

Justyna Hryniewicz, Roman Gondko

GENY HEMOGLOBIN CZŁOWIEKA

Na podstawie doniesień, opublikowanych w ostatnich latach stwierdzono, że istnieją dwa α geny oraz sześciogenowy kompleks genów nie- α umieszczony na chromosomie w następującym porządku: 5' ϵ - ζ - γ - δ - β 3'. Przedstawiono również najnowsze hipotezy dotyczące mechanizmów kontroli regulacji genów globinowych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na procesy przełączania syntezy hemoglobiny z formy zarodkowej do płodowej, a następnie z płodowej do dojrzałej w czasie ontogenezy.

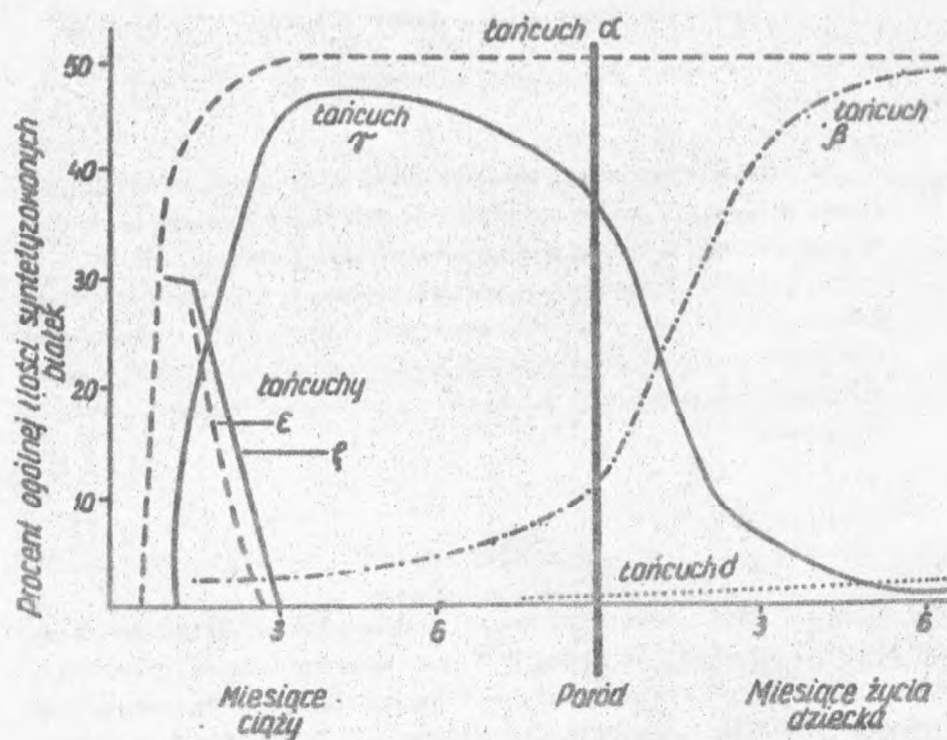
WSTĘP

Hemoglobina (Hb) jest tetramerem zbudowanym z czterech łańcuchów polipeptydowych, z których każdy zawiera grupę prostetyczną-hem [68, 69]. Stwierdzono, że hemoglobiny fizjologiczne zbudowane są według następującego schematu. Przeważnie w skład tetrameru wchodzi para łańcuchów α i para komplementarna (nie- α), opisana w zależności od typu hemoglobiny jako β , δ , γ , ϵ lub ζ , stąd ogólny wzór cząsteczki Hb - α_2X_2 [84]. Znamy kilka wyjątków od tej reguły, tj. β_4 (Hb H) [72], γ_4 (Hb Bart's) [40] i prawdopodobnie ϵ_4 (Hb Gower 1) [32].

Łańcuchy ϵ i ζ syntetyzowane we wczesnych etapach rozwoju człowieka (zarodek), zostają zastąpione przez γ łańcuchy z równoczesnym rozpoczęciem syntezy łańcuchów β i δ [13, 27, 30, 31, 75], co schematycznie przedstawiono na rys. 1 [55].

Łańcuchy β i δ pojawiają się w organizmie, równocześnie z pierwszymi dojrzałymi normoblastami, po przestawieniu erytropoezy megaloblastycznej na tor erytropoezy normoblastycznej (szpi-

kowej) [83]. Ilość syntetyzowanych łańcuchów β w stosunku do ilości syntetyzowanych δ -łańcuchów kształtuje się jak 97:3 [54]. Na uwagę zasługuje fakt ciągłej, równoczesnej syntezy łańcuchów β i δ oraz to, że rozpoczęcie się syntezy każdego z łańcuchów nie- α następuje w odpowiedniej kolejności.



Rys. 1. Zmiany rodzajów łańcuchów hemoglobinowych podczas ludzkiego rozwoju [45]

Changes of globin chain types during human development [45]

Taka różnorodność łańcuchów hemoglobinowych o odmiennym składzie i liczbie aminokwasów świadczy o istnieniu pewnej liczby genów odpowiedzialnych za ich syntezę w czasie ontogenezy [20, 28]. Ustalenie liczby genów hemoglobin fizjologicznych, ich rozmieszczenie oraz ich funkcjonowanie, w wyniku którego w pewnych okresach życia ludzkiego jedne podjednostki hemoglobin przestają być syntetyzowane na korzyść innych, stało się ważnym problemem badawczym biologii molekularnej.

W wyjaśnieniu tych zagadnień pomocne okazały się mutanty he-

moglobiny. Natura sama nieustannie dostarcza nam wiele zmodyfikowanych cząsteczek hemoglobin, a określenie ich struktury I-rzędowej i uwarunkowań genetycznych pozwala na ustalenie liczby genów hemoglobin człowieka.

Badania porównawcze hemoglobin fizjologicznych i zmodyfikowanych (skład aminokwasowy, sekwencja, szybkość elektroforetyczna, powinowactwo tlenowe) dowiodły, iż powstawanie zmodyfikowanej hemoglobiny często stanowi podłoże chorób ogólnie zwanych hemoglobinopatiami. Obecnie znamy szereg genetycznie uwarunkowanych typów hemoglobiny, a zbadanie sposobu ich powstawania oraz budowy nabrało dużego znaczenia w związku z ogólnym zagadnieniem roli genów w syntezie białka.

Pierwsze doniesienia o hemoglobinie patologicznej pochodzą z 1949 r., kiedy to Pauling [64], Neel [59] i Beet [7] wykazali odmienną ruchliwość elektroforetyczną hemoglobin pacjentów z anemią sierpowatą w porównaniu z ruchliwością hemoglobin ludzi zdrowych i ustalili sposób dziedziczenia się tej choroby [41, 66, 67].

U ludzi mających cechę sierpowatości odnaleziono w erytrocytach dwa typy hemoglobin. Około 60% występujących w nich hemoglobin stanowił typ normalny (Hb A) zaś pozostałe 40% to Hb S. Okazało się, że przy niskim ciśnieniu tlenu wszystkie krwinki przybierają kształt sierpowaty, a więc w każdej krwińce obecne są oba typy hemoglobin [64].

W ciągu ostatnich kilkunastu lat rozpoznano szereg nowych hemoglobin. Oznaczono je literami alfabetu w kolejności odkrywania (Hb C, Hb D, Hb E, Hb G itd.), miejscowościami w których stwierdzono ich występowanie (Hb Zurich $\alpha_2\beta_2^{63}$ His-Arg), a także pewnymi szczególnymi cechami (Hb M_{Radom}) [1, 2].

Obecnie poznano około 250 hemoglobin patologicznych. Heterozygoty z normalnym i zmienionym allelem wytwarzają na ogół mieszaninę Hb A i pewnej, określonej hemoglobiny patologicznej, tak jak jest to w wypadku Hb S. U homozygot natomiast mamy tylko hemoglobinę patologiczną. Nie ma tu hemoglobiny typu dojrzałego (Hb A), mogą jedynie występować małe ilości hemoglobiny płodowej (Hb F) [36, 74].

W miarę odkrywania coraz większej liczby hemoglobin uwarunkowanych genetycznie staje się jasne, że kombinacje genów są bardzo liczne. Każdy człowiek może mieć co najmniej dwa z tych ge-

nów, a każda para genów może być allelami lub też mogą one występować w odmiennych loci chromosomu, przy czym w każdym locus może występować kilka alleli [26].

Zbadanie struktury genetycznej heterozygot ma ważne znaczenie w zrozumieniu roli, jaką geny odgrywają przy równoczesnym pojawianiu się hemoglobin fizjologicznych oraz w jaki sposób wzajemnie współdziałają ze sobą.

W związku z licznymi doniesieniami dotyczącymi liczby genów hemoglobinowych, ich lokalizacji i działania, w niniejszym artykule dokonano syntetycznego przeglądu tego zagadnienia, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów regulacji i kontroli genów hemoglobin. Istnieje w tej dziedzinie jeszcze wiele niejasności, niełatwo też uzyskać przekonujący dowód na poparcie którejś z wielu hipotez. Dlatego też omawiane zagadnienie w dalszym ciągu stanowi otwarty problem badawczy.

SYNTEZA ŁANCUCHÓW NIE- α

Hemoglobiny dojrzałe

Najnowszą metodą, o jaką niedawno wzbogaciła się genetyka molekularna, jest technika hybrydyzacji kwasów nukleinowych.

Technika ta zawdzięcza swój rozwój odkryciu przez Temina w 1970 r. enzymu wirusowego tzw. odwrotnej transkryptazy (DNA nukleotydylotransferazy) enzym ten polimeryzuje DNA na matrycy RNA. Mieszanina inkubacyjna zawiera primer w postaci oligo(dT), wszystkie deoksynukleozydotrójfosforany, jony Mg^{++} i polimerazę DNA zależną od RNA. Powstaje wówczas tzw. cDNA (copy DNA), który jest dokładną kopią m-RNA [18]. Proces tworzenia podwójnej spirali cDNA jest dwuetapowy. W pierwszym etapie zostaje odtworzona jedna nić DNA. Powstaje zatem hybryd RNA-DNA. Drugi etap prowadzi do wytworzenia drugiej nici, a cząsteczka cDNA jest odzwierciedleniem składu kodującej nici m-RNA. Tak więc cDNA powstały na matrycy retikulocytarnego m-RNA zawierającego odcinki komplementarne do α i β genów będzie stanowił kopie tych genów ($cDNA_{\alpha\beta}$). Natomiast cDNA powstały na matrycy płodowego, retikulocytarnego m-RNA zawiera kopie α , β i γ genów ($cDNA_{\alpha\beta\gamma}$). Podjęto próby izolowania m-RNA₃ od pacjentów z β^0 talasemią. Pacjenci tacy

charakteryzują się zahamowaną syntezą β łańcucha, a więc ich m-RNA nie zawiera odcinków komplementarnych do β genów. Syntetyzowany cDNA posiada kopie jedynie α i γ genów i być może krótkie odcinki odpowiadające sekwencji δ genów [14]. Pełne wykorzystanie techniki hybrydyzacji nastąpiło dopiero wówczas, gdy udało się otrzymać cDNA posiadający kopię jednej globiny tj. cDNA $_{\alpha}$, cDNA $_{\beta}$, cDNA $_{\gamma}$ [81]. Po wyizolowaniu płodowego m-RNA /m-RNA $_{\alpha\beta\gamma}$ syntetyzowano cDNA $_{\alpha\beta\gamma}$, który łączono z dojrzałym m-RNA $_{\alpha\beta}$. Odcinki cDNA $_{\alpha}$ i β , jako komplementarne do m-RNA $_{\alpha\beta}$, hybrydyzowały, natomiast cDNA $_{\gamma}$ nie posiadając odcinka komplementarnego w cząsteczce m-RNA pozostawał w postaci pojedynczej nitki. Tak uzyskana mieszanina poddawana była rozdzielowi chromatograficznemu na hydroksypatycie. Pojedynczą nić DNA (cDNA $_{\gamma}$) eluowano fosforanami o niskim stężeniu (0,12 M), podczas gdy podwójna nić DNA (cDNA $_{\alpha}$, cDNA $_{\beta}$), silniej związana, wymagała do elucji fosforanu o wyższym stężeniu (0,4 M). Tak uzyskano preparaty cDNA $_{\gamma}$ o ponad 90% czystości. cDNA $_{\alpha}$ uzyskano z cDNA $_{\alpha\beta}$, po hybrydyzacji z m-RNA pacjentów z α^0 talasemią, którzy nie posiadają m-RNA $_{\alpha}$. cDNA $_{\beta}$ uzyskano analogicznie, hybrydując cDNA $_{\alpha\beta}$ z m-RNA pacjentów z β^0 talasemią. W celu stwierdzenia ilości genów odpowiedzialnych za syntezę β , δ , γ łańcuchów, dokonano prób hybrydyzacji z użyciem nadmiaru cDNA dla poszczególnych globin oraz nadmiaru jądrowego DNA, każdorazowo stosując analizę chromatograficzną [61, 62].

Jak wykazano analizą proporcji m-RNA:cDNA; istnieją dwa geny (δ i β) odpowiedzialne za syntezę tych apoglobin człowieka [25], patrz tab. 1.

Uzupełnieniem opisanych metod, są klasyczne testy genetyczne. Ważnych w tym względzie danych dostarczyły badania hemoglobin typu Lepore [4]. Poznano sekwencję aminokwasową trzech hemoglobin tego typu. Okazało się, że łańcuch nie- α tych hemoglobin ma następującą budowę. Od końca N-terminalnego znajduje się odcinek sekwencji odpowiadający odcinkowi łańcucha δ , a od końca C-terminalnego odcinek β łańcucha. Hemoglobiny te różnią się między sobą tylko procentowym udziałem fragmentów δ i β łańcuchów budujących podjednostkę komplementarną do łańcucha α . Stąd ogólny wzór Hb Lepore ma postać $\alpha_2(\delta\beta)_2$. Obok Hb Lepore istnieje grupa hemoglobin patologicznych, tzw. anty-Lepore, o o-

gólnym wzorze $\alpha_2(\beta\delta)_2$, z których znane są trzy tego typu hemoglobiny. Tylko dwie z nich poddano analizie strukturalnej (Hb F Nilotic, Hb Miyada). Hemoglobiny te, odwrotnie do Hb Lepore, mają od N-końca, na pewnym odcinku, sekwencję odpowiadającą β łańcuchowi, a od C-końca δ łańcuchowi [51].

Tabela 1

Ustalenie liczby ludzkich genów globinowych
przy użyciu metod hybrydyzacji i z zastosowaniem testów genetycznych [62]
Determination of the number of the human globin genes
by the hybridization method and genetic tests [62]

Rodzaj łańcucha	Ogólna ilość DNA (w nadmiarze)	cDNA (w nadmiarze)	Testy genetyczne
α	2	-	2
β	1	1	1
γ	3±1	2	2-4
δ	-	1	1
ϵ	-	-	1
ζ	-	-	1
Ogółem	10 ± 1		8-10

Te "nienormalne" łańcuchy powstają w wyniku fuzji loci genów δ i β . Fuzja taka zdarza się podczas mejozy. Jest ona rezultatem rozległego niewyrównania chromatyd. Wówczas to, w obrębie strukturalnych genów zachodzi nierówny crossing-over powodując, że w skład synapsy wchodzi niealleliczne, ale częściowo homologiczne geny. W rezultacie, jedna z gamet posiada chromosom, w którym δ i β geny oraz jakiś region międzygenowy zostaje "wykreślony". Druga gameta będzie miała natomiast przedłużony chromosom, jako wynik amplifikacji genów.

Te dwie grupy hemoglobin stanowią dowód, że δ i β strukturalne geny są sprzężone i znajdują się na tym samym chromosomie. Gdyby niehomologiczny crossing-over zachodził pomiędzy nie połączonymi ściśle genami, byłby letalny lub prowadził do wielokrotnych anomalii, podczas gdy choroba spowodowana wystąpieniem Hb

Lepore przebiega względnie łagodnie. Stanowi to dalszy argument na to, że geny δ i β są sprzężone.

W 1955 r. Kunkel i Wallenius [49] wykazali istnienie hemoglobiny A_2 (Hb A_2) stanowiącej 2,5% ogólnej ilości hemoglobiny. Analiza strukturalna wykazała, że hemoglobina ta ma α łańcuch identyczny z łańcuchem α Hb A, ale komplementarny nie- α łańcuch różni się od β łańcucha Hb A [58]. Nazwano go δ łańcuchem, a jego struktura pierwszorzędowa nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Wiadomo jednak, że różni się on minimum w 10 pozycjach na 146 reszt porównywanych z sekwencją łańcucha β [42, 43, 50]. Badania prowadzone nad obu hemoglobinami, tj. Hb A ($\alpha_2\beta_2$) i Hb A_2 ($\alpha_2\delta_2$) wykazały różnice w szybkości ich syntezy. U osobników dorosłych ogólna zawartość δ łańcucha stanowi 1/40 ilości łańcuchów β . Synteza β łańcucha rozpoczyna się w późniejszych etapach życia niż δ łańcucha. Żaden z dotychczas proponowanych modeli nie wyjaśnia tych różnic, a tłumaczenie tego zjawiska jest spekulatywne. Nie wiadomo dotychczas zbyt wiele o mechanizmach kontroli syntezy białek w komórkach eukariotycznych. Można założyć, że mechanizmy te podobne są do tych, jakie opisano w przypadku komórek prokariotycznych. Czyniąc takie założenie, zaproponowano dwie alternatywne hipotezy [80]. Pierwsza z nich zakłada, że strukturalne geny β i δ znajdują się na pojedynczym operonie pod kontrolą pojedynczego układu "promotor-operator". W wyniku transkrypcji δ i β loci powstaje pojedynczy, policistronowy m-RNA. Ponieważ zauważono różnice w szybkości syntezy tych dwóch łańcuchów, dalszy system kontroli odbywałby się na poziomie translacji, co spowoduje zróżnicowanie sekwencji łańcuchów δ i β oraz ich różnice ilościowe.

W hipotezie alternatywnej obydwa strukturalne loci byłyby autonomiczne, a każdy z nich posiadałby własny układ "promotorowo-operatorowy". System kontroli działałby na poziomie transkrypcji. Teoretycznie zakładając, różnice w ilości β i δ łańcuchów mogłyby być spowodowane wytworzeniem 40 razy więcej cząsteczek m-RNA przez gen łańcucha β niż gen łańcucha δ .

W myśl pierwszej hipotezy niehomologiczny crossing-over, który jest przyczyną powstawania Hb Lepore, spowoduje wytworzenie się $\delta\beta$ hybrydowego locus, kontrolowanego przez taki sam układ "promotorowo-operatorowy", jaki działa dla δ i β genów w normalnej hemoglobinie.

Jeżeli prawdziwa jest druga hipoteza, to niehomologiczny crossing-over powodujący fuzję δ i β locus będzie kontrolowany przez układ "promotorowo-operatorowy" δ genu. Stwierdzono bowiem, że synteza $\delta\beta$ łańcucha w Hb Lepore jest bardziej podobna do syntezy łańcucha δ aniżeli do syntezy łańcucha β . Należy jednak dodać, że muszą istnieć pewne różnice pomiędzy syntezą tych dwóch łańcuchów, bowiem ilość syntetyzowanego łańcucha $\beta\delta$ jest prawie dziesięciokrotnie większa niż δ łańcucha. Różnica ta może być spowodowana większą stabilnością m-RNA dla $\delta\beta$ łańcuchów w porównaniu z m-RNA δ łańcucha.

Hemoglobiny embrionalne i płodowe

Do trzeciego miesiąca życia płodowego w zarodku ludzkim występuje głównie hemoglobina embrionalna Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) [32, 33]. W płodowym i niemowlęcym okresie życia człowieka główną hemoglobina jest Hb F ($\alpha_2\gamma_2$). Trzecim płodowym łańcuchem komplementarnym do łańcucha α jest łańcuch ζ wchodzący w skład hemoglobiny zarodkowej Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) oraz prawdopodobnie w skład Hb Gower ($\zeta_2\epsilon_2$) [12, 13, 34].

Najnowsze badania prowadzone nad hemoglobinami embrionalnymi, doprowadziły do ustalenia sekwencji aminokwasowej łańcucha ϵ [22]. Znany jest również procentowy skład aminokwasowy łańcucha ζ [12]. Różnice w składzie aminokwasowym łańcuchów ϵ i ζ w porównaniu z łańcuchami α , β , γ i δ wskazują na istnienie oddzielnych loci genowych odpowiedzialnych za ich syntezę [47].

Poznano również budowę I-rzędową łańcucha γ . Jest on zbudowany z 146 aminokwasów i różni się 39 aminokwasami od β łańcucha.

Przypuszcza się, że istnieją trzy niezależne loci - jedno dla genu γ , drugie dla ϵ i trzecie dla genu łańcucha ζ [51]. Nie ma natomiast żadnej informacji o liczbie genów w każdym z embrionalnych loci (ϵ i ζ).

Wykazano istnienie dwóch typów Hb F, różniących się sekwencją łańcucha γ [23, 24]. Stwierdzono różnice w pozycji 136, w której wystąpić może alanina (A_γ) bądź glicyna (G_γ) [74]. Locus dla genów γ -globinowych zawiera prawdopodobnie dwa strukturalne geny A_γ i G_γ . W prawidłowym rozwoju synteza G_γ poprze-

dza syntezę łańcucha A_γ . W okresie płodowym stosunek łańcuchów G_γ do łańcuchów A_γ wynosi 3:1 i pozostaje nie zmieniony przez okres trwania ciąży [60]. Heterozygoty z dwoma γ genami produkują G_γ i A_γ łańcuchy, a tym samym dwa rodzaje Hb F. Istnieje zatem różnica w działaniu podwójnych genów γ i α . Heterozygoty z dwoma genami γ produkują dwa rodzaje łańcuchów, natomiast heterozygoty z podwójnymi α genami syntetyzują tylko jeden rodzaj łańcuchów (α) [46].

W heterotypach proporcje G_γ i A_γ są różne. Spotykamy warianty, u których G_γ występuje w ilości 25% lub 12%, podczas gdy A_γ występuje w ilości 12% lub 5% ogólnej zawartości Hb F [46]. W oparciu o te dane Huismann [37] zakłada istnienie na chromosomie czterech γ -łańcuchowych genów, tj. dwóch genów G_γ oraz dwóch genów A_γ ($G_{m\gamma}$, $G_{i\gamma}$, $A_{m\gamma}$, $A_{i\gamma}$ - gdzie m wskazuje na większą aktywność, a i - na mniejszą (o aktywności 4:2:2:1)).

Przy użyciu metod hybrydyzacji kwasów nukleinowych Tolstoshev [78] analizując różne proporcje użytego cDNA w stosunku do m-RNA stwierdził istnienie dwóch genów dla γ globiny (tab. 1).

Tak jak Hb Lepore dostarczyła danych o umiejscowieniu genów δ i β , tak odkryta ostatnio przez Huismanna hemoglobina Hb Kenya ($\alpha_2(\gamma\beta)_2$) posłużyła do analizy działania γ genów [36, 38]. W Hb Kenya łańcuch nie- α ma od końca N-terminalnego 80 reszt aminokwasowych ułożonych według sekwencji łańcucha γ , zaś na dalszym odcinku sekwencję β łańcucha [87, 146]. Jest to dowód, że crossing-over wystąpił w dwóch strukturalnych genach pomiędzy kodonami dla reszt 81-86.

W organizmie naszym istnieje proces tzw. przetrwałej syntezy hemoglobiny płodowej (persistence of foetal Hb PHF), bowiem geny γ kontynuują syntezę łańcucha γ przez cały okres życia ludzkiego.

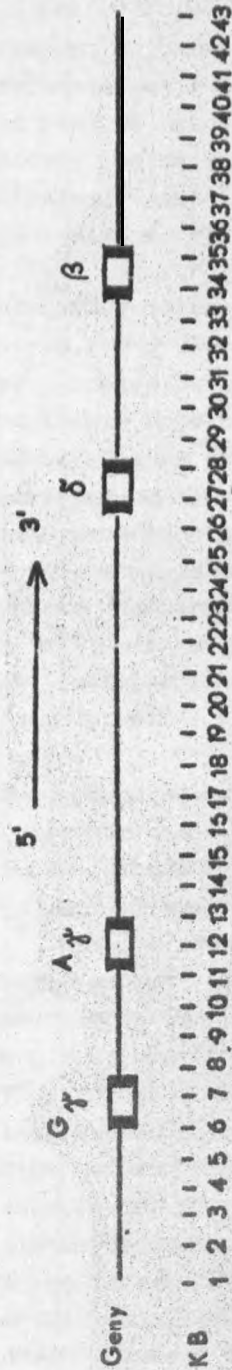
U noworodków około 60-80% hemoglobiny to Hb F. W miarę rozwoju dziecka procent hemoglobiny płodowej ulega stopniowo zmniejszeniu. Pod koniec pierwszego roku życia zastępuje ją hemoglobina typu dorosłego (Hb A). Zdolność do syntezy hemoglobiny płodowej jednak nie zanika u ludzi dorosłych. Czasami występuje tylko w ilościach śladowych (0,4%) [35]. Stosując prosty test denaturacji alkalicznej wykazano, że w typowych przypadkach niedokrwistości około 2-24% hemoglobiny należy do typu płodowego (Hb F), niezależnie od wieku chorego [79].

W heterozygotach z Hb Kenya stwierdzono występowanie procesu przetrwałej syntezy hemoglobiny płodowej (PHF). U dojrzałych osobników objawia się jej obecność niezwykle wysokim poziomem Hb F, bez zaburzeń hematologicznych. Analiza testów genetycznych pozwala przypuszczać, że lokalizacja genów PHF na chromosomie jest w bliskim sąsiedztwie z locusem β [36, 38]. Brak hemoglobiny dojrzałej u pacjentów z anemią sierpowatą czy pacjentów z chorobą sierpowatości typu C (Hb C), z anemią Cooleya czyli talasemią major, przy jednoczesnym wzmożonym wytwarzaniu hemoglobiny płodowej Hb F świadczy o tym, że geny PHF są aktywne w tłumieniu syntezy β łańcuchów [38]. Ich działanie ujawnia się tylko wówczas, gdy są ułożone w pozycji cis (w 32-44 tygodniu ciąży geny G_γ i A_γ skręcają ku dołowi, zaś geny δ i β są podnoszone ku górze), co stanowi dodatkowy dowód na to, że allele γ i β są heteroallelami.

Podsumowując można założyć, że rozmieszczenie β , δ i γ genów wygląda w sposób następujący: $G_\gamma A_\gamma \delta \beta$ lub też $G_\gamma G_\gamma A_\gamma A_\gamma \delta \beta$, a crossing-over występuje pomiędzy G_γ lub A_γ i β genem.

Wszystkie sugestie, jakie wysunięto po badaniach genetycznych i analizie strukturalnej hemoglobin Lepore i Kenya zostały ostatnio potwierdzone przez F r i t s c h a i wsp. [21]. Stosując metodę hybrydyzacji plamowej wykreślili mapę genów nie- α , wykazując w sposób niedwuznaczny, proste, fizyczne połączenie, jakie istnieje pomiędzy płodowymi i dojrzałymi genami globinowymi (rys. 2).

Do wykreślenia mapy posłużył fragment cDNA ograniczony miejscami przywiązywania się endonukleazy. Obejmował on obszar występowania poszczególnych loci genowych jak i sekwencji międzygenowych i posiadał długość 43 kilobaseos (1 kilobaseos - 1 kb = 1000 par zasad). Uzyskanie cDNA od pacjentów z aktywnymi genami PHF jak i $\delta\beta$ talasemią pozwoliło na stwierdzenie, że pomiędzy regionami kodującymi m-RNA występują w każdym genie sekwencje nie kodowane o charakterze regulatorowym. Na rysunku 2 prostokąty reprezentują miejsca kodujące. Odcinki niezaciemnione to sekwencje zwane interweniującymi. Prawdopodobnie biorą one udział w procesie przełączania syntezy z płodowych form hemoglobiny do dojrzałych. Kierunek transkrypcji przebiega od końca 5' do 3', zaś poszczególne geny ustawione są w następującym porządku: 5' G_γ - A_γ - δ - β 3'. Sekwencje interweniujące w δ , β , A_γ genach umie-



Rys. 2

Mapa miejsc wiążących endonukleazę w obrębie i otoczeniu ludzkich γ - δ - i β -globinowych genów. Ustawienie płodowych i dojrzających genów hemoglobinowych na odcinku 43 kilobases ludzkiego DNA [21]

A map of restriction endonuclease cleavage sites within and surrounding the human γ - δ - and β -globin genes. The arrangement of foetal and adult β -like globin genes within a 43-kilobase segment of human DNA [21]

szczone są pomiędzy kodonami 104 i 105. Rozmiary ich w $G_{\gamma-A_{\gamma}-\delta}$ i β genach wynoszą odpowiednio 850, 850, 950 i 900 par zasad. Dokładna analiza przypadków chorobowych u pacjentów z genami PHF oraz $\delta\beta$ -talasemią pozwoliła wysunąć przypuszczenie, że region DNA znajdujący się w pobliżu końca 5' δ genu bierze udział w hamowaniu γ -globinowych genów, gdy te po wykonaniu skrętu w dół, przyjmują konfigurację cis [21]. Ścisłe połączenie [sprzężenie] genów łańcuchów nie- α odkryto także u owiec, myszy i kóz [15, 23, 73].

Podsumowując, udowodniono istnienie u człowieka dwóch grup sprzężenia genów (dwóch dla łańcuchów γ i dwóch dla łańcuchów β i δ) a grupy te są ściśle ze sobą połączone. Uzyskanie danych, dotyczących powiązania genów u wyższych organizmów jest względnie trudne. Geny hemoglobin ułożone są parami, podobnie jak geny immunoglobulin ssaków [53]. Ponieważ poszczególne podjednostki hemoglobiny różnią się sekwencją aminokwasową, musimy przypuszczać, że są one zdeterminowane oddzielnymi loci genowymi usytuowanymi na autosomalnych chromosomach. Z tego też powodu zakłada się istnienie dwóch odrębnych loci genowych dla ϵ i ζ łańcuchów [84]. U osobników dorosłych mamy zatem co najmniej 4 loci genowe odpowiedzialne za strukturę trzech hemoglobin fizjologicznych (rys. 3).

W życiu płodowym funkcjonują co najmniej 3 loci, odpowiedzialne za strukturę 2 hemoglobin, a w okresie zarodkowym należy przypuszczać, że istnieją 4 loci odpowiedzialne za syntezę 4 hemoglobin (rys. 3). Z wymienionych hemoglobin tylko Hb F jest obecna we wszystkich okresach naszego życia.

Ścisłe połączenie genów u ssaków zmierza wyraźnie do wzajemnego, skorelowanego ich działania. Aktywność jednego genu w grupie wyłącza inne połączone geny. Podjęto próby sformułowania teorii, która tłumaczyłaby te wzajemne połączenia funkcjonalne genów hemoglobiny. Wcześniejsza teoria nie wyjaśnia syntezy hemoglobin i proliferacji erytroidalnych komórek rdzenia. W dalszym ciągu nie znamy dokładnej liczby genów hemoglobiny, sposobu różnicowania się genomu z następstwem różnicowania się komórek. Wiele pytań dotyczących omawianego zagadnienia pozostaje nadal bez odpowiedzi. Czy geny produkują specyficzne białka, które są wzmacniane (amplifikowane) przez jakiś jeszcze nieznany mechanizm? Może być też i tak, że wszystkie komórki odpowiedzialne za syn-

	osobnik dorosły	plód	zarodek
Genotyp	α/α β/β δ/δ γ/γ	α/α β/β γ/γ	α/α γ/γ ϵ/ϵ ζ/ζ
Podjednostki			
Fenotyp	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\delta_2$ $\alpha_2\gamma_2$ $\alpha_2\beta_2\delta_2$	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\gamma_2$	$\alpha_2\gamma_2$ $\alpha_2\epsilon_2$ $\alpha_2\zeta_2$ $\alpha_2\gamma_2\epsilon_2$
Hemoglobina	A_1 A_2 F	A_1 F	F Gower 1 Gower 2 Portland

Rys. 3

Fizjologiczne hemoglobiny człowieka oraz liczba loci genowych odpowiedzialnych za ich syntezę
Physiological human hemoglobins and the loci number of genes responsible for their synthesis

tezę hemoglobin mają wiele kopii genów odpowiedzialnych za tę syntezę. Zjawisko takie powstaje w wyniku specyficznej replikacji pewnego tylko fragmentu genomu. W rezultacie powstaje wielokrotność genu odpowiedzialnego za syntezę jednego białka. Procesy transkrypcji i translacji zamplifikowanego genu powodują powstawanie zwielokrotnionej ilości r-RNA, a co za tym idzie, i syntetyzowanego białka. Możliwe jest, że synteza jednego lub kilku białek może być osiągana przez podwyższenie tempa transkrypcji, i jej rozległości, takiego zamplifikowanego genu. Wydaje się mało prawdopodobne, aby komórki mogły amplifikować poszczególne geny, ale jak wykazano ponad wszelką wątpliwość, proces taki zachodzi w różnicujących się oocytach płazów (*Xenopus*), w jednokomórkowych glonach (*Acetabularia mediterranea*) oraz u niektórych owadów [9]. U płazów i owadów proces amplifikacji dotyczy również rybosomalnego DNA. Dochodzi wówczas do zwielokrotnienia sekwencji r-DNA jako wyniku specyficznej replikacji podczas oogenezy [3].

W 1972 r. Bishop i Baglioni [9, 65] opisali eksperyment hybrydyzacji kwasów nukleinowych, który umożliwił policzenie liczby kopii genów globinowych w retikulocytach kaczek. Otrzymane wyniki sugerują, że każdy retikulocytarny genom zawiera najwyżej 10 kopii genów globinowych. Jeżeli dane te pozostają w zgodzie z rzeczywistością, amplifikacja genów nie powinna odgrywać ważnej roli w różnicowaniu się czerwonych komórek.

SYNTEZA ŁANCUCHÓW α

Do chwili obecnej poznano około 70 wariantów α łańcucha. Analiza stosunków ilościowych tych hemoglobin nie dała jednak wskazówek co do liczby genów α . Krzywa obrazująca ilości poszczególnych wariantów jest trimodalną z maksimami przy 25, 33, 45% ogólnej ilości Hb A. Sugeruje to heterogenetyczność w diploidalnej liczbie genów ludzkiej populacji. Stwierdzono, że osobnicy, którzy posiadają w 25% ogólnej ilości hemoglobin zmutowany łańcuch α , mają cztery α geny, w 33% - trzy α geny, zaś w 45-50% - dwa α geny. W większości przebadanych przypadków hemoglobiny ze zmienionym łańcuchem α stanowiły 25% ogólnej ilości hemoglo-

biny. W oparciu o te dane Lehmann i Correll [52] sugerują istnienie czterech α globinowych genów o jednakowej sile działania.

Opinia o diploidalnym komplecie czterech genów jest szeroko rozpowszechniona, ale prawdopodobnie istnieją również chromosomy z jednym funkcjonalnym α genem. Jak sugeruje Boyer [10] siły ewolucji najprawdopodobniej dążyły do podwojenia genów α łańcucha.

Wytwarzanie somatycznych, hybrydowych komórek w różnych chromosomalnych układach stosowane jest do analizy pokrewieństw, wzajemnych powiązań i regulacji wielu strukturalnych genów. Deisseroth i wsp. [16, 17] użyli somatycznych komórek hybrydowych, otrzymanych po fuzji chromosomów człowieka i myszy, w celu wykazania segregacji ludzkich α i β globinowych genów. Lokalizację tych genów analizowano wprost, przez określenie, które ludzkie geny (lub jeden gen) uczestniczą w powstawaniu produktu ich działania - m-RNA. W oparciu o powyższe doświadczenia zlokalizowano geny α i β globiny myszy na oddzielnych chromosomach. Również ludzkie geny α i β nie występują razem na tym samym chromosomie.

Opisany wcześniej eksperyment hybrydyzacji cDNA_α z m-RNA α^0 -talasemicznych pacjentów posłużył również do ustalenia liczby genów α [81]. Porównywano stopień hybrydyzacji cDNA_α z m-RNA pochodzącym od pacjentów ze skazą Hb H. Pacjenci posiadający hemoglobinę H (β_4) mieli 1/4 liczby genów znajdujących się u ludzi zdrowych (na diploidalny genom) [48]. Wynik tego eksperymentu wskazuje na to, że muszą istnieć dwa α -globinowe geny na haploidalny genom, ale nie można wykluczyć ewentualności istnienia wielokrotności tej liczby [81]. Deisseroth i wsp. [17] podkreślają nierównoczesność działania ludzkich genów α - i β -globiny.

Price i wsp. [70] donieśli, że geny ludzkich α globin są ulokowane na chromosomie 2 w grupie B chromosomu. Dokładność tych ustaleń jest nadal jednak kontrowersyjna [84].

Jak już wspomniano, istnieje ścisłe sprzężenie genów dla łańcuchów nie- α . Podkreśla się też segregację α i β genów. Można by więc sformułować hipotezę o segregacji genów α ze wszystkimi genami nie- α .

MECHANIZMY KONTROLI REGULACJI GENÓW GLOBINOWYCH

O obecności określonego systemu regulacji czynności genów globinowych świadczy pojawianie się w życiu człowieka, w określonej kolejności hemoglobin trzech typów: embrionalnych, płodowych i dojrzałych. W wyniku badań prowadzonych nad globinowym m-RNA stwierdzono istnienie długiego odcinka nie podlegającego procesowi translacji, po którym następuje region ulegający temu procesowi [81, 71]. Funkcja niekodowanych partii globinowego m-RNA nie została jeszcze w pełni zbadana. Istnieją dane sugerujące, że obszar chromosomu sąsiadujący z β -, γ -, δ -genami, tzw. region intergenetyczny, uczestniczy w supresji lub aktywacji tychże genów.

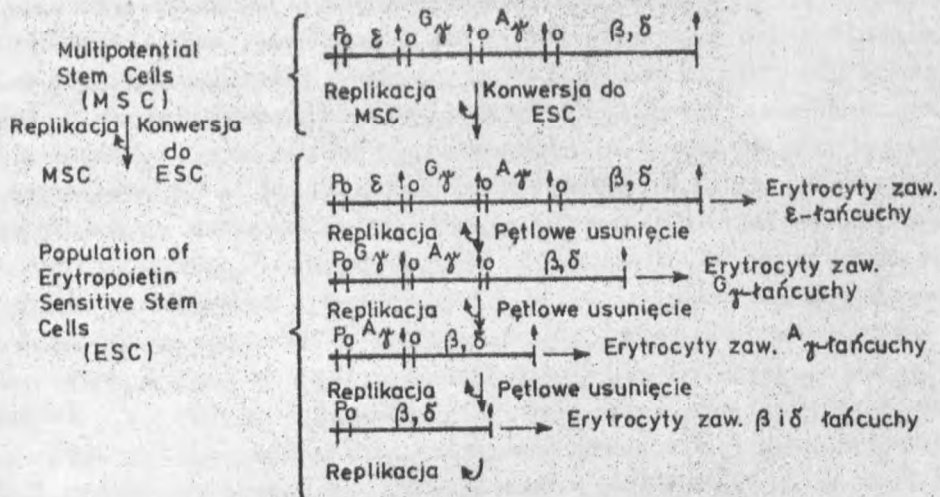
Opisane wcześniej Hb Lepore i Hb Kenya nasuwają przypuszczenie, że w przypadku wystąpienia tych hemoglobin w obszarach DNA kodujących $\gamma\beta$ -łańcuchy muszą występować daleko idące zmiany. Ujawniają się one nadzwyczaj wysoką syntezą hemoglobiny płodowej. Prawdopodobnie, w przypadku Hb Kenya występuje delecja odcinka chromosomu pomiędzy $A\gamma$ i δ -łańcuchowymi genami, które normalnie uczestniczą w supresji genów płodowych. Liczne badania dotyczące tego problemu dostarczają dalszych danych o tym, że miejsca regulatorowe są usytuowane w obrębie γ , δ i β loci [21, 39].

W 1972 r. K a b a t [45] zaproponował model działania chromosomu, który wyjaśnia funkcjonowanie genów nie- α , a wynikiem którego jest pojawianie się kolejnych łańcuchów w czasie ontogenezy (rys. 4).

Dotychczas otrzymane dane wydają się świadczyć na korzyść zaproponowanego modelu [11, 19]. Model jak i użyta w nim terminologia zostały zapożyczone z modelu kontroli genów w mikroorganizmach [44, 56]. Proponowane funkcje promotora, operatora i terminatora są rozpatrywane analogicznie. Na rys. 4 P oznacza locus promotora. Jest to miejsce wiązania się polimerazy RNA do chromosomu, podczas gdy t-loci - miejsce terminatora - jest miejscem odcepienia się polimerazy (w którym transkrypcja jest zakończona). Loci operatora oznaczono symbolem O.

W modelu tym tylko proksymalny gen promotora może być aktywny, ponieważ bardziej dystalne geny są oddzielone od locus promotora przez locus terminatora. Dlatego też locus operatora wy-

stępuje na proksymalnym miejscu w stosunku do promotora dla każdego nie- α strukturalnego genu i jest podobne w budowie nukleotydowej dla wszystkich genów w tej grupie.



rys. 4

Struktura chromosomu ludzkich erytroidalnych szczepów komórkowych [45]

Chromosome structure of human erythroid stem cells [45]

Na schemacie zaproponowano genotyp tzw. wielofunkcyjnego szczepu komórkowego (*multipotential stem cells*) - MSC.

Wiadomo, że tkanki erytroidalne zawierają zespoły komórek, które zdolne są do różnicowania kilkoma sposobami [6]. Tak np. szczep komórkowy rdzenia kręgowego może formować kolonię zawierającą różnorodne komórki, tj. erytrocyty, granulocyty, megakariocyty. Prawdopodobnie, kierunek różnicowania szczepu MSC może być dwójakiego rodzaju [76]. I tak, komórki MSC mogą szybko replikować poprzez mitozę lub też mogą doświadczyć konwersji w jednofunkcyjny szczep komórkowy (*unipotential stem cells*). Taki jednofunkcyjny szczep komórkowy, ulegający erytroidalnemu różnicowaniu, jest podatny na hormony erytropoetyny [77]. Dlatego nazywano go szczepem komórkowym wrażliwym na erytropoetynę-ESC (*erythropoietin sensitive stem cells*). W dojrzałym rdzeniu kręgowym lub w koloniach ślędziony komórki ESC szybko replikują przez mitozę i są względnie liczne w stosunku do MSC [6, 77]. Komórki ESC pro-

dukuja nie tylko inne ESC, ale równie są zmieniane w toku erytropoezy w proerytroblasty, a te są końcowymi prekursorami erytrocytów [6, 77]. K a b a t sugeruje, że czasami ESC doświadczają przypadku pętlowego usuwania (*looping-out excision*), w którym proksymalny gen promotorowy dla nie- α łańcucha jest usuwany z chromosomu. Proces ten jest spowodowany intrachromosomalnym crossing-over pomiędzy dwoma przylegającymi do loci operatora genami, usytuowanymi ściśle przy promotorze i jest analogiczny do dobrze znanego usuwania DNA lizogenicznego bakterifaga λ z chromosomów *Escherichia coli*. Miejsce usuwania DNA jest ostatnim na acentrycznym pierścieniu i nie może być transkrybowane, ponieważ brak jest miejsca promotorowego. Tak więc proliferacji komórek ESC towarzyszy stopniowa konwersja w populację, która może wytwarzać erytrocyty zawierające dojrzałą formę hemoglobiny. Proces ten zachodzi tak długo, aż pozostaje tylko jeden locus operatora.

Pętlowa teoria usuwania genu w sposób adekwatny wyjaśnia zmiany w nie- α polipeptydowych łańcuchach. We wczesnych, embrionalnych szczepach MSC wzrastają i wytwarzają się komórki typu ESC inicjujące produkcję erytrocytów zawierających tylko embrionalną hemoglobinę - $\alpha_2\epsilon_2$. Czasami pętlowe wycięcie zdarza się niezależnie w dwóch homologicznych chromosomach diploidalnych ESC. W rezultacie szczepy ESC mogą produkować erytrocyty zawierające obydwa ϵ - i γ -łańcuchy. Zgodnie z tym modelem, dominujący typ nie- α łańcucha formowany podczas embrionalnego lub wczesnorozwojowego etapu może być zależny od tempa pętlowego usuwania genów w ESC i przypuszczalnie od wieku populacji ESC. To z kolei zależy od względnych rozmiarów MSC i ESC i od tempa konwersji MSC w ESC.

Testy genetyczne prowadzone na myszach i *Drosophila melanogaster* są w zgodzie z tym mechanizmem wytwarzania różnorodnych tkanek jako wyniku średniotkowego crossing-over w komórkach somatycznych tych zwierząt [11, 19]. Pozostaje do udowodnienia, że w somatycznych komórkach wyższych organizmów ma miejsce prosta "zguba" genu, co z kolei jest dobrze znane np. u roślin, gdzie w rozwoju linia zarodka nie ma wczesnej segregacji. Można jedynie założyć a priori, że taki proces wystąpi u zwierząt.

Wiadomo, że w czasie embriogenezy dojrzały szpik kostny jest ustawicznie odtwarzany. Pozostaje to w zgodzie z obserwowanymi zmianami syntezy hemoglobin towarzyszącymi anemii.

Powszechnie znany jest fakt wzrostu stężenia erytropoetyny i przedwczesnego uwalniania się do krwiobiegu krwinek czerwonych z reticulocytów i niedojrzałych komórek szpiku kostnego podczas anemii. Zostało również udokumentowane, że erytropoetyna stymuluje konwersję niezróżnicowanych ESC w proerytroblasty. Uwalnianie ESC z anemicznego szpiku może być zrekompensowane przez powiększenie tempa konwersji KSC w ESC z nieznanym mechanizmem sprzężenia zwrotnego, a to prowadzi do wzrostu bardziej niedojrzałych form dojrzewającego ESC i przesunięcia erytropoezy w kierunku wcześniejszych form rozwojowych nie- α hemoglobinowych łańcuchów.

Podobne zmiany w proporcji nie- α łańcuchów hemoglobiny występują w anemiach u ludzi. Wielu anemiom ludzkim (talasemia, anemia Cooley'a, anemia sierpowata, nabyta aplastyczna anemia) towarzyszy podwyższony poziom hemoglobiny płodowej. Ponadto, gdy stosunek G_γ do A_γ w normalnej dojrzałej krwi ma niską wartość, to proporcja ta w dojrzałej, anemicznej krwi z β -talasemią jest często wyższa. Zmiany towarzyszące anemii pozostają w zgodzie z proponowaną teorią selekcji genów.

Najważniejszym wnioskiem, jaki można wyciągnąć z przedstawionej teorii jest to, że populacja ludzka nie ma więcej niż dwa nie- α geny mogące ujawnić się w pojedynczych erytrocytach, w postaci dwóch hemoglobiny. Dla przykładu zakłada się, że ludzkie heterozygoty posiadające β^A i β^S allele zawierają w pojedynczych erytrocytach z trzech możliwych hemoglobiny - Hb A, Hb S, Hb F tylko dwie Hb F i Hb S. W myśl hipotezy wycięcia, żadna pojedyncza komórka krwi nie zawiera równocześnie wszystkich trzech hemoglobiny.

W 1977 r. Nutt i wsp. [63] donieśli o eksperymencie wskazującym na istnienie dwóch różnych β łańcuchów (β^S i β^C) oraz jednego łańcucha γ w pojedynczej komórce. Jeżeli doniesienia te pozostają w zgodzie z rzeczywistością, to "wycięcie" nie może być przyczyną regulacji i syntezy białek hemoglobinowych w czasie ontogenezy, a przynajmniej nie jest jedynym i ostatecznym procesem. Hipoteza "wycięcia" zakładająca istnienie pojedynczego, promotowego locus dla kompleksu ($\epsilon?$) - G_γ - A_γ - δ - β oraz kontroli transkrypcji przez proces intrachromosomalnego crossing-over jest jedną z wielu hipotez dotyczących omawianego zagadnienia.

Alternatywne hipotezy zakładają istnienie wielu kontrolerów genowych, usytuowanych pomiędzy kolejnymi strukturalnymi genami, z

serią pętlowych delecji powodujących zmiany fenotypowe syntetyzowanych hemoglobin [39].

Problem kontroli przełączania należy rozpatrywać na dwóch poziomach, nie tylko molekularnym ale i komórkowym. Istnieje bowiem kilka ważnych kwestii wymagających odpowiedzi, na którym etapie różnicowania się hemopoetycznych zespołów komórkowych determinowany jest określony typ hemoglobiny i czy proces ten może być zmieniony podczas dalszego dojrzewania komórek.

Po drugie, nie jest wyjaśnione czy istniejące czynniki odpowiedzialne za inicjację przełączenia są czynnikami humoralnymi, zlokalizowanymi w czynnikach tkankowych (interakcja komórka-komórka), czy też może są jakimiś innymi formami naszego "zegara ustrojowego".

Dane, które przemawiają na korzyść czynnika humoralnego, to synteza Hb F podczas pierwszego trimesru ciąży i synchroniczność przy przełączaniu Hb F do Hb A.

Na koniec należałoby nie zapominać o fakcie, że gen istnieje nie in vacuo, lecz w szczególnym środowisku wewnątrzkomórkowym, którego natura musi wywierać wpływ na charakter jego aktywności i działania. Należą do nich: uprzednia "historia" komórki, natura jej bezpośredniego otoczenia oraz właściwości funkcjonalne wszystkich innych, obecnych w niej genów.

Pełny obraz działania genów jest więc niezmiernie skomplikowany, a w organizmie wielokomórkowym wiąże się z wieloma zagadnieniami różnicowania tkankowego.

LITERATURA

- [1] Anonymous Z., 1963, Amer. Jour. Clin. Pathol., 39, 393-394.
- [2] Anonymous Z., 1962, Science, 138, 996-1000.
- [3] Attardi G., Amaldi F., 1970, Ann. Rev. Biochemistry, 39, 183-185.
- [4] Baglioni C., 1962, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48, 1880-1886.
- [5] Beale D., Lehmann H., Drury A., Tucker E. M., 1966, Nature, 209, 1099-1102.
- [6] Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E., 1963, Nature, 197, 452-454.
- [7] Beut E. A., 1949, Ann. Eugen., 14, 279-284.

- [8] Benz E., Turner P., Barker J., Nienhuis A., 1977, *Science*, 196, 1213-1214.
- [9] Bishop J. O., Pemberton R. E., Baglioni C., 1972, *Nature New Biology*, 235, 231-234.
- [10] Boyer S. H., Smith K. D., Noyes A. N., 1974, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 241, 204-222.
- [11] Brink R. A., Styles E. D., Axtell J. D., 1968, *Science*, 159, 161-170.
- [12] Capp G. L., Rigas D. A., Jones R. T., 1967, *Science*, 157, 65-66.
- [13] Capp G. L., Rigas D. A., Jones R. T., 1970, *Nature*, 228, 278-280.
- [14] Clegg J. B., Weatherall D. J., 1976, *Br. Med. Bull.*, 32, 246-250.
- [15] Darbore P. D., Lehmann H., 1976, *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 10-18.
- [16] Deisseroth A., Velez R., Anderson W. F., Nienhuis A., Kucherlapati R., Ruddle F., 1976, *Blood*, 46, 1049-1049.
- [17] Deisseroth A., Velez R., Nienhuis A., 1976, *Science*, 191, 1262-1263.
- [18] Efstradiadis A., Maniatis T., Kafatos F. C., Jeffrey A., Vournakis J. N., 1975, *Cell*, 4, 367-378.
- [19] Fox A. S., Yoon S. B., 1970, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 1608-1615.
- [20] Fraser R. C., 1966, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 25, 142-146.
- [21] Fritsch F. E., Lawn R. M., Maniatis T., 1979, *Nature*, 279, 598-603.
- [22] Gale R. E., Clegg J. B., Huehns E. R., 1979, *Nature*, 280, 162-164.
- [23] Gilman J. G., 1976, *Biochem. J.*, 155, 231-241.
- [24] Gilman J. G., Smithies O., 1968, *Science*, 160, 885-886.
- [25] Hamlyn P., 1976, *Nature*, 263, 183-193.
- [26] Harris H., 1964, *Biochemiczna genetyka człowieka*. Warszawa.
- [27] Hecht F., Motulsky A. G., Lemire R. J., Shepard T. E., 1966, *Science*, 152, 91-92.
- [28] Heller P., Yakulis V., 1969, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 165, 53-67.
- [29] *How Many Globin Genes?* 1972, *Nature*, 236, 10-11.

- [30] Huehns E. R., Flynn F. V., Butler E. A., Beaven G. H., 1961, *Nature*, 189, 496-497.
- [31] Huehns E. R., Shooter E. M., Dance N., Beaven G. H., Shooter K. V., 1961, *Nature*, 192, 1057-1059.
- [32] Huehns E. R., Dance N., Beaven G. H., Keil J. V., Hecht F., Motulsky A. G., 1964, *Nature*, 201, 1095-1097.
- [33] Huehns E. R., Hecht F., Keil J. V., Motulsky A. G., 1964, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 51, 89-97.
- [34] Huehns E. R., Farouqui A. M., 1975, *Nature*, 254, 335-337.
- [35] Huisman T. H. J., Jonxis J. H. P., Dozy A., 1955, *Biochem. Biophys. Acta*, 18, 576-577.
- [36] Huisman T. H. J., Schroeder W. A., Dozy A. M., Shelton J. R., Shelton J. B., Boyol E. M., Apell G., 1969, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 165, 320-341.
- [37] Huisman T. H. J., Schroeder W. A., Bannister W. H., Grech J. L., 1972, *Biochem. Genet.*, 7, 131-139.
- [38] Huisman T. H. J., Wrightstone R. N., Wilson J. B., Schroeder W. A., Kendall A. G., 1972, *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 850-853.
- [39] Huisman T. H. J., 1974, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 232, 107-124.
- [40] Hunt T., Lehmann H., 1959, *Nature*, 184, 872-873.
- [41] Ingram V. M., 1957, *Nature*, 180, 326-328.
- [42] Ingram V. M., Stretton A. O. W., 1962, *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 456-474.
- [43] Ingram V. M., Stretton A. O. W., 1962, *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 20-23.
- [44] Ippen K., Miller J. K., Scaife J., Beckwith J. R., 1968, *Nature*, 217, 825-827.
- [45] Kabat D., 1972, *Science*, 175, 134-140.
- [46] Kamuzora H., 1975, *Hum. Genet.*, 30, 197-205.
- [47] Kamuzora H., Lehmann H., 1975, *Nature*, 256, 511-513.
- [48] Kan Y. W., Dozy A. M., Varmus H. E., Taylor J. M., Holland J. P., Lie-Injo L. E., Ganesan J., Todd D., 1975, *Nature*, 255, 255-256.
- [49] Kunkel H. G., Wallenius G., 1955, *Science*, 122, 288-289.
- [50] Labie D., Schroeder W. A., Huisman T. H. J., 1966, *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 428-437.
- [51] Lang A., Lorkin P. A., 1976, *Br. Med. Bull.*, 32, 239-244.
- [52] Lehman W., Correll R. W., 1968, *Br. Med. J.*, 4, 748-750.

- [53] Marchalonis J. J., Nossal G. J. V., 1968, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61, 860-867.
- [54] Mantioli G. T., Niewisch H. B., 1965, Science, 150, 1824-1826.
- [55] Meideris H., Steinheider G., Osterdag W., 1974, Nature, 250, 774-775.
- [56] Miller J. W., Beckwith J. R., Muller-Hill B., 1968, Nature, 220, 1287-1290.
- [57] Moore S. L., Godley W. C., Van Vliet G., Lewis J. P., Boyd E., Huisman T. H. J., 1966, Blood, 28, 314-329.
- [58] Muller C. J., Jonxis J. H. P., 1960, Nature, 188, 949-950.
- [59] Neel J. V., 1949, Science, 110, 64-66.
- [60] Nute P. E., Pataryas H. A., Stamatoyannopoulos G., 1973, Am. J. Hum. Genet., 25, 271-276.
- [61] Ottolenghi S., Lanyon W. G., Paul J., Williamson R., Weatherall D. J., Clegg J. B., Pritchard J., Pootrakul S., Wong H. B., 1974, Nature, 251, 389-392.
- [62] Ottolenghi S., Lanyon W. G., Williamson R., Weatherall D. J., Clegg J. B., Pitcher C. S., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2294-2299.
- [63] Papayannopoulos Th., Nute P. E., Stamatoyannopoulos G., 1977, Science, 196, 1215-1216.
- [64] Pauling L., Itano H. A., Singer S. J., Wells I. C., 1949, Science, 110, 543-548.
- [65] Pemberton R. E., Housman D., Lodish H. F., Baglioni C., 1972, Nature New Biol., 235, 99-102.
- [66] Perutz M. F., Mithison J. M., 1950, Nature, 166, 677-679.
- [67] Perutz M. F., Liquori A. M., Eirich F., 1951, Nature, 167, 929-931.
- [68] Perutz M. F., 1960, Nature, 185, 416-422.
- [69] Perutz M. F., 1964, Sci. Amer., 211, 64-76.
- [70] Price P. M., Conover J. H., Hirschhorn K., 1972, Nature, 237, 340-342.
- [71] Proudfoot N. J., Brownlee G. C., 1976, Br. Med. Bull., 32, 251-256.

- [72] Rigas D. A., Koler R. D., Osgood E. E., 1956, J. Lab. Clin. Med., 47, 51-64.
- [73] Romera-Herrera A. E., Darbore P. D., Lehmann H., 1976, Biochim. Biophys. Acta, 420, 350-357.
- [74] Schroeder W. A., Shelton J. R., Kleihauer E. F., Dozy A. M., Robberson B., 1968, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 537-544.
- [75] Stegink L. D., Meyer P. D., Chalkley R., 1971, Anal. Biochem., 41, 351-359.
- [76] Stohlman F., Ebbe S., Morse B., Howard D., Donovan J., 1968, Ann. N. Y. Acad. Sci., 149, 156-164.
- [77] Till J. E., McCulloch E. A., Siminovitch L., 1964, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51, 29-36.
- [78] Tolstoshev P., 1976, Nature, 259, 95-98.
- [79] White J. C., Beaven G. H., 1959, Br. Med. Bull., 15, 33-39.
- [80] White J. M., Lang A., Lorkin P. A., Lehmann H., 1972, Nature New Biol., 235, 208-210.
- [81] Williamson R., 1976, Br. Med. Bull., 32, 246-250.
- [82] Wilson J. B., Adams H. R., Huisman T. H. J., 1969, Biochim. Biophys. Acta, 181, 367-372.
- [83] Wood W. G., Weatherall D. J., 1973, Nature, 244, 162-165.
- [84] Wood W. G., 1976, Br. Med. Bull., 32, 282-287.
- [85] Van Vliet G., Huisman T. H. J., 1964, Biochem. J., 93, 401-409.

Laboratorium Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Łódzkiego

Justyna Hryniewicz, Roman Gondko

HUMAN GLOBIN GENES

There are a lot of contradictory ideas upon the number of human hemoglobin genes. The aim of this paper is to summarize the latest publications concerning this problem. As it has been stated in the last few years, there are two α -genes and a six non- α genes complex located on the chromosome as

follows: 5' $\epsilon - \zeta - \gamma^G - \gamma^A - \delta - \beta 3'$. The newest hypotheses are presented on the control mechanism of the regulatory process of the globin genes, with special interest in the switch from the embryonic hemoglobin synthesis to foetal form and from the foetal to the adult form of hemoglobin during ontogenesis.