dr hab. Wojciech Sawicki

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum
Biostruktury Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego,
Warszawa (rozdział 3)

Prof. dr hab. Cezary Wójcik

Oregon Health and Science University, USA, (rozdział 4, 9)

Prof. dr hab. n. med. Maciej Zabel

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Uniwersytet
Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
(rozdział 5, 7, 8, 14)

Dr hab. med. Anna J. Żaczek

Zakład Onkologii Translacyjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny (rozdział 2)

Ryciny – mgr inż. Monika Świerczewska

Organizacja i funkcjonowanie jądra komórkowego

H A S Ł A

Otoczka jądrowa

Nukleoplazmę od cytoplazmy oddziela otoczka jądrowa, która jest dynamiczną strukturą przystosowaną do intensywnej wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej. Odbyna się ona przez kanały w otoczkę, w których zlokalizowane są wyspecjalizowane struktury zwane jądrowymi kompleksami porowymi.

Składniki DNA

Nośnik informacji genetycznej – DNA, jest zbudowany z nukleotydów. Szkielet łańcucha stanowi cukier – deoksyryboza połączona z grupą fosforanową. Trzeci składnik DNA stanowi jedna z 4 zasad: dwóch purynowych (adeniny i guaniny) i 2 pirymidynowych (cytozyny i tyminy). Sekwencja zasad decyduje o zapisie informacji genetycznej. W dwuniciowej helisie zasady obu łańcuchów łączą się zgodnie z regułą komplementarności: adenina z tyminą, a guanina z cytozyną.

Struktura DNA

Łańcuchy polinukleotydowe skręcone są w prawoskrętną, dwuniciową helisę o średnicy 2 nm. Jeden skręt helisy o długości 3,4 nm zawiera 10 par nukleotydów. Przestrzenny układ helisy tworzy bruzdę większą i mniejszą między skręconymi łańcuchami. Jest to najczęściej występująca forma przestrzenna DNA określana jako DNA B. Plastyczność DNA sprawia, że może on tworzyć lewoskrętną helisę zwaną DNA Z, o nieco mniejszej średnicy i zygzakowatym kształcie szkieletu fosforanowo-cukrowego. Niekiedy DNA formuje się w konfigurację DNA A o największej średnicy.

Replikacja DNA

Powielanie DNA jest złożonym, wieloetapowym, wieloenzymatycznym procesem, w którym uczestniczą helikazy – enzymy rozplatające podwójną helisę, SSB – białka stabilizujące jednoniciowy DNA, prymary – rozpoczynające replikację, białka ruchomej obręczy, umożliwiające polimerazie DNA polimeryzację nukleotydów w nowo powstającym łańcuchu polinukleotydowym. W tym bardzo dokładnym mechanizmie zdarzają się błędne sparowania nukleotydów, które są korygowane podczas procesu zwanego redagowaniem.

Naprawa DNA

Mechanizmy naprawy DNA zapewniają wierność replikacji oraz stabilność genomu. Błędy w sekwencji DNA, występujące bardzo rzadko w czasie replikacji, są natychmiast usuwane przez aparat replikacyjny. Nierozpoznane i nieusunięte defekty struktury DNA prowadzą do powstania mutacji.

Skład i struktura chromatyny

Cząsteczka DNA w chromatynie, łącząc się z białkiem, tworzy kompleks – włókno deoksyrybonukleoproteinowe (DNP). Głównym

składnikiem białkowym chromatyny są 4 klasy histonów: H2A, H2B, H3 i H4. Histon H1 różni się od histonów rdzeniowych i pełni inną funkcję. Białka niehistonowe (NHP) są zaangażowane w replikację i naprawę DNA oraz ekspresję genów. Podstawową strukturą chromatyny jest włókno nukleosomowe (nukleofilament) składające się z nukleosomów oraz tzw. łącznikowego DNA. Strukturę wyższego rzędu chromatyny interfazalnej tworzy solenoid, powstały w wyniku superspiralizacji włókna nukleosomowego. W wyniku dalszej kondensacji chromatyny powstają duże pętle liczące 60–100 kilo par zasad (kpz), zakotwiczone w macierzy jądrowej.

Przestrzeń interchromatynowa

Przestrzeń ograniczona otoczką jądrową między przylegającymi do niej i rozrzuconymi w nukleoplazmie skupieniami chromatyny skondensowanej. Zawiera wiele struktur ziarnistych i włóknistych o rybonukleoproteinowym składzie oraz chromatynę rozproszoną (euchromatynę).

Pozajądrowe struktury RNP

Struktury RNP przestrzeni interchromatynowej są morfologicznym wykładnikiem transkrypcji, metabolizmu i transportu kwasów nukleinowych oraz syntezy białek. W strefie brzeżnej chromatyny skondensowanej wyróżnia się włókna i ziarna perychromatyny odnoszące się do transkrypcji i formowania mRNA. Ponadto kontrastowanie preferencyjne z EDTA, różnicujące struktury zawierające DNA i RNA, pozwala uwidocznić w przestrzeni interchromatynowej włókna i ziarna interchromatyny, a także niejednorodną grupę struktur o niezupełnie poznanej biogenezie i funkcji – ciała jądrowe.

Jąderko – struktura i funkcje

Jąderka są aktywnymi domenami jądra komórkowego związanymi z syntezą prekursorów rybosomów. Podstawowe ich składniki to: ośrodki włókniste, gęsty składnik włóknisty, składnik ziarnisty, chromatyna związana z jąderkiem oraz wakuole jąderkowe. Ze względu na rozmieszczenie oraz proporcje składników jąderka można wyróżnić kilka typów morfologiczno-czynnościowych jąderek. Wysoką aktywność transkrypcyjną reprezentują jąderka gąbczaste i zwarte. Jąderka z segregacją składników oraz jąderka resztkowe są morfologicznym wyrazem zahamowania syntezy rRNA.

Transkrypcja RNA

Jest to proces przepisywania informacji zapisanej w kolejności nukleotydów DNA na sekwencję nukleotydów w łańcuchu mRNA lub rRNA. Transkrypcja jest procesem wieloetapowym, w wyniku którego powstaje pierwotny transkrypt – pre-mRNA lub pre-rRNA. W procesie dojrzewania RNA (ang. *splicing*) uczestniczą liczne białka oraz niskocząsteczkowe RNA.

Struktura rDNA

Wspólna jednostka transkrypcyjna genu rDNA zawiera 3 rodzaje sekwencji nukleotydowych: sekwencje przepisywane i obecne w dojrzałych rRNA, sekwencje rozdzielające poszczególne jednostki matrycowe w tandemach oraz sekwencje transkrybowane i obecne w pierwotnym transkrypcie, które zostają wycięte w czasie dojrzewania pre-rRNA. Sekwencje regulujące funkcję rDNA leżą w obrębie sekwencji nieprzepisywanych.

Morfologia rybosomowych kompleksów transkrypcyjnych

Aktywne geny rybosomowe widoczne są po zupełnym rozproszeniu chromatyny w postaci „choinek”. Często ułożone są parami

rozdzielonymi przez sekwencje nieprzepisywane. Włókna DNA są gęsto pokryte wzrastającymi w kierunku transkrypcji łańcuchami transkryptów, u podstawy których znajdują się cząsteczki Pol i RNA.

Skład i struktura RNA

Jednonicowy pofałdowany przestrzennie RNA różni się od cząsteczki DNA obecnością w swoim składzie rybozy zamiast deoksyrybozy oraz uracylu zamiast tyminy.

Jądro komórkowe – dane ogólne

Jądro komórkowe zostało opisane w końcu XVII w., ale dopiero Robert Brown w 1831 r. nadał mu nazwę **nucleus**. Jądro komórkowe jest przedziałem komórki eukariotycznej, w którym jest zgromadzona prawie cała informacja genetyczna (99% genomu jest zawarte w jądrze, resztę stanowi mitochondrialny DNA). Dzięki temu jądro kontroluje najważniejsze funkcje komórki: replikację DNA i proces transkrypcji. Wielkość jądra, jego kształt, a także organizacja materiału genetycznego zależą przede wszystkim od stanu czynnościowego i typu komórki. W komórkach młodych, intensywnie proliferujących, o dużej aktywności metabolicznej znajdują się duże kuliste jądra z wyraźnym jąderkiem i chromatyną rozproszoną. W komórkach dojrzałych jądra przyjmują mniej regularne kształty. W komórkach starych o małej aktywności metabolicznej zmianom kształtu jądra towarzyszy kondensacja (**karyopyknosis**) lub fragmentacja (**karyorhexis**) chromatyny. Zmiany te są spostrzegane także w różnych stanach chorobowych. Kształt i wielkość jądra zmieniają się również w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Kuliste i niewielkich rozmiarów jądra, widoczne w fazie G1, z chwilą przejścia w fazę G2 zwiększają swoje rozmiary, przyjmując mniej regularne kształty. Średnica większości jąder mieści się w przedziale 3,5–20 μm. Jądro jest stałym elementem wszystkich komórek organizmu z wyjątkiem dojrzałych krwinek czerwonych u ssaków i człowieka oraz warstwy rogowej naskórka. Większość komórek ma jedno jądro (monokariocyty). Rzadziej obserwuje się komórki dwujądrowe (bikariocyty, np. hepatocyty) lub wielojądrowe (polikariocyty), których przykładem są osteoklasty. Liczne badania struktury jądra dostarczały wciąż nowych informacji, ale obecność dużych skupień chromatyny skondensowanej, nawet w erze mikroskopii elektronowej, skutecznie maskowała organizację przestrzenną jądra komórkowego. Jeszcze w 1977 r. wyróżniano 4 elementy struktury jądra: otoczkę, heterochromatynę, jąderko oraz przestrzeń między skupieniami chromatyny – interchromatynę. Wprowadzenie do badań ultrastruktury jądra wielu technik, takich jak:

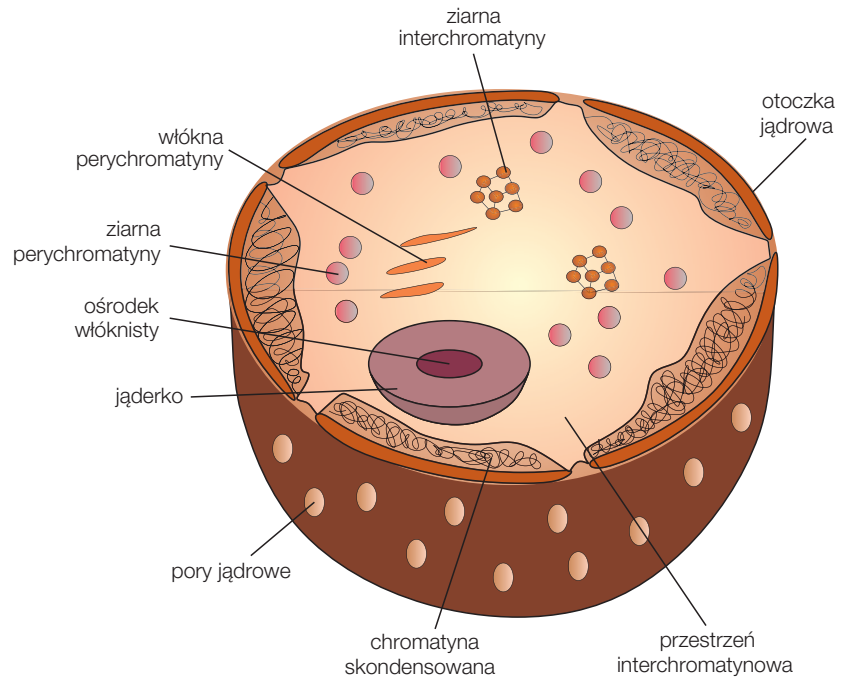
kontrastowanie z EDTA, autoradiografia wysokorozdzielcza, technika rozpraszania chromatyny do uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych, metody ultracytochemiczne, technika hybrydyzacji *in situ*, cytometria przepływowa, umożliwiło lokalizację procesów replikacji, transkrypcji, dojrzewania i transportu różnych typów RNA w przestrzeni interchromatynowej. Choć funkcja i znaczenie biologiczne wielu struktur jądrowych są wciąż nie do końca wyjaśnione, to w ultrastrukturze jądra interfazalnego można wyróżnić strefy (domeny), którym przypisywane są określone funkcje (ryc. 1.1).

Są to:

1. otoczka jądrowa,
2. macierz jądrowa,
3. chromatyna skondensowana (heterochromatyna),
4. chromatyna rozproszona (euchromatyna),
5. jąderka,
6. strefa perychromatyny:
 - a. ziarna perychromatyny,
 - b. włókna perychromatyny,
7. strefa interchromatyny:
 - a. ziarna interchromatyny,
 - b. włókna interchromatyny,
8. ciała jądrowe.

Otoczka jądrowa

Otoczka jądrowa jest dynamiczną i asymetryczną strukturą oddzielającą zawartość nukleoplazmy jądra komórkowego od cytoplazmy. Otoczka zanika w późnej profazie, rozpada się na pęcherzyki, a odtworzeniu ulega z udziałem siateczki sarkoplazmatycznej w telofazie. W przeciwieństwie do błony komórkowej przekazywanie i wymiana jądrowo-cytoplazmatyczna odbywa się w ściśle określonych miejscach zwanych **porami jądrowymi** (nukleoporami) z udziałem złożonych strukturalnie **jądrowych kompleksów porowych** (ang. NPC, **nuclear pore complex**). W obrębie otoczki jądrowej wyróżnia się:



Rycina 1.1 Budowa jądra komórkowego (zmodyfikowane wg B. Alberts).

1. wewnętrzną błonę jądrową od strony nukleoplazmy,
2. zewnętrzną (cytoplazmatyczną) błonę jądrową,
3. przestrzeń okołojądrową (pery nuklearną), zawartą między obiema błonami, o szerokości ok. 40 nm,
4. pory jądrowe zawierające jądrowe kompleksy porowe,
5. blaszkę jądrową (lamina), przylegającą do wewnętrznej powierzchni błony strukturę białkową, wchodzącą w skład macierzy jądrowej (ang. *nuclear matrix*).

Błony wewnętrzna i zewnętrzna otoczki jądrowej wykazują asymetrię strukturalną i czynnościową związaną z: obecnością rybosomów na błonie zewnętrznej, jej bezpośrednim kontaktem z RER, związkiem błony wewnętrznej z blaszką jądrową, różnorodnym składem białkowym obu błon.

Otoczka jądrowa, stanowiąc barierę między jądrem a cytoplazmą, wybiórczo i aktywnie uczestniczy w transporcie RNA do cytoplazmy. W kierunku przeciwnym przenoszone są natomiast białka strukturalne i czynnościowe, m.in. enzymy (polimerazy), czynniki transkrypcyjne, niskocząsteczkowe RNA.

Jądrowy kompleks porowy

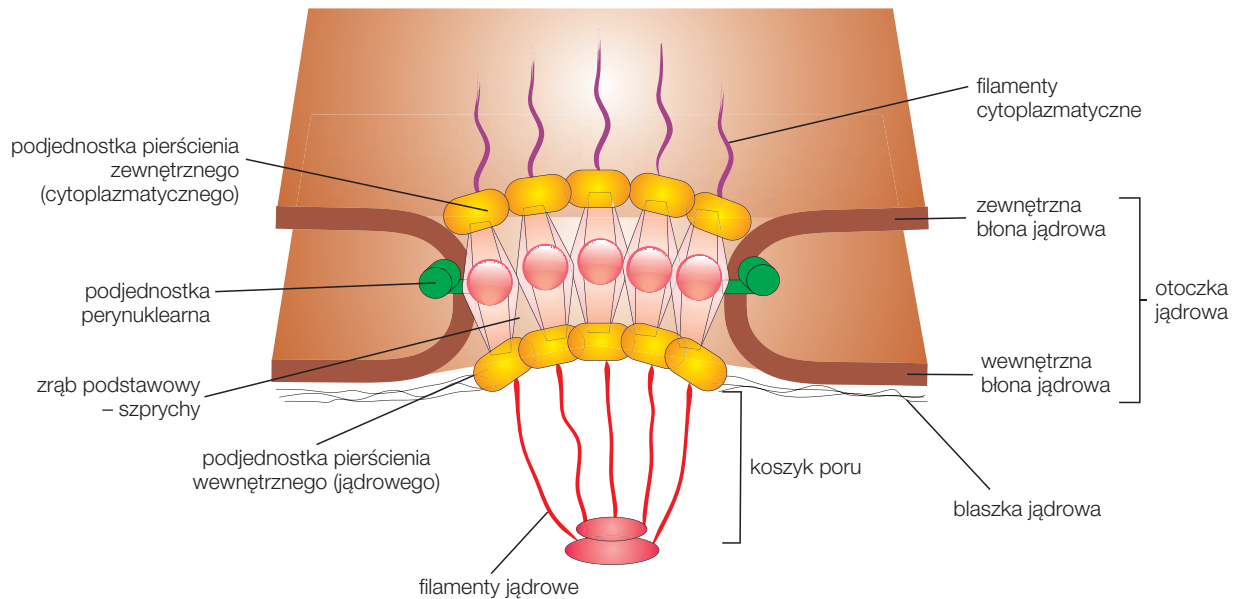
Jądrowy kompleks porowy jest wyspecjalizowaną strukturą osadzoną w obrębie poru jądrowego o średnicy 120–150 nm. Liczba kompleksów porowych w otoczce jądra komórkowego zależy od wieku, aktywności metabolicznej oraz typu komórki. Przeciętnie w komórkach eukariotycznych znajduje się 10–20 porów/mm², co w hepatocytach stanowi 3000–7000

porów. W otoczce jądrowej komórek o wysokiej aktywności metabolicznej ich liczba może sięgać aż 50 mln.

Każdy kompleks porowy (ryc. 1.2) jest złożoną cylindryczną strukturą białkową o kształcie oktagonalnym. Cylinder ten tworzą 3 współosiowo ułożone pierścienie:

1. pierścień cytoplazmatyczny – od strony blaszki zewnętrznej otoczki jądrowej,
2. pierścień jądrowy od strony nukleoplazmy,
3. kompleks 8 promieniście wpuklających się do kanału segmentów (zrąb podstawowy) przypominających szprychy koła, tworzących kompleks kanału centralnego.

Jądrowy kompleks porowy jest zakotwiczony w otoczce jądrowej przez jedną z czterech podjednostek, z których jest zbudowana każda ze szprych zrębu podstawowego. Ułożenie podjednostek sąsiadujących szprych sprawia, iż między leżącymi obok siebie szprychami a błoną otoczki jądrowej powstaje 8 kanałów peryferycznych (obwodowych) o średnicy 10 nm. Kanały te przypuszczalnie są miejscem dyfuzji biernej jonów i cząsteczek o niewielkiej średnicy. W pierścieniu cytoplazmatycznym jest zakotwiczonych 8 filamentów białkowych o długości do 100 nm. Podobne filamenty zakotwiczone w pierścieniu wewnętrznym biegną promieniście w kierunku pierścienia końcowego, tworząc strukturę o średnicy 30–50 nm, przypominającą koszyk. W strukturach jądrowego kompleksu porowego zidentyfikowano kilkadziesiąt polipeptydów określanych mianem **nukleoporyn**. Białka te odgrywają istotną rolę w jądrowo-cytoplazmatycznym przekazie informacji. Kanał centralny jądrowego kompleksu porowego często, chociaż nie zawsze, zawiera strukturę określaną mianem **kompleksu**



Rycina 1.2 Jądrowy kompleks porowy (zmodyfikowane wg B. Alberts).

kanalu centralnego lub transportera, czopu, a wcześniej ziarnistości centralnej. Zmienność ultrastruktury tego kompleksu sugeruje, iż reprezentuje on transportowaną molekułę (kargo) przechodzącą przez jądrowy kompleks porowy.

Blaszka jądrowa

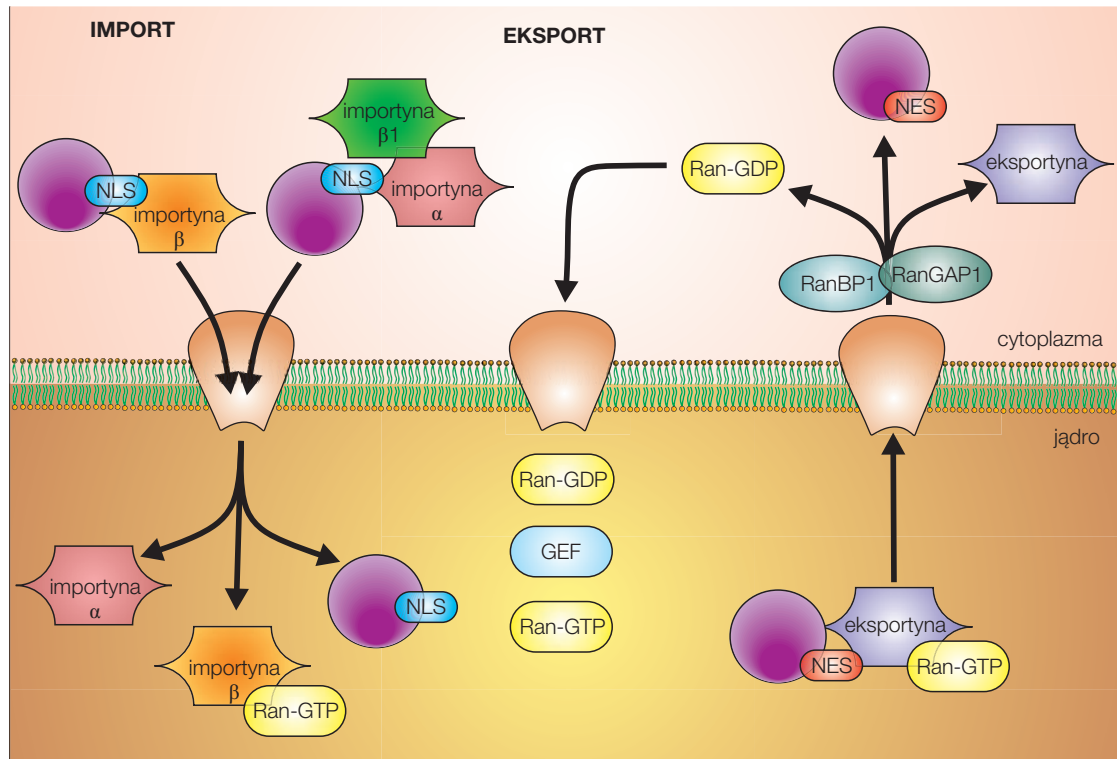
Blaszka jądrowa jest stałą strukturą o grubości 10–100 nm przylegającą do nukleoplazmatycznej powierzchni otoczki jądrowej, składającą się z sieci delikatnych włókienek białkowych.

Fibryle blaszki jądrowej są utworzone przez białka klasy lamin, stanowiące ok. 25–50% białek otoczki. U ssaków wyróżnia się 3 rodzaje lamin: A, B, C. Ze względu na duże podobieństwo składu aminokwasowego oraz struktury lamin do filamentów pośrednich są one zaliczane do białek szkieletu jądra (ang. *nuclear matrix*). Białka blaszki jądrowej stanowią zrąb dla otoczki jądrowej i porowego kompleksu jądrowego, nadając odpowiedni kształt jądra komórkowemu. Lamiны są zaangażowane w proces fragmentacji i odbudowy otoczki w czasie podziału mitotycznego. Blaszka jądrowa uczestniczy ponadto w organizacji strukturalnej chromatyny, będąc miejscem umocowania pętli chromatynowych. Lamiны, łącząc się z wewnętrzną błoną otoczki jądrowej, określają także kształt jądra.

Wymiana jądrowo-cytoplazmatyczna

Otoczka jądrowa pełni istotną rolę w selektywnej, dwukierunkowej wymianie jądrowo-cytoplazmatycznej. Kanały

peryferyczne jądrowych kompleksów porowych w wyniku nieselektywnej dyfuzji biernej umożliwiają przemieszczanie jonów, metabolitów, protein poniżej 40 kDa. Transport przez kanał centralny kompleksu poru ma charakter aktywny i służy przechodzeniu cząstek większych o charakterze RNP, a także polimeraz i lamin. Większe cząsteczki protein wymagają specyficznego przenośnika do transportu jądrowo-cytoplazmatycznego. Struktura kanału centralnego uniemożliwia swobodne przechodzenie cząsteczek niejądrowych. Proteiny przemieszczające się przez pory jądrowe posiadają krótkie sekwencje sygnałowe aminokwasów (ang. NLS, *nuclear localization signals*, oraz NES, *nuclear export signals*) przyłączone do przenoszonych białek (ryc. 1.3). Sygnały te są rozpoznawane przez białka transportowe, zwane **importynami** i **eksportynami**. Umożliwia to przemieszczenie tych białek przez kompleks porowy. NLS może występować w dwóch postaciach. Podstawowe typy NLS są rozpoznawane przez importynę α . Przenosi ona białko zawierające podstawowy typ NLS w połączeniu z importyną $\beta 1$. Rodzina białek importyny $\beta 1$ może rozpoznawać niektóre NLS i transportować je przez kompleks porowy samodzielnie. Kompleks przenoszonego białka z importyną w trakcie przemieszczania się do jądra w obrębie kompleksu poru wchodzi w przejściową interakcję z białkami (zawierającymi szereg powtórzeń fenyloalanina-glicyna), zwanymi **nukleoporynami FG**. W obrębie jądra związaną formę Ran-GTP z importyną $\beta 1$ doprowadza do zmian konformacyjnych, w wyniku których od importyny odłączają się transportowane białka (kargo). Zmiana konformacji białka Ran w zależności od jego wiązania GTP lub GDP wpływa na siłę interakcji tego białka z transportowanym kompleksem. Importyny powracają do cytoplazmy, by uczestniczyć w kolejnej rundzie transportu.



Rycina 1.3 Mechanizm wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej (zmodyfikowane wg T. Sekimoto, Y. Yoneda). NLS (*nuclear localizatin signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej, NES (*nuclear export signal*) – sygnał eksportu jądrowego, Ran (*RAs – related nuclear protein*) – białko regulujące oddziaływanie między receptorami transportu a białkami transportowymi, RanGTP (*GTP – binding protein Ran*) – białko Ran wiążące GTP, Ran GDP (*GDP – binding protein Ran*) – białko Ran wiążące GDP.

Również wymiana w kierunku przeciwnym, z jądra do cytoplazmy, głównie cząstek RNP (RNA + białko), odbywa się przez jądrowy kompleks porowy. Sekwencja sygnałowa eksportu jądrowego (NES), bogata w leucynę, jest rozpoznawana przez CRM1/eksportynę1. Czynniki CRM1 z rodziny importyn, wiążąc Ran-GTP, tworzy z przynoszonym białkiem trójczłonowy kompleks. Po przejściu przez kompleks porowy uwolnienie przynoszonego białka następuje w wyniku konwersji Ran-GTP do Ran-GDP. Niezależnie od jądrowego importu niektóre proteiny z rodziny importyn β , liczącej ok. 20 białek, uczestniczą w transporcie w obu kierunkach.

Macierz jądrowa

Nazwą macierzy jądrowej (*matriks jądrowa*, nukleoskielet, szkielet jądrowy; NM, *nuclear matrix*) jest określana pozachromatynowa struktura pozostała po trawieniu jądra komórkowego buforami o wysokiej sile jonowej, niejonowymi detergentami i nukleazami. Strukturę białkowej macierzy jądrowej tworzą trzy elementy odpowiadające określonym domenom jądra komórkowego:

1. blaszka jądrowa z jądrowymi kompleksami porowymi, będąca pozostałością otoczki jądrowej,

2. jąderka reszkowe,

3. włóknisto-ziarnista sieć pozajądrowa znajdująca się w przestrzeni interchromatynowej, tworząca tzw. macierz wewnętrzną (ang. *internal matrix*).

Funkcja macierzy jądrowej

Zarówno ultrastruktura, jak i skład chemiczny macierzy jądrowej zależą od zastosowanej procedury ekstrakcji jąder komórkowych. W skład macierzy jądrowej wchodzi ok. 98% białek oraz niewielkie ilości kwasów nukleinowych i fosfolipidów. Macierz jądrową tworzą włókienka o średnicy 3–5 nm, składające się z charakterystycznych białek zwanych **matrynami**. Wśród niehistonowych białek macierzy wyizolowano: laminy, białka Ag-NOR, aktynę, białka rybonukleoprotein jądrowych. Poza włóknami, zwanymi także **matryciną**, strukturę macierzy tworzą także gęste elektronowo ziarna o średnicy 15 nm. Ziarna te są kojarzone ze składnikiem ziarnistym jąderka, co sugeruje udział macierzy jądrowej w wymianie jądrowo-cytoplazmatycznej.

Macierz jądrowa jest dynamiczną strukturą uczestniczącą aktywnie w metabolizmie jądra. Spośród najważniejszych hipotetycznych funkcji macierzy należy wymienić:

1. udział w organizacji strukturalnej jądra oraz w tworzeniu konfiguracji przestrzennej chromatyny,
2. odgrywanie roli w procesie replikacji DNA; z filamentami macierzy są związane wieloenzymatyczne kompleksy replikacyjne,
3. uczestnictwo w regulacji ekspresji genów,
4. udział w transkrypcji i dojrzewaniu pre-rRNA oraz hnRNA, a także transporcie prekursorów rybosomów do cytoplazmy,
5. wiązanie hormonów steroidowych przez struktury macierzy jądrowej,
6. zaangażowanie w proces wirogenyzy; fosforylacja białek wirusowych,
7. wiązanie karcynogenów.

Wyżej wymienione funkcje świadczą o kluczowym znaczeniu tej struktury w aktywności metabolicznej jądra komórkowego.

Struktura kwasów nukleinowych

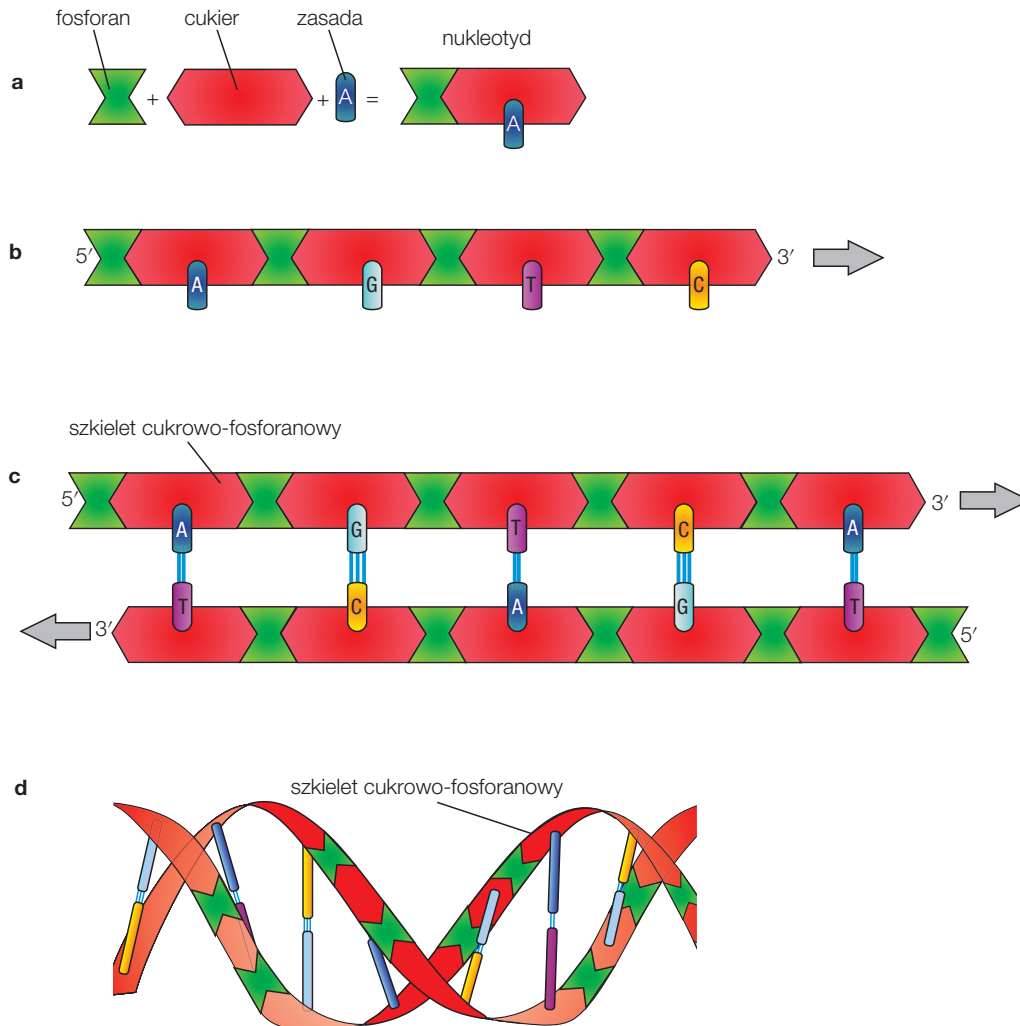
Składniki DNA

U człowieka, podobnie jak u innych organizmów, DNA jest nośnikiem informacji genetycznej. Zawartość DNA wykazuje różnice gatunkowe i skorelowana jest z łączną długością chromosomów, a nie ich liczbą. Każdy chromosom buduje jedna cząsteczka DNA, co sprawia, że liczba cząsteczek DNA jest równa liczbie chromosomów. W jego długim łańcuchu zaprogramowana jest informacja dotycząca wszystkich wytworzonych przez komórkę białek. Cząsteczka DNA jest wysokocząsteczkowym polimerem ($>10^8$), w którym podstawowymi jednostkami jego organizacji – monomerami, są deoksyrybonukleotydy, połączone kowalencyjnymi fosfodiesterowymi wiązaniami. Dlatego cząsteczkę DNA można nazwać polinukleotydem. Struktura tej cząsteczki jest przystosowana do pełnienia funkcji przechowywania i przekazywania informacji genetycznej. Każdy z nukleotydów składa się z cukru deoksyrybozy, zasady zawierającej azot oraz reszty kwasu fosforowego (ryc. 1.4). W DNA występują dwie zasady purynowe: adenina (A) i guanina (G), oraz dwie zasady pirymidynowe: cytozyna (C) i tymina (T). Deoksyryboza jest 5-węglowym cukrem, który swoimi grupami hydroksylowymi przy węglu 5' i 3' łączy się z grupami fosforanowymi, tworząc szkielet cukrowo-fosforanowy. Grupa 5' fosforanowa jednego nukleotydu wiąże się z grupą 3' hydroksylową następnego nukleotydu. Koniec 5' jednego łańcucha związany jest z końcem 3' innego. Dlatego dwa komplementarne łańcuchy DNA podwójnej helisy biegną w przeciwnych kierunkach. Deoksyryboza, łącząc się z zasadą purynową lub pirymidynową, tworzy **nukleozyd**. Nukleozyd wraz z przyłączoną grupą fosforanową tworzy jeden z czterech **nukleotydów** (dA, dT, dG, dC), różniących się rodzajem zasady. Połączone wiąza-

niami kowalencyjnymi nukleotydy tworzą długie łańcuchy o szkielecie cukrowo-fosforanowym. Ta pierwotna struktura stabilizowana jest przez dwa typy niekowalencyjnych interakcji. Jeden typ wiązań niekowalencyjnych dotyczy wiązań wodorowych, które utrzymują łańcuchy razem w strukturze helisy. W każdej nici polinukleotydowej zasady tworzą pary: adenina jednego łańcucha tworzy dwa wiązania wodorowe z tyminą drugiego, a guanina z cytozyną połączone są trzema wiązaniami wodorowymi. Stabilizuje to strukturę wewnętrzną podwójnego łańcucha DNA, ponieważ ułożone tak zasady odpychają się ze względu na ich hydrofobową naturę. Wiązania wodorowe między zasadami łatwo mogą być tworzone i zrywane, pozwalając na dokładną replikację i naprawę DNA. Taki sposób łączenia zasad nosi nazwę **reguły komplementarności**. Łączenie komplementarnych par zasad umożliwia najbardziej ekonomiczne pod względem energetycznym uformowanie dwuniciowej **helisy**. Reguła komplementarności zasad determinuje sekwencję nukleotydów równoległego łańcucha polinukleotydowego.

Formy przestrzenne DNA

Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Watsona i Cricka (1953 r.), cząsteczka DNA jest złożona z dwóch łańcuchów polinukleotydowych połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi istniejącymi między parami komplementarnych zasad. Obydwa łańcuchy DNA, biegnąc w przeciwnych kierunkach, wykazują odwrotną polarność, określaną końcami 3' i 5'. Jeżeli jeden łańcuch ma polarność 3'→5', to drugi komplementarny do niego 5'→3'. Obydwa łańcuchy polinukleotydowe są skręcone w dwuniciową helisę DNA, w której sparowane ze sobą zasady są umieszczone wewnątrz helisy. Szkielet cukrowo-fosforanowy znajduje się natomiast na zewnątrz cząsteczki. Reguła komplementarności zasad wymusza proporcje nukleotydów purynowych i pirymidynowych. Wynika z niej, że stosunek A do T i G do C wynosi 1:1 (**reguła Chargaffa**). Stosunek sumy adeniny i tyminy do sumy guaniny i cytozyny (A+T/G+C) jest wartością stałą i charakterystyczną dla określonego gatunku. U człowieka jest to 1,4:1. Średnica helisy wynosi 2 nm. W dwóch łańcuchach, skręconych zgodnie z ruchem wskazówek zegara, na jeden skręt helisy przypada 10 nukleotydów. Ponieważ odległość między nukleotydami to 0,34 nm (odpowiednio do odległości aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym), można wyliczyć skok spirali DNA, który wynosi 3,4 nm. Długość łańcucha polinukleotydowego w czasie ewolucji stopniowo się zwiększała, począwszy od wirusów, przez bakterie, do wyższych roślin i zwierząt. U człowieka DNA zawiera $5,6 \times 10^9$ polinukleotydów, co odpowiada długości łańcucha DNA równej 1,74 m. Uwzględniając konfigurację przestrzenną cząsteczki DNA, można wyróżnić cztery poziomy organizacji. Kolejność nukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym określa jego **strukturę pierwszorzędowną**. Dwa łańcuchy połączone



Rycina 1.4 Struktura DNA: **a.** Podstawowe składniki jednostki DNA. **b.** Nić DNA. **c.** Dwuniciowy DNA. **d.** Dwuniciowa helisa DNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

na zasadzie komplementarności wiązaniami wodorowymi w podwójnej helisie tworzą jego **strukturę drugorzędową**. **Strukturę trzeciorzędową** cząsteczka DNA przyjmuje dzięki charakterystycznemu ułożeniu przestrzennemu helisy. Do zaburzenia organizacji przestrzennej DNA dochodzi podczas procesu **denaturacji**.

Plastyczność DNA

Model struktury DNA zaproponowany przez Watsona i Cricka, zgodnie z którym cząsteczka DNA tworzy konstrukcję podwójnej helisy, potwierdził zgodność struktury i funkcji na poziomie molekularnym. Cząsteczka DNA może jednak występować w formie kolistej lub liniowej, a u niektórych wirusów nawet w formie jednociowej. Podwójna helisa DNA może ponadto występować w różnych formach

przestrzennych określanych jako **DNA A**, **DNA B** i **DNA Z**. W najbardziej rozpowszechnionej formie przestrzennej, jaką jest DNA B, podwójna nić DNA uformowana w prawoskrętną helisę wytwarza dwie bruzdy określane jako **rowek większy** i **rowek mniejszy**. Struktura DNA B jest formą typową dla roztworów fizjologicznych. Jej konfiguracja przestrzenna odpowiada opisanej wyżej helisie. Struktura DNA Z jest helisą lewoskrętną, której szkielet fosforanowo-cukrowy ma charakterystyczny zygzakowaty kształt. Taką konfigurację helisa przyjmuje, gdy nukleotydy purynowe i pirymidynowe występują w łańcuchu DNA naprzemiennie. Helisa DNA Z ma mniejszą średnicę w porównaniu z formą DNA B. Układ szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA Z sprawia, że w tej formie helisy można wyróżnić tylko jeden rowek. Konfiguracja DNA A jest rzadko występującą formą alternatywną DNA o największej średnicy helisy i najmniejszym skoku jej uzwojenia.

azy, aż do wytworzenia odcinka jednoniciowego z wolnym 3' końcem. W następnym etapie jest on łączony z prawidłowym chromosomem homologicznym, który służy jako matryca dla odtwarzanej nici.

Dopasowywanie pojedynczych nici DNA

W tym systemie białka naprawcze wykorzystują sekwencje powtórzone w sąsiedztwie pęknięcia do dopasowania i połączenia dwóch fragmentów DNA. Nici odcinków niehomologicznych między pęknięciami są przemieszczane poza helisę, a następnie wycinane bezpowrotnie. Decyduje to o stosunkowo dużej wierności tego szlaku naprawy.

Rekombinacja niehomologiczna

Naprawa pęknięcia helisy w tym szlaku odbywa się z udziałem **kinazy białkowej zależnej od DNA** (DNA-PK). Enzym ten przyłącza się do końca dwuniciowego DNA. Jedną z dwóch podjednostek kinazy, o właściwościach **zależnej od ATP helikazy**, zapewnia orientację przestrzenną nici podczas procesu ligacji. Druga podjednostka przeprowadza fosforylację białek uczestniczących w naprawie pęknięcia helisy DNA.

Różnorodność systemów naprawczych oraz białek enzymatycznych w nich uczestniczących decyduje o skuteczności tych mechanizmów naprawy DNA. Trzeba bowiem pamiętać, że każde nienaprawione uszkodzenie DNA może prowadzić do utrwalań zmian mutacyjnych i mieć zgubne następstwa dla komórki.

Organizacja strukturalna chromatyny

Chromatyna

Podwójna helisa DNA w komórce eukariotycznej ma zmienną długość, która jest cechą gatunkową. Częsteczka DNA występuje w połączeniu z histonami i białkami niehistonowymi, tworząc włókno deoksyrybonukleinowe (DNP). Kompleks DNA z białkami tworzy złożoną strukturę chromosomów metafazowych, a także występuje w chromatynie jądra interfazalnego (grec. *chroma* – kolorowy). Połączenie DNA z białkami decyduje o własnościach konformacyjnych chromatyny i stopniu upakowania DNA w chromosomach. W każdym chromosomie (u człowieka jest ich 46), utworzonym z jednej długiej liniowej częsteczki DNA, białka stanowiące połowę masy chromatyny decydują o jej upakowaniu w struktury o różnym stopniu kondensacji. Poziom kondensacji chromatyny zmienia się w kolejnych fazach cyklu komórkowego, od najbardziej skondensowanych chromosomów metafazowych do chromatyny rozproszonej, reprezentującej zupełnie rozwinięte włókna DNP w interfazie. Oprócz białek uczestni-

czących w kondensacji DNA inne rodzaje białek związanych z chromatyną są zaangażowane w procesy ekspresji genów, replikacji i naprawy DNA. Zmiany konformacyjne chromatyny są ściśle związane z jej aktywnością matrycową, bowiem w chromatynie zupełnie rozplecionej najłatwiejszy jest dostęp do DNA enzymów i innych białek, niezbędnych do ekspresji genów i replikacji DNA. W czasie przygotowania do mitozy następuje stopniowa kondensacja włókna nukleohistonowego, osiągająca najwyższy stopień organizacji w chromosomie mitotycznym.

Skład chromatyny

W chromatynie, będącej kompleksem DNA, histonów i białek niehistonowych, większość białek stanowią histony, chociaż w grupie białek niehistonowych wyizolowano ponad 300 białek zarówno kwaśnych, jak i zasadowych o różnej masie cząsteczkowej. Histony są białkami zasadowymi o stosunkowo niskiej masie cząsteczkowej wynoszącej 10–23 kDa. Histony zawierają dużo dodatnio naładowanych aminokwasów – lizyny i argininy (stanowią 20–30% ich sekwencji), oraz nieznaczne ilości cystyny i cysteiny. Dodatkowo ładunki histonów umożliwiają ich silne, niekwalencyjne wiązanie z ujemnie naładowanymi resztami kwasu fosforowego szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA. Różna zawartość lizyny i argininy w histonach, a także proporcje zawartości aminokwasów kwaśnych do zasadowych pozwoliły wyróżnić 5 klas histonów: H2A, H2B, H3, H4, H1. Cztery pierwsze są określane mianem histonów rdzeniowych i występują w chromatynie w podobnych ilościach. Histony nie wykazują swoistości gatunkowej w odniesieniu do sekwencji aminokwasów. Określony organizm zwierzęcy ma zazwyczaj kilka różniących się histonów określonej klasy, ulegających ekspresji w różnych tkankach. Cechuje je także brak swoistości tkankowej. Ten wyraźny konserwatyzm sekwencji aminokwasowej histonów dowodzi ich zasadniczej roli w organizacji strukturalnej chromatyny. Histon H1 różni się od innych klas histonów nie tylko największą masą cząsteczkową, wynoszącą 23 kDa, ale również dużą różnorodnością sekwencji, zarówno u różnych gatunków, jak i w obrębie tego samego gatunku. Ponadto histon H1 najłatwiej można wyizolować z chromatyny, co świadczy o innej jego funkcji w porównaniu z histonami rdzeniowymi. Białka niehistonowe, których ilość jest zmienna i odnosi się do aktywności metabolicznej, cechuje duże zróżnicowanie własności fizykochemicznych. Grupa białek niehistonowych obejmuje także polipeptydy specyficzne dla tkanki, gatunku czy stanu czynnościowego jądra. W tej grupie wyróżnić można białka enzymatyczne – związane z syntezą i metabolizmem kwasów nukleinowych, oraz modyfikujące białka jądrowe, białka regulatorowe – zaangażowane w proces transkrypcji, a także białka strukturalne – wchodzące w interakcję z DNA i histonami, niewykazujące specyficzności tkankowej i gatunkowej.

Włókno nukleosomowe (nukleofilament)

Doświadczenia biochemiczne i badania ultrastrukturalne pozwoliły wyizolować i uwidocznić strukturę chromatyny. Trawienie preparatów swoistymi nukleazami mikrokokowymi hydrolizującymi wiązania fosfodiesterowe w kwasie nukleinowym doprowadziło do wyizolowania krótkich fragmentów (ok. 200 polinukleotydów) DNA związanych z białkami oraz łączących je odcinków DNA pozbawionych białka. Metodą łagodnej izolacji chromatyny w ME można uwidocznić podstawową strukturę chromatyny przypominającą sznur koralu (ryc. 1.6). Te koraliki połączone z DNA, który jest nawinięty na nie prawie dwukrotnie, są kompleksami DNA oraz histonów i noszą nazwę **nukleosomów**. Krótkie trawienie swoistymi nukleazami oddziela fragment helisy między poszczególnymi nukleosomami, tzw. **DNA łącznikowy**. Nukleosom zawiera dwuniciowy DNA o długości ok. 200 par zasad, który w postaci lewoskrętnej helisy tworzy 2 zwoje wokół oktameru histonów (H2A, H2B, H3, H4), określanych datego histonami rdzeniowymi. Przy dalszym trawieniu nukleazą uzyskuje się krótszy, ale silniej połączony z histonowym oktamerem fragment helisy o długości ok. 146 par zasad. Tworzy on razem z histonami **rdzeń nukleosomu**. Rdzeń nukleosomu ma wysoce konserwatywny charakter, w przeciwieństwie do tkankowo swoistego, łącznikowego DNA o różnej długości w chromatynie różnych tkanek, a nawet tej samej tkanki. Szczegółowa analiza rentgenograficzna wykazała, że nukleosom przyjmuje kształt spłaszczonego klinowato dysku o wysokości 5,7 nm i średnicy 11 nm. Na strukturę tę składają się tetramer złożony z histonów H3 i H4 oraz 2 dimery histonów H2A i H2B tworzące oktamer histonowy (ryc. 1.7b).

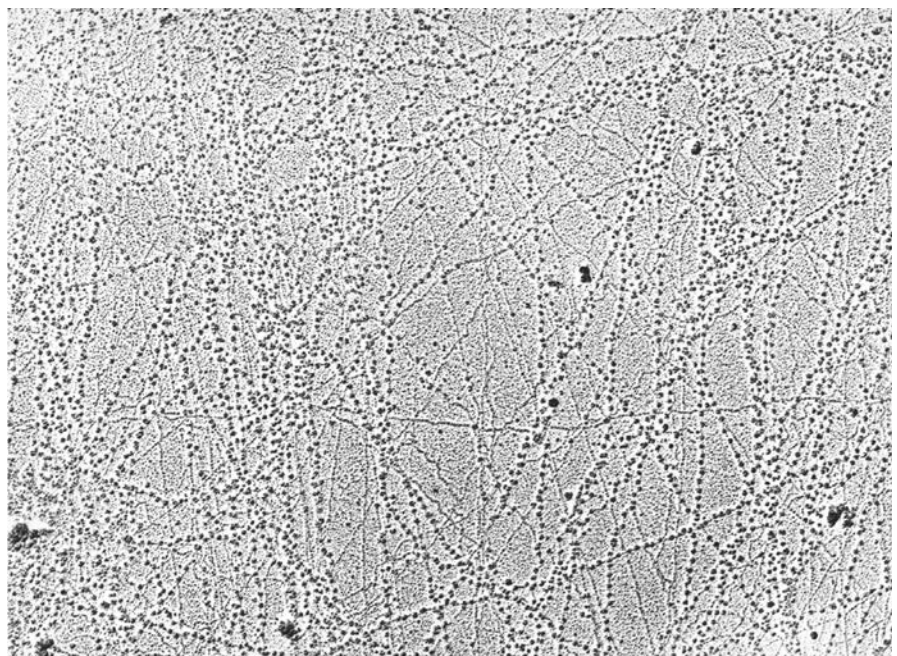
Na histony nawinięty jest lewoskrętnie, superhelikalnie DNA w formie B, tworząc 1,75 zwoju o średnicy 11 nm, licząc ok. 80 pnt (par polinukleotydów) na jeden zwój. Zwinięcie DNA na rdzeniu histonowym we włóknie 10 nm powoduje 7-krotne skrócenie DNA w nukleofilamencie. Podstawową funkcją nukleosomu jest udział w organizacji strukturalnej chromatyny. Poza upakowywaniem DNA w jądrze nukleosomy uczestniczą w regulacji tak istotnych procesów, jak transkrypcja i replikacja. W wyniku replikacji i transkrypcji zmienia się struktura przestrzenna nukleosomów. Proces ten jest związany z modyfikacją histonów, oddziaływaniem DNA z czynnikami transkrypcyjnymi oraz kompleksami polimeraz DNA i RNA. Włókno nukleosomowe, zwane także włóknem 10 nm, stanowi drugi poziom organizacji chromatyny (pierwszym jest podwójna helisa DNA).

DNA łącznikowy

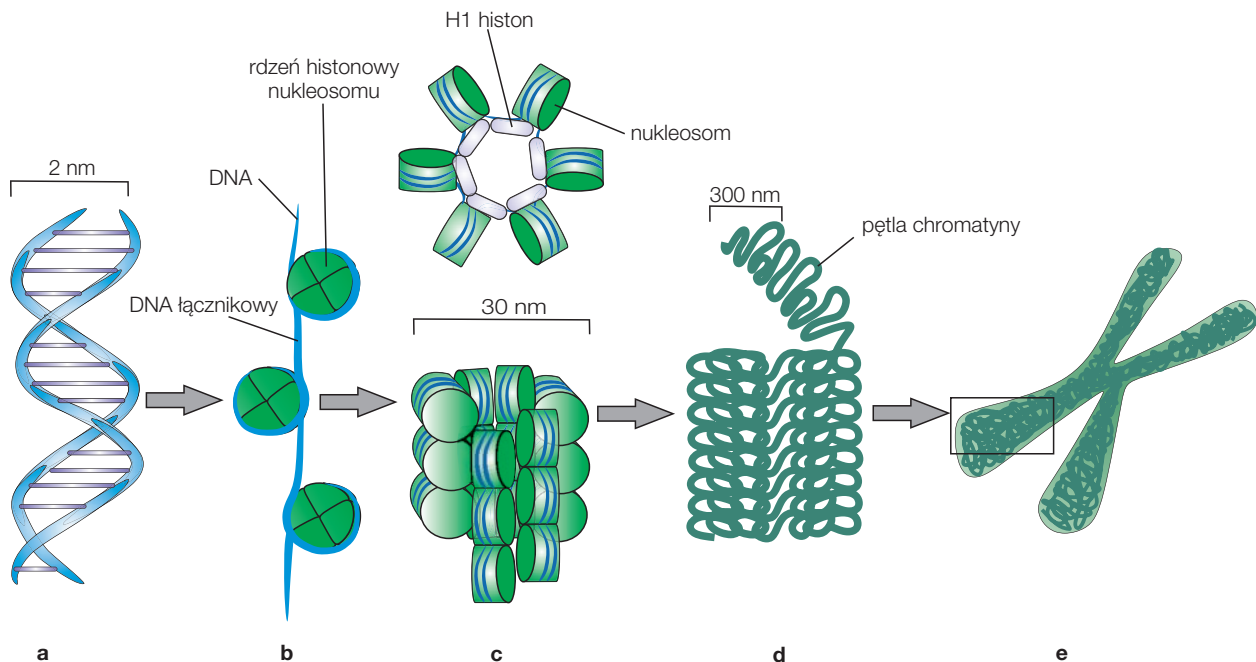
Są to krótkie odcinki podwójnego łańcucha DNA o grubości 1,5 nm i długości 20–95 polinukleotydów, łączące poszczególne nukleosomy i tworzące razem z nimi włókno nukleosomowe („sznur koralików” widoczny w ME) (ryc. 1.6). Długość DNA łącznikowego jest swoista dla różnych organizmów i różnych typów komórek.

Histon H1

Z nukleosomem i DNA związana jest swoista tkankowo cząsteczka histonu H1. Położona jest ona po tej samej stronie



Rycina 1.6 Włókna nukleosomowe w preparacie chromatyny rozproszonej metodą Millera (materiał własny autora).



Rycina 1.7 Budowa strukturalna chromatyny: **a.** Podwójna helisa DNA. **b.** Włókno nukleosomowe. **c.** Solenoid. **d.** Pętle, domeny. **e.** Chromosom (zmodyfikowane wg: B. Alberts).

nukleosomu, gdzie DNA rozpoczyna nawijanie na rdzeń histonowy i opuszcza nukleosom. Wobec niepełnych dwóch zwojów DNA wokół rdzenia histonowego nukleosomy wraz z DNA łącznikowym przyjmują charakterystyczne, widoczne na elektronogramach zygzakowate ułożenie (ryc. 1.7b). Histon H1, łącząc się z 10 parami nukleotydów DNA „wchodzącego” i „opuszczającego” nukleosom, chroni dodatkowo 20 par nukleotydów oraz cząstkę rdzeniową przed trawieniem nukleazą. Struktura chromatyny zawierająca cząstkę rdzeniową, histon H1 i chronione przez niego 20 pnt nosi nazwę **chromatosomu**.

Solenoid (włókno 30 nm)

Włókno 30 nm reprezentuje wyższy stopień upakowania chromatyny. Znajduje się zarówno w jądrach interfazalnych, jak i w chromosomach. Struktura włókna 30 nm powstaje w wyniku superspiralizacji podstawowego włókna nukleosomowego (nukleofilamentu), doprowadzając do utworzenia regularnej, pustej wewnątrz, helikalnej cewki, zwanej **solenoidem** (ryc. 1.7c). W solenoidzie o średnicy 30 nm włókno nukleosomowe jest zwinęte w lewoskrętną helisę, w której na jeden obrót przypada 6–8 nukleosomów. Skok spirali solenoidu wynosi 10 nm, podobnie jak średnica jej wewnętrznego otworu. Kluczową rolę w zwiększaniu stopnia upakowania włókna nukleosomowego w solenoid odgrywa histon H1, który umożliwia odpowiednie zwiniecie chromatyny w regularną strukturę solenoidu. Spłaszczone powierzchnie nukleosomów układają się równolegle do długiej osi sole-

noidu. Dalsze 7-krotne pozorne skrócenie włókna 30 nm, w porównaniu z włóknem nukleosomowym, powoduje, iż stopień upakowania DNA w strukturze solenoidu wynosi 40. W warunkach doświadczalnych zamiast cylindrycznych solenoidów włókna 30 nm można uzyskać globularne struktury określane jako superkoraliki (ang. *superbeads*), składające się z 12 ciasno upakowanych nukleosomów.

Pętle włókien chromatynowych (domeny)

Włókna chromatynowe o średnicy 30 nm, podlegając dalszej kondensacji, mogą tworzyć struktury chromatyny wyższego rzędu, określane mianem pętli – **domen**. Pętle są zakotwiczone w białkowym rusztowaniu macierzy jądrowej (białka NHP) lub w blaszce jądrowej. Pętle zawierają 60–100 tys. polinukleotydów, a ich długość wynosi ok. 0,5 μm . Obecność pętli w chromatynie interfazowej zwiększa jej współczynnik upakowania do ok. 1700. Najbardziej skondensowaną formę chromatyny reprezentuje chromosom metafazowy, w którym przy zachowanej strukturze włókna 30 nm współczynnik upakowania DNA wynosi ok. 10 000.

Strefa interchromatyny

W jądrze komórkowym można wyróżnić wiele strukturalno-czynnościowych domen. Ograniczona otoczką jądrową **nukleoplazma** tworzy wyraźnie oddzielony strukturalnie od cytoplazmy przedział związany z metabolizmem i replika-

cją DNA, syntezą i formowaniem RNA oraz syntezą białek. Uważana początkowo za strukturę amorficzną, dzięki wprowadzeniu mikroskopii elektronowej, nukleoplazma ujawniła różnorodne struktury ziarniste i włókniste, które są morfologicznymi wykładnikami poszczególnych etapów metabolizmu i transportu kwasów nukleinowych. W przestrzeni ograniczonej otoczką jądrową między skupieniami chromatyny skondensowanej, zwanej przestrzenią interchromatynową (IS), można oprócz jąderek wyróżnić:

- ziarna perychromatyny (PG),
- włókna perychromatyny (PF) związane z obrzeżami chromatyny skondensowanej (strefa perychromatyny),
- ziarna interchromatyny (IG),
- włókna interchromatyny (IF).

Najbardziej różnorodną morfologicznie, o niewyjaśnionej do końca funkcji, grupą struktur tworzących odrębną domenę strukturalno-czynnościową są ciała jądrowe (NB).

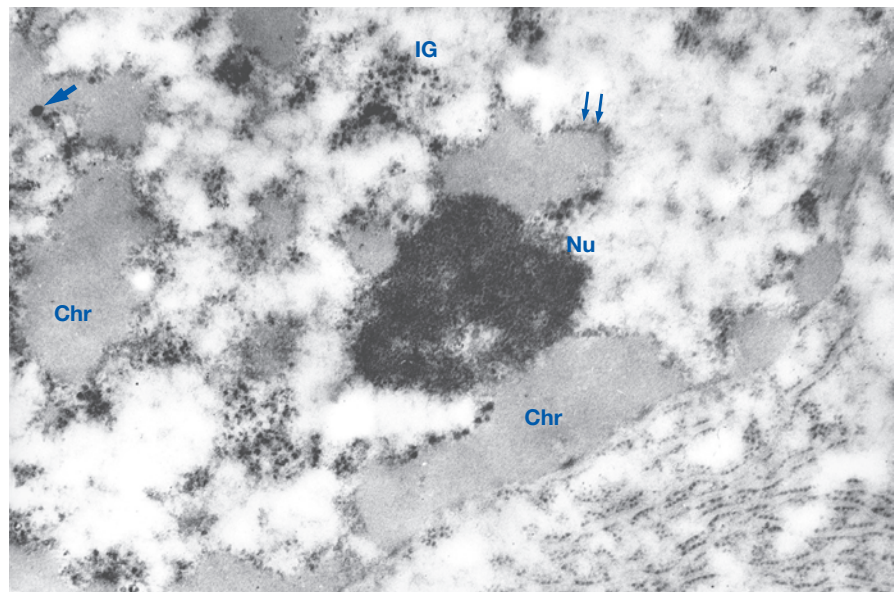
Ziarna perychromatyny

Ziarna perychromatyny są najwyraźniejszą strukturą strefy perychromatynowej, stanowiącej domenę jądra związaną z transkrypcją i formowaniem mRNA. Są to regularne, kuliste ziarna o wysokiej gęstości elektronowej i średnicy 40–50 nm, zlokalizowane w strefie brzeżnej skupień chromatyny skondensowanej (ryc. 1.8). Ziarna perychromatyny są najczęściej spotykane pojedynczo, chociaż w warunkach eksperymentalnych, po zahamowaniu transportu mRNA, dochodzi do ich nagromadzenia w jądrze. Pozwala to przypuszczać, iż struktury te reprezentują formę transportową pozajądrowego mRNA. Po zastosowaniu techniki części-

wego rozproszenia chromatyny można uwidocznic związek PG z chromatyną, z którą są połączone cienkim rybonukleoproteinowym włóknem. W pozajądrowych kompleksach transkrypcyjnych, uzyskanych po pełnym rozproszeniu chromatyny, ziarna te są widoczne na końcach transkryptów. Po rutynowym kontrastowaniu preparatów ziarna perychromatyny mają wokół wyraźne „halo”, pozwalające odróżnić je od otaczającej chromatyny. Składają się z cienkich włókien utworzonych przez rybonukleoproteidy. Związek niektórych niskocząsteczkowych RNA (U6snRNA) z ziarnami perychromatyny sprawia, iż postuluje się udział tych struktur w procesie składania mRNA.

Włókna perychromatyny

Włókna perychromatyny są zlokalizowane w strefie brzeżnej chromatyny skondensowanej w postaci dobrze kontrastujących się na tle przejaśnionej w barwieniu preferencyjnym z EDTA chromatyny. Włókienka są nieregularnie zwinięte i mają średnicę 3–4 nm. Zawierają heterogeny jądrowy RNA, będący prekursorem mRNA (pre-mRNA). Po stymulacji transkrypcji pozajądrowego RNA tworzy się wyraźna strefa zagęszczenia PF w postaci otoczki między chromatyną skondensowaną a przestrzenią interchromatynową. Zablockowanie transkrypcji hnRNA powoduje znikanie PF w strefie okołochromatynowej. Strefa brzeżna między chromatyną skondensowaną a przestrzenią interchromatynową jest więc poza jądrem najbardziej aktywną czynnościowo domeną jądra. Intensywność syntezy pozajądrowego, heterogennego RNA zawartego we włóknach perychromatyny jest ściśle skorelowana z szerokością strefy zagęszczeń, odpowiadającej nagromadzeniu włókien perychromatyny.



Rycina 1.8 Struktura strefy perychromatynowej: gruba strzałka – ziarna perychromatyny, dwie cienkie strzałki – włókna perychromatyny, Chr – chromatyna skondensowana (przejaśniona po zastosowaniu związku chelatującego – EDTA), Nu – jądro, IG – ziarna interchromatyny (ME, autor S. Orkisz).

Zastosowanie techniki autoradiografii na poziomie ME oraz rozproszenia chromatyny do uwidocznienia kompleksów transkrypcyjnych pozwoliło ustalić, iż włókna perychromatyny reprezentują cząsteczki RNP przyłączone do matrycy DNA w przebiegu transkrypcji (odpowiadają pozajądrowym kompleksom transkrypcyjnym).

Ultrastruktura pozajądrowych kompleksów transkrypcyjnych

Morfologia pozajądrowych kompleksów transkrypcyjnych, będących obrazem genów hnRNA „w czasie pracy”, różni się wyraźnie od aktywnych genów jąderkowych (rDNA). W przeciwieństwie do jąderkowych kompleksów transkrypcyjnych rozmieszczenie RNP (transkryptów) przyłączonych do osi DNA jest nieregularne (ryc. 1.9). Transkrypty nie mają charakterystycznej wzrastającej długości, jak w aktywnych genach rDNA, co nie pozwala na określenie kierunku transkrypcji. U podstawy transkryptów są widoczne wyraźne cząsteczki Pol II RNA (ryc. 1.9a – strzałka), a obecne niekiedy na końcach transkryptów granule odpowiadają wielkością GP i reprezentują prawdopodobnie zwiniętą formę transportową pre-mRNA.

Włókna interchromatyny

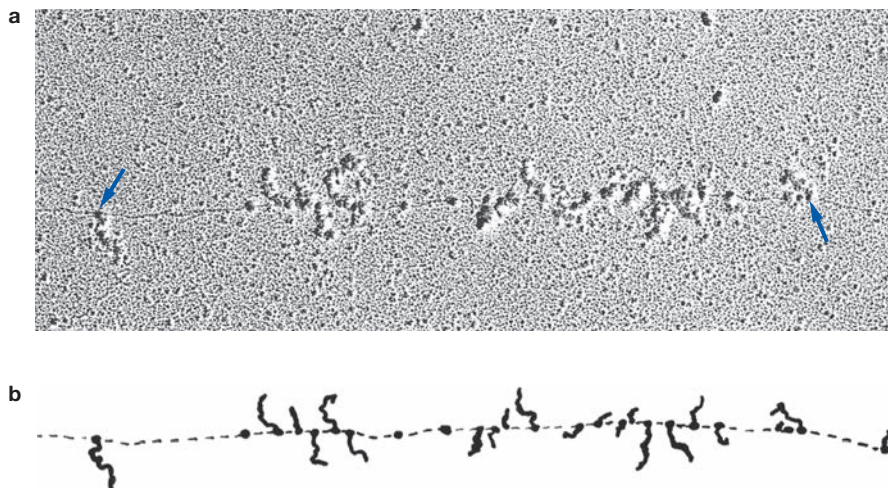
Włókna interchromatyny, wykryte najpóźniej ze wszystkich struktur RNP przestrzeni interchromatynowej, mogą być uwidocznione w kontrastowaniu preferencyjnym z EDTA oraz po zastosowaniu autoradiografii wysokorozdzielczej. Reprezentują morfologiczny wykładnik transportu PF w nukleoplazmie i korespondują z izolowanymi cząsteczkami hnRNP w czasie ich migracji w przestrzeni interchromatynowej.

Ziarna interchromatyny

Ziarna interchromatyny są stałym składnikiem przestrzeni interchromatynowej jądra komórkowego. Występują w postaci większych lub mniejszych skupień o nieregularnym kształcie ziaren o średnicy 20–25 nm. Ziarna są zbudowane z delikatnie poskręcanych włókienek oraz połączone między sobą włóknami, przez co przypominają luźną sieć. Zwraca uwagę tendencja do skupiania się IG w komórkach nowotworowych oraz traktowanych różnymi związkami (m.in. karcynogenami), a także w komórkach zakażonych wirusami. Zmienia się również ich rozmieszczenie w nukleoplazmie podczas kondensacji i dekondukcji chromatyny. Mimo licznych badań doświadczalnych ich funkcja pozostaje niewyjaśniona. Ziarna interchromatyny zawierają prawdopodobnie RNA o powolnym metabolizmie, a także klasę niskocząsteczkowych RNA (snRNA). Obecność w IG białek, wykrywanych także w składnikach jąderka (rybocharyny), wskazuje na związek metaboliczny tych struktur. Wśród hipotetycznych funkcji ziaren interchromatynowych, obok ich powiązania z metabolizmem RNA, podkreśla się ich związek z macierzą jądrową i znaczenie w tworzeniu architektury przestrzeni interchromatynowej.

Ciała jądrowe

Ciała jądrowe są niejednorodną grupą struktur przestrzeni interchromatynowej o różnorodnej ultrastrukturze i wciąż nieznaną funkcji. Ich wielkość waha się w szerokich granicach, od 0,2 do kilku μm w zależności od ich budowy ultrastrukturalnej. Zazwyczaj są zbudowane z delikatnej fibrylarnej otoczki oraz zawartego wewnątrz ziarnistego rdzenia. W powszechnie stosowanej klasyfikacji wyróżnia się 5 typów morfologicznych ciałek jądrowych.



Rycina 1.9 Pozajądrowe kompleksy transkrypcyjne: **a.** Ultrastruktura. **b.** Pozajądrowy kompleks transkrypcyjny uwidoczniiony po pełnym rozproszeniu chromatyny techniką Millera (ME, autor S. Orkisz).

Odrębną grupę ciałek jądrowych stanowią tzw. **ciałka zwinięte** (ang. CB, *coiled bodies*) (odkryte przez Santiago Ramóny Cajala, laureata Nagrody Nobla z 1906 r.). Wykryto w nich: proteiny antygenu Sm, fibrylarynę, p80 koilinę, topoizomerazę I DNA oraz różne składniki **spliceosomów**, struktur zawierających pakiet małych jądrowych RNA (U1, U2, U4, U5/U6) oraz biorących udział w składaniu mRNA (zob. podrozdz. *Odczytywanie informacji genetycznej*). Prawdopodobnie ciałka jądrowe są wielofunkcyjnymi strukturami związanymi z magazynowaniem, degradacją lub transportem składników związanych zarówno z pre-mRNA, jak i pre-rRNA.

Przestrzeń interchromatynowa jest więc tą domeną jądra komórkowego, w której odbywa się proces przetwarzania, dojrzewania i składania pre-mRNA oraz transport pre-mRNA z miejsc syntezy przez przestrzeń interchromatynową w kierunku kompleksu porów jądrowych. Procesy te mają swoje wykładniki ultrastrukturalne w postaci wyżej opisanych struktur włóknistych i ziarnistych przestrzeni interchromatynowej.

Jąderko – struktura i funkcja

Jąderka są nieoblionionymi strukturami jądra o sferycznym kształcie, zajmującymi zasadniczą część nukleoplazmy, zwłaszcza w komórkach syntetyzujących duże ilości białka. Są wysoce dynamicznymi strukturami, zmieniającymi się w cyklu komórkowym. Znikają w profazie mitozy i odtwarzają się w telofazie w miejscu przewężenia wtórnego, stanowiącego swoisty region chromosomu, zwany okolicą jąderkotwórczą lub **NOR** (ang. *nucleolar organizing region*). Liczba obszarów jąderkotwórczych oraz ich rozmieszczenie na chromosomie są cechami charakterystycznymi dla każdego gatunku. U człowieka obszary jąderkotwórcze są związane z pięcioma parami chromosomów akrocentrycznych: trzema z grupy D – 13, 14, 15 oraz 21 i 22 z grupy G. Ponieważ zmiany w ultrastrukturze jąderka mogą być interpretowane w odniesieniu do metabolizmu komórki, jąderko jest jednym z najlepszych modeli badania związku struktury i funkcji na poziomie molekularnym. Jąderko jest miejscem biogenezy rybosomów. Jest to złożony proces, mający swoje odzwierciedlenie w jego organizacji ultrastrukturalnej.

Składniki jąderka

W obrazach ME można wyróżnić 5 podstawowych składników ultrastrukturalnych aktywnego transkrypcyjnie jąderka. Są to:

1. **ośrodki włókniste** (ang. FC – *fibrillar centers*),
2. **gęsty składnik włóknisty** (ang. DFC – *dense fibrillar component*),
3. **składnik ziarnisty** (ang. GC – *granular component*),

4. **chromatyna związana z jąderkiem** (ang. NAC – *nucleolar associated chromatine*),
5. **wakuole jąderkowe** (ang. NV – *nucleolar vacuoles*).

Trzy pierwsze z ww. składników mają podstawowe znaczenie dla funkcji jąderka ze względu na zawartość RNP.

Ośrodki włókniste

Ośrodki włókniste są interfazalnym odpowiednikiem NOR. Nazwa tego składnika podkreśla jego centralne położenie w jąderku oraz jego włóknistą naturę. Ośrodki są utworzone bowiem z delikatnego, luźnego materiału włóknistego o niewielkiej gęstości elektronowej i otoczone najczęściej strefami gęstego składnika włóknistego. W ośrodkach włóknistych zlokalizowane są geny kodujące rRNA.

Gęsty składnik włóknisty (DFC)

Gęsty składnik włóknisty jest utworzony z włókien o średnicy 4–5 nm i długości dochodzącej do 50 nm. Fibryle te są gęsto upakowane w pasma często otaczające ośrodki włókniste, sugerując związek funkcjonalny między tymi dwoma strukturami jąderkowymi. DFC zawiera 45S pre-rRNA.

Składnik ziarnisty jąderka (GC)

Składnik ziarnisty jąderka tworzą ziarna o średnicy 15–20 nm w postaci pól często wymieszanych z DFC. Większe powiększenia ujawniają włóknistą naturę ziaren jąderkowych, a porównawcze badania biochemiczne i ultrastrukturalne pozwoliły zlokalizować w nich 28S pre-rRNA. Z licznych badań doświadczalnych wynika, iż synteza pre-rRNA odbywa się między chromatyną wewnątrzjąderkową a DFC jąderka. Migracja zsyntetyzowanego *de novo* pre-rRNA ze strefy DFC do GC jąderka wskazuje, iż DFC jest morfologicznym prekursorem granul jąderkowych. Transformacja gęstego składnika włóknistego w składnik ziarnisty odzwierciedla zatem proces dojrzewania pre-rRNA.

Typy strukturalno-czynnościowe jąderek

Intensywność transkrypcji pre-rRNA ma swój wyraz nie tylko w proporcjach podstawowych składników ultrastrukturalnych jąderka, ale także w ich rozmieszczeniu. Uwzględniając te dwa kryteria, można wyróżnić następujące typy jąderek:

1. **jąderka uformowane w nukleolonemę** (jąderka gąbczaste) – aktywne transkrypcyjne jąderka, w których struktury RNP tworzą luźną gąbczastą strukturę; spostrzegane w większości komórek syntetyzujących jąderkowy RNA;

2. **jąderka zwarte** – cechują się jednolitym ciasnym ułożeniem włókien i ziaren jąderkowych, najczęściej wymieszanych; są aktywne transkrypcyjnie i najłatwiej je uwidocznić w jądrach młodych, szybko rosnących komórek;
3. **jąderka zwarte z segregacją składników** – ten typ jąderka jest morfologicznym wyrazem zahamowania syntezy rRNA wywołanej różnymi czynnikami chemicznymi lub fizycznymi; poszczególne składniki RNP jąderka tworzą wyraźnie oddzielone od siebie strefy;
4. **jąderka pierścieniowate** – charakteryzują się obwodowym rozmieszczeniem składników RNP; nieliczne struktury RNP są widoczne w części środkowej jąderka; reprezentują zupełne zahamowanie syntezy RNA lub jej bardzo wolny przebieg, ale stan ten może być odwracalny;
5. **mikrojąderka** (jąderka resztkowe) – są morfologicznym odzwierciedleniem zahamowania syntezy RNA; najczęściej widoczne w komórkach starych, degenerujących.

Związek struktury i funkcji jąderka podkreślają charakterystyczne zmiany morfologii widoczne w patologii jądra. Należą do nich **segregacja jąderkowa** lub **degranulacja** wywołane zahamowaniem transkrypcji lub dojrzewania rRNA. Zaburzenia metabolizmu rRNA są wywoływane przez różnorodne czynniki fizyczne i chemiczne, np. promieniowanie jonizujące, aktynowymyconę D, szok hipertoniczny, niektóre leki.

Odczytywanie informacji genetycznej

W DNA jest zapisana zakodowana w sekwencji nukleotydów informacja dotycząca białek zarówno strukturalnych, jak i czynnościowych, różnych klas RNA oraz sekwencji regulacyjnych poszczególnych genów. Ekspresja tej informacji odbywa się dwuetapowo. Pierwszy etap (po rozpleceniu helisy) obejmuje przepisanie sekwencji nukleotydów DNA na **informacyjny RNA** (ang. mRNA – *messenger RNA*), nosi nazwę **transkrypcji** i odbywa się w obszarze jądra komórkowego. W następnym etapie, odbywającym się w cytoplazmie, kolejność nukleotydów mRNA zostaje przetłumaczona na sekwencję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Ten proces nosi nazwę **translacji** i zachodzi na rybosomach z udziałem tRNA, rRNA i białek.

Transkrypcja RNA

Jest procesem enzymatycznej syntezy RNA odbywającym się na matrycy DNA. DNA determinuje kolejność umiejscawiania się poszczególnych rybonukleotydów w łańcuchu polinukleotydowym. Deoksyrybonukleotydów ATCG w DNA odpowiadają więc w nici RNA rybonukleotydy UAGC. Zasadniczymi enzymami przeprowadzającymi transkrypcję są polimerazy RNA:

- Pol I – zlokalizowana w jąderku, uczestniczy w transkrypcji sekwencji dla rRNA,
- Pol II – w nukleoplazmie, syntetyzuje pre-mRNA,
- Pol III – również w nukleoplazmie, uczestniczy w transkrypcji pre-tRNA i 5 sRNA.

W procesie transkrypcji obok polimeraz uczestniczy na poszczególnych jej etapach wiele białek pomocniczych. W wyniku transkrypcji powstają długie łańcuchy RNA, tzw. **transkrypty**. Transkrypty jako cząsteczki prekursorowe podlegają modyfikacjom w **procesie dojrzewania** (ang. *processing*).

Etapy transkrypcji

W przebiegu transkrypcji wyróżnia się kilka etapów:

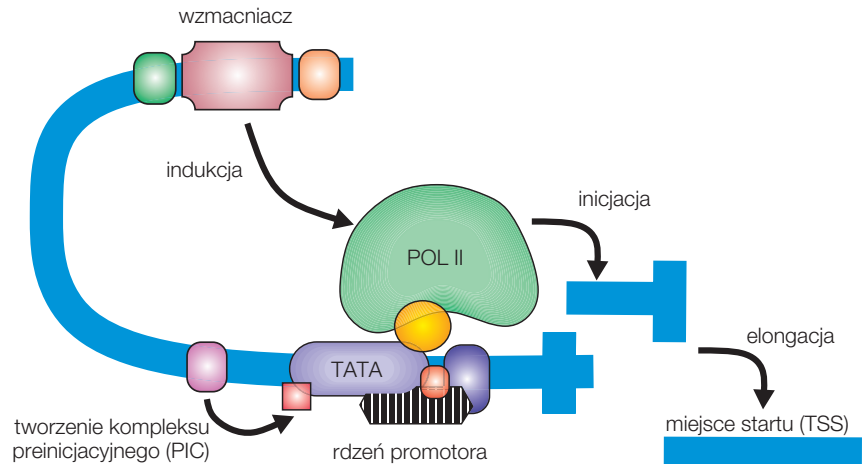
I ETAP – wiązanie Pol przez matrycę; do prawidłowego przebiegu procesu wiązania polimerazy z matrycą niezbędne są dodatkowe białka, związane **czynnikami transkrypcyjnymi** (ang. TF, *transcription factor*). Stanowią one dużą grupę czynników białkowych przypisanych do określonej polimerazy (I, II lub III) oraz odpowiednio oznaczonych: A, B, C, D; np. TF IIC. Polimeraza II syntetyzuje także niskocząsteczkowe RNA (snRNA) niezbędne do usuwania intronów z pierwotnych transkryptów. W pierwotnym transkrypcie pre-mRNA na końcu 5' znajduje się struktura, tzw. czapeczka, utworzona przez GTP.

II ETAP – inicjacja transkrypcji – odbywa się w miejscu startu transkrypcji (ang. TSS, *transcriptional start site*), przylegającym do obszaru regulatorowego zwanego promotorem. Jest to sekwencja składająca się z kilkudziesięciu do ok. 200 nukleotydów, zawierająca charakterystyczną sekwencję TATA. Rdzeń promotora zawiera miejsca wiązania elementów maszyny transkrypcyjnej. Wyspecjalizowane czynniki transkrypcyjne rdzenia promotora, ulokowane w pobliżu sekwencji TATA, indukują tworzenie **kompleksu preinicjacyjnego** (ang. PIC, *preinitiation complex*) (ryc. 1.10). W regulacji transkrypcji, jej szybkości oraz czasu trwania uczestniczą regiony regulacyjne nasilające ten proces, zwane **wzmacniaczami** (ang. *enhancers*), oraz osłabiające, zwane **wyciszaczami** (ang. *silencer*). Aktywacja sekwencji wzmacniacza w wyniku interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi przemieszcza go w pobliżu rdzenia promotora, uruchamiając transkrypcję.

III ETAP – to proces elongacji, czyli wydłużania się łańcucha polinukleotydowego, w czasie którego powstają kolejne wiązania fosfodwuestrowe między nukleotydami.

IV ETAP – zakończenie transkrypcji. Sygnałem do zakończenia transkrypcji są charakterystyczne sekwencje AAUAAA odczytywane przez polimerazę. 10–30 nukleotydów za nimi w kierunku końca 3' znajduje się miejsce poliadenylacji, czyli miejsce przyłączenia sekwencji poli A.

Rycina 1.10 Struktura i mechanizm działania kompleksu transkrypcyjnego. TSS (*transcriptional start site*) – miejsce startu transkrypcji, PIC (*pre-initiation complex*) – kompleks preinicjacyjny.



Dojrzewanie RNA – *splicing RNA*

Łańcuch nowo zsyntetyzowanego informacyjnego RNA, tzw. **heterogennego RNA** (hnRNA, ang. *heterogeneous RNA*), w czasie transportu w nukleoplazmie podlega wielu modyfikacjom. Pierwotna długa cząsteczka pre-mRNA, powstała na matrycy DNA, jest wierną kopią zarówno sekwencji ulegających ekspresji, czyli **eksonów** (sekwencji obecnych zarówno w DNA, jak i w dojrzałym mRNA), jak i intronów, czyli sekwencji obecnych w łańcuchu DNA i pierwotnym transkrypcie, a wycinanych w procesie dojrzewania pre-mRNA. W procesie dojrzewania RNA (ang. *splicing*) z pierwotnego transkryptu są usuwane introny, a połączone eksony tworzą ciągłą sekwencję mRNA. W komórkach eukariotycznych w złożony i precyzyjny proces usuwania intronów i dojrzewanie RNA jest zaangażowanych bardzo wiele białek oraz niskocząsteczkowe RNA. Tworzą one maszynę zwaną **spliscesomem**, odnajdującą miejsce cięcia łańcucha pre-mRNA oraz przeprowadzającą wycinanie intronów. Kompleks małych, jądrowych RNP (U1, U2, U4/U6 snRNP) rozpoznaje i zbliża do siebie końce intronów. Połączone introny tworzą strukturę przypominającą lasso, która jest wycinana i degradowana. W końcowej fazie dojrzewania dochodzi do kowalencyjnego połączenia końców eksonów w ciągły łańcuch mRNA (ryc. 1.11). W czasie dojrzewania hnRNA zachodzą modyfikacje potranskrypcyjne obu końców pre-mRNA. Modyfikacja końca 5' jest wieloetapowym procesem, w wyniku którego do mRNA jest przyłączany metylowany oligonukleotyd, zwany **kapturkiem** lub **czapeczką**, z charakterystyczną obecnością 7-metyloguanozyny. Na przeciwnym 3' końcu pre-mRNA odbywa się proces poliadenylacji, czyli przyłączenia sekwencji poliadenylowej o długości 50–250 reszt adenylowych. Sygnałem do tej modyfikacji jest sekwencja AAUAA znajdująca się w regionie końcowym.

Modyfikacje potranskrypcyjne w procesie dojrzewania pierwotnego transkryptu umożliwiają jego przemieszczenie

z jądra do cytoplazmy (ryc. 1.11) oraz odczytanie na rybosomach zawartej w nim informacji genetycznej.

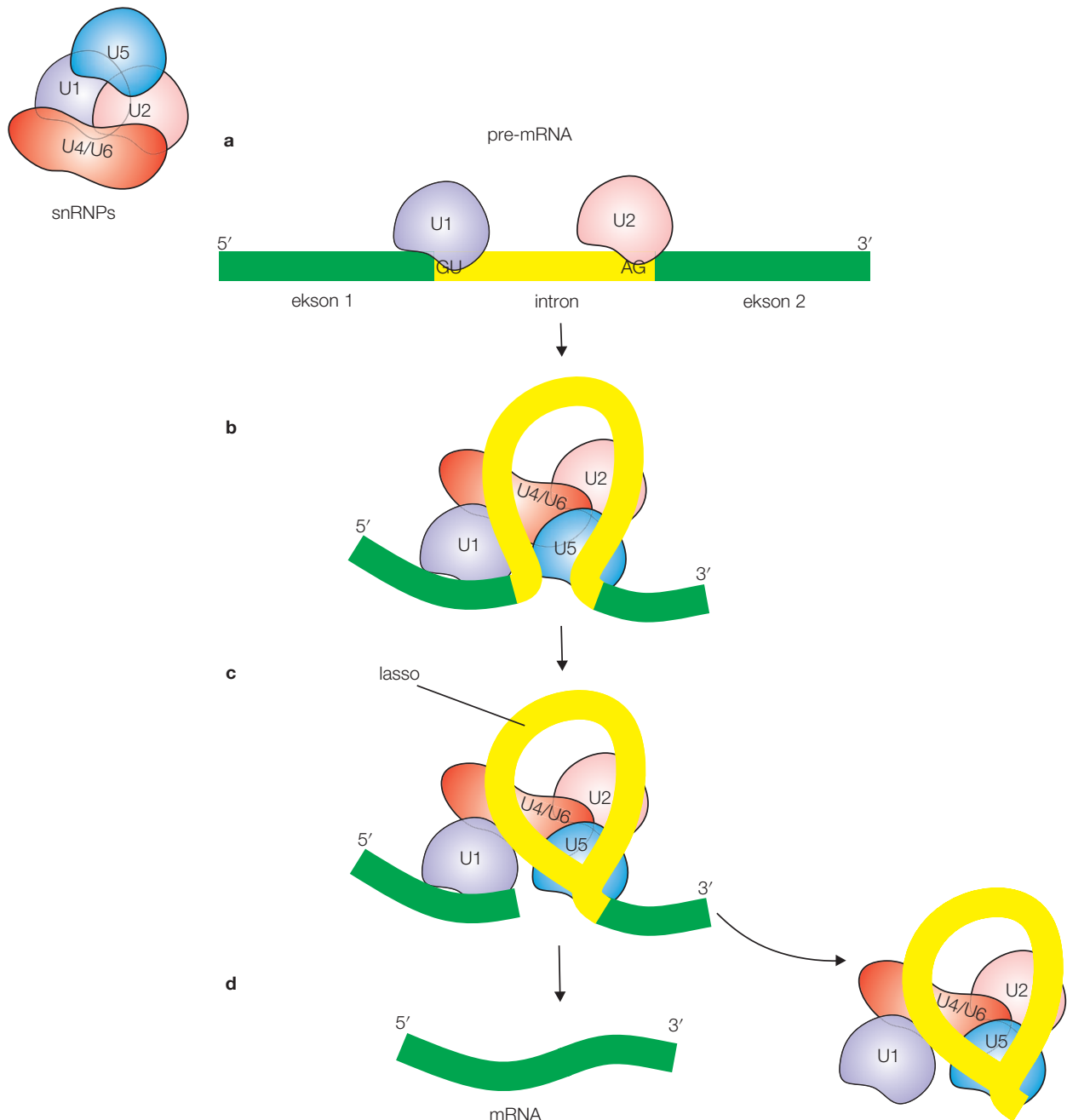
Redagowanie RNA

Przynajmniej niektóre transkrypty mogą podlegać procesowi redagowania. Podczas tego procesu transkrypt traci albo zwiększa liczbę nukleotydów. Proces ten postępuje od końca 3' w kierunku 5'. W jego wyniku mogą powstać nowe ramki odczytu, obejmujące trójki nukleotydów kodujące inne aminokwasy, w zależności od którego nukleotydu rozpocznie się proces odczytywania informacji. W redagowaniu RNA uczestniczą krótkie, tzw. **korygujące sekwencje RNA** (ang. *guide RNA, gRNA*). Redagowanie RNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów.

Biogeneza rybosomów

Lokalizacja transkrypcji

Podstawowa funkcja jąderka jest związana z syntezą rRNA. W tej powszechnie występującej w komórkach eukariotycznych organeli komórkowej odbywa się transkrypcja prekursorów rRNA, ich dojrzewanie związane z obróbką pierwotnych transkryptów, tworzenie RNA jądrowych oraz pierwsze etapy transportu podjednostek rybosomów do cytoplazmy. O dużym zapotrzebowaniu komórek eukariotycznych świadczy liczba kopii genów kodujących rRNA (rDNA) w jądrze, która może sięgać nawet do 10 000. W komórkach wątrobowych człowieka znajduje się kilkaset kopii genów rRNA. Od chwili wykrycia strukturalnej ciągłości między chromatyną wewnątrzjąderkową a ośrodkami włóknistymi obecność rDNA w tych strukturach jąderka jest dobrze udokumentowana. Również organizacja genów kodujących rRNA jest dobrze poznana (ryc. 1.12).



Rycina 1.11 Mechanizm dojrzewania mRNA: **a.** Pre-mRNA. **b.** Spliceosom odnajduje miejsca cięcia między eksonem a intronem. **c.** Zbliżanie końców i wycinanie intronu. **d.** Połączenie eksonów w ciągłym mRNA, usunięcie i degradacja intronu (zmodyfikowane wg B. Alberts).

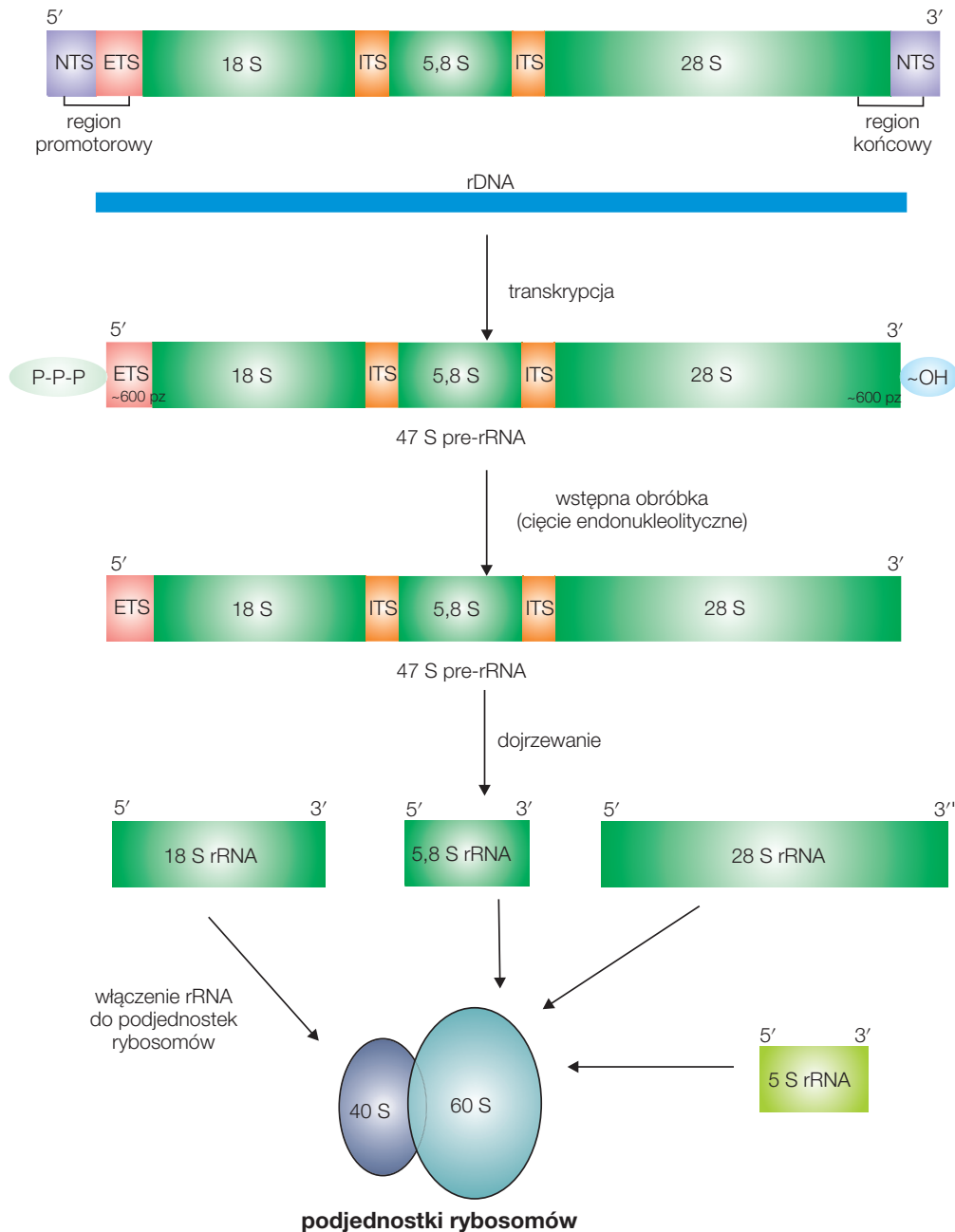
Struktura rDNA

Na rycinie 1.12 przedstawiono strukturę genu rDNA oraz proces dojrzewania 45S prerybosomalnego prekursora dla trzech sekwencji kodujących rRNA (18S, 5,8S oraz 28S RNA). Wspólna jednostka transkrypcyjna rDNA zawiera 3 rodzaje sekwencji nukleotydowych:

1. sekwencje transkrybowane i obecne w dojrzałym rRNA,

2. sekwencje nietranskrybowane (ang. NTS, *non-transcribed spacers*) rozdzielające poszczególne jednostki transkrypcyjne w tandemach,

3. sekwencje transkrybowane i obecne w pierwotnym transkrypcie, które zostają wycięte podczas wstępnej obróbki w procesie dojrzewania; są to wewnętrzne sekwencje transkrybowane (ang. ITS, *internal transcribed spacers*) i zewnętrzne sekwencje transkrybowane (ang. ETS, *external transcribed spacers*).



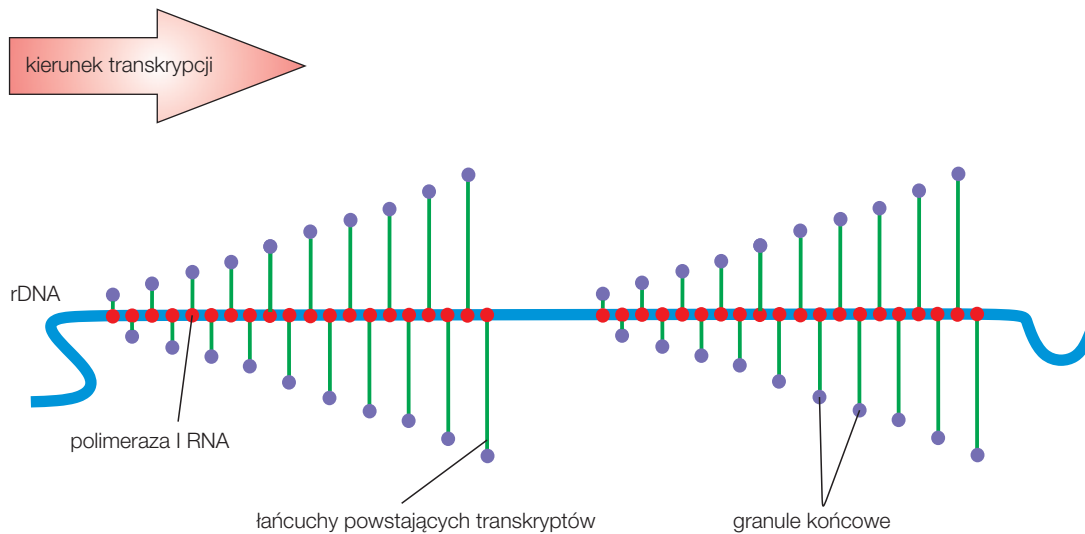
Rycina 1.12 Struktura genu rDNA (zmodyfikowane wg B. Alberts).

Sekwencje kodujące rRNA oraz ITS i ETS tworzą jednostkę transkrypcyjną. W obrębie NTS są zlokalizowane sekwencje regulujące funkcję rDNA. Jak wspomniano, synteza pre-rRNA odbywa się między chromatyną wewnątrzjąderkową a DFC jąderka. Gęsty składnik włóknisty jąderka zawiera 45S pre-rRNA o długości 14 kz. Z analizy cytochemicznej DFC wynika, iż prekursorowa cząsteczka rRNA odpowiada jednostce transkrypcyjnej uwidocznionej po rozproszeniu chromatyny (zob. dalej). W GC zawarty jest natomiast 28S pre-rRNA. Składnik DFC i GC jąderka reprezentują więc

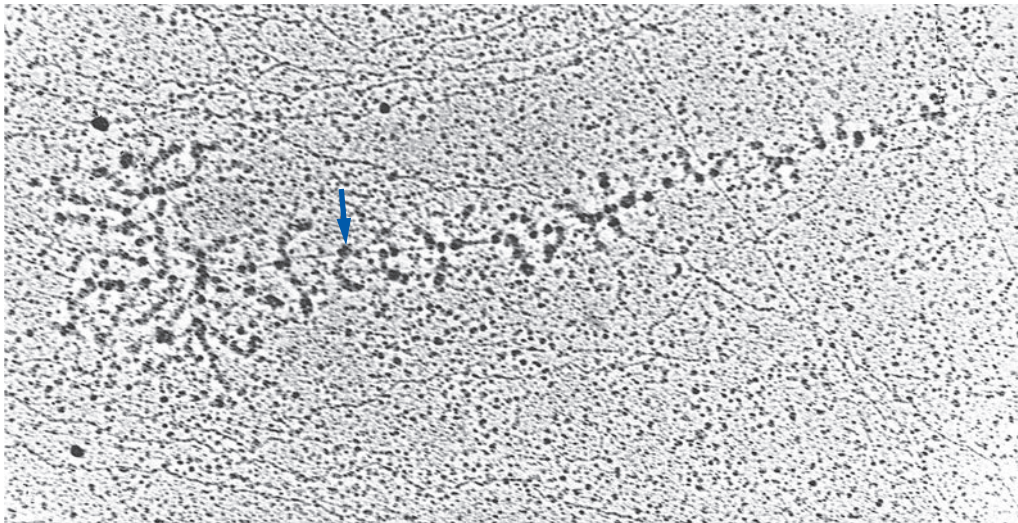
kolejne stadia tworzenia prerybosomów, odzwierciedlając w transformacji DFC w GC proces dojrzewania pre-rRNA.

Morfologia aktywnych genów rybosomowych

Ze względu na charakterystyczny wygląd przypominający gałęzie choinki kompleksy transkrypcyjne reprezentujące aktywne geny rybosomalne nazwano „choinkami” (ang. *christmas tree-like*). Kompleksy te (ryc. 1.13 i 1.14):



Rycina 1.13 Struktura rybosomowych kompleksów transkrypcyjnych.



Rycina 1.14 Ultrastruktura jądkowego kompleksu transkrypcyjnego po pełnym rozproszeniu chromatyny (ME, autor S. Orkisz).

- często są ułożone tandemowo i przedzielone sekwencjami nieprzepisywanymi,
- osią kompleksu jest włókno DNA, gęsto pokryte włóknkami prostopadle do niego ustawionymi i reprezentującymi transkrypty,
- u podstawy każdego wzrastającego transkryptu jest widoczna cząsteczka Pol I RNA (strzałka na ryc. 1.14),
- transkrypty mają wzrastającą długość w kierunku transkrypcji (od końca 5' do 3'),
- koniec wolny każdego transkryptu tworzą granule końcowe (*terminal knob*) reprezentujące zwinięty świeżo powstały transkrypt.

Z wyżej przedstawionych obrazów ultrastrukturalnych „genów w czasie pracy” wynika, że każdy kompleks transkrypcyjny obejmuje fragment DNA z przyczepionym świeżo powstałym transkryptem w postaci fibryli oraz znajdujące się u ich podstawy cząsteczki polimerazy I RNA (zob. ryc. 1.14 – strzałka).

Jednostki transkrypcyjne zawierają zarówno sekwencje nieobecne w dojrzałym rRNA, jak i występujące w nim (18S rRNA, 5,8S rRNA i 28S rRNA). Po transkrypcji w czasie dojrzewania pre-rRNA cząsteczka 45S łączy się z białkami rybosomowymi, tworząc kompleks RNP, z którego w wielu następnych modyfikacjach potranskrypcyjnych w obszarze

jądra powstają podjednostki rybosomów (małe 40S i duże 60S). Po ich przeniesieniu przez nukleopory do cytoplazmy tworzą rybosomy. Biogeneza rybosomów jest więc bardzo dobrą ilustracją związków struktury i funkcji jąderka na poziomie submikroskopowym.

PIŚMIENNICTWO

Alberts B., Bray D.: *Podstawy biologii komórki.*, PWN, wyd. II, Warszawa 2016, rozdz. 6. *Replikacja, naprawa i rekombinacja DNA*, 196–214.
Chandar N., Viselli S.: *Lippincott's Illustrated Reviews: Cell and Molecular Biology, Unit II – Organization of the Eukaryotic Genome and Gene Expression*, Wolters Kluwer, Philadelphia, 2019, 77–91.

Grünwald D., Singer R., Rout M.: *Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes*. *Nature*, 2011, vol. 475, 333–341.
Hernandez-Verdun D.: *Nucleolus: from structure to dynamics*. In: *Histochemistry and cell biology*, Springer, Berlin, 2006, 125, 127–137.
Kłyszajko-Stefanowicz L.: *Cytobiochemia*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2002, cz. III. *Jądro komórkowe i jego macierz*, 287–461.
Pance A.: *Tailoring the Models of Transcription*. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 7583–7597.
Sekimoto T., Yoneda Y.: *Intrinsic and extrinsic negative regulator of nuclear protein transport processes*. *Genes to Cells*, 2012, 17, 525–535.
Trzeciak A., Błasiak J.: *Naprawa DNA w komórkach ssaków*. *Post. Biol. Kom.* 1999, 26, 4, 707–729.
Węgleński P.: *Genetyka molekularna*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2012, wyd 6, rozdz. 2. *Struktura, replikacja i naprawa materiału genetycznego*.

PYTANIA

- Topoizomerazy podczas replikacji eukariotycznego DNA:
 - Katalizują syntezę starterów (*primer*) na nici opóźnionej.
 - Usuwną nieprawidłowo sparowane nukleotydy dzięki aktywności 3' do 5' egzonukleazy.
 - Stabilizują jednoniciowy DNA w obrębie widełek replikacyjnych.
 - Wycinają i ponownie łączą DNA przed widełkami replikacyjnymi, aby wyeliminować superskręcenie.
 - Dodają nukleotydy do wzrastającej nici w kierunku 5' do 3'.
- Która z niżej wymienionych funkcji związana jest z eukariotyczną polimerazą DNA podczas replikacji DNA?
 - Ciągła synteza 5' do 3' DNA na nici opóźnionej.
 - Formowanie widełek replikacyjnych zależne od energii.
 - Korygowanie nowo syntetyzowanego DNA.
 - Nieciągła synteza 5' do 3' DNA na nici opóźnionej.
 - Usuwanie starterów przy użyciu aktywności 5' do 3' egzonukleazy.
- Nieprawidłowa naprawa niezgodności DNA może skutkować rozwojem:
 - HNCC – *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*.
 - Raka skóry.
 - Oparzeniami słonecznymi.
 - Uszkodzeniami wywołanymi przez światło UV.
 - Xeroderma pigmentosum*.
- U sześciolatka płci męskiej występuje światłoczułość i liczne guzy skóry. Który z poniższych typów uszkodzenia DNA jest **najbardziej prawdopodobny** w tych warunkach?
 - Uszkodzenie dwuniciowego DNA.
 - Dezaminacja cytozyn.
 - Niedopasowanie par zasad.
 - Dimery tyminy.
 - Depurynowany DNA.
- Wskaż **nieprawdziwe** stwierdzenie dotyczące jąderka:
 - Zmienia swoją strukturę w cyklu komórkowym.
 - U człowieka związane jest z chromosomami akrocentrycznymi grupy G i D.
 - W ośrodkach włóknistych zawiera geny kodujące mRNA.
 - Najczęściej posiada także składnik ziarnisty.
 - Obecność jąderka zwartych cechuje młode, szybko rosnące komórki.

SEMINARIA Z CYTOFIZJOLOGII

dla studentów medycyny, weterynarii i biologii

Siedem lat, które upłynęły od ostatniego wydania *Seminariów z cytofizjologii*, to w nauce biologii komórki olbrzymi postęp wiedzy. Do przygotowania wydania obecnego konieczne więc było gruntowne uzupełnienie i nowocześnieenie przedstawianych tematów.

Podział na seminaria i ich wybór pozostawiono tak jak w poprzednim wydaniu, by Czytelnik miał możliwie pełny obraz nauczanego przedmiotu, chociaż kolejność rozdziałów i ich tytuły nieco się zmieniły. Wprowadzono również drobne zmiany ogólne, jak pytania na końcu rozdziałów, służące podsumowaniu i samodzielnemu sprawdzeniu wiedzy.

