

Zofia M. Kiliańska, Anetta Ptasińska

ZMIANY W JĄDRACH KOMÓRKOWYCH WYWOŁANE SZOKIEM TERMICZNYM

Ekspozycja komórek na podwyższoną temperaturę (43–48°C) przyczynia się do wzrostu ogólnej masy białek, które współizolują się z jądrami komórkowymi. Główny fizjologiczny efekt szoku cieplnego w jądrach komórkowych to hamowanie replikacji i naprawy DNA, a także syntezy i dojrzewania RNA. Stwierdzono, że indukowany szokiem wzrost masy białek pozostaje w korelacji ze zmianami w ultrastrukturze i składzie polipeptydowym szkieletu jądrowego – matriks jądrowej.

WSTĘP

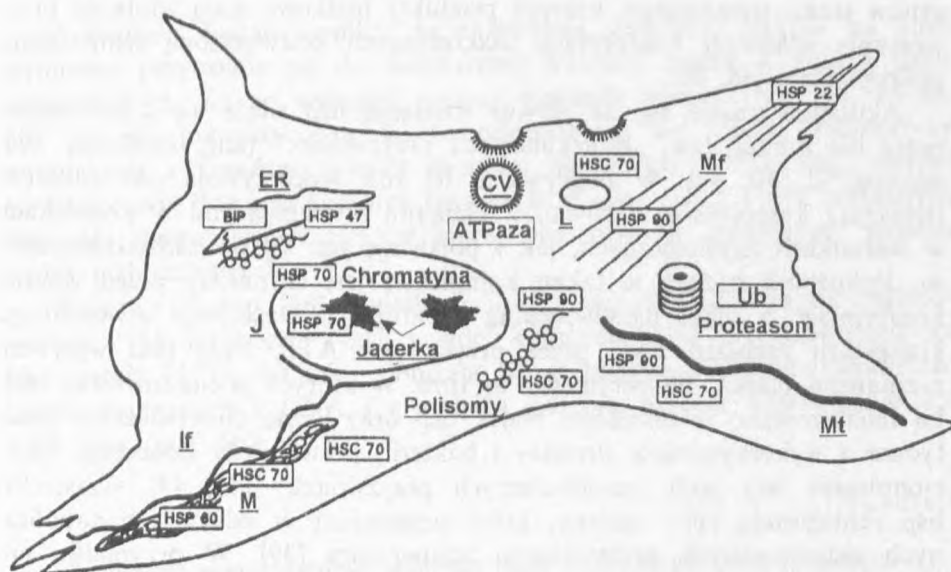
Organizmy prokariotyczne i eukariotyczne w odpowiedzi na wzrost temperatury (5–10%) powyżej wartości fizjologicznej syntetyzują białka szoku termicznego (ang. *heat shock proteins; hsp*) [17, 44, 45, 53, 62, 64]. Białka te stanowią produkt ekspresji genów opisywanych również symbolem *hsp*, które udało się zidentyfikować, sklonować oraz scharakteryzować [10, 11, 29, 57, 70]. Okazało się, że geny *hsp* podlegają aktywacji również przez inne czynniki stresogenne. Ich stale wydłużająca się lista obejmuje związki chemiczne, czynniki nefizjologiczne, trucizny, inhibitory enzymów, itd. Należą do nich m. in. etanol, analogi aminokwasów, puromycyna, metale ciężkie, czynniki chelatujące jony dwuwartościowe, arseniany, jodoacetamid, nadtlenek wodoru, anionorodniki ponadtlenkowe, inhibitory fosforylacji oksydacyjnej, hydroksyloamina, salicylan sodu, jonofory [1, 44]. W komórkach niestresowanych obecne są białka o podobnej strukturze pierwszorzędowej, opisywane jako *hsc* (ang. *heat shock cognate*). Potencjalne możliwości stosowania podwyższonej temperatury – hipertermii w medycynie powoduje duże zainteresowanie efektami, jaki ten czynnik wywołuje w metabolizmie, ultrastrukturze i w funkcjonowaniu organelli komórkowych.

WPŁYW SZOKU TERMICZNEGO NA KOMÓRKI

Białka kodowane przez geny aktywowane szokiem termicznym – hsp stanowią zespół ok. 50 polipeptydów [39, 49]. Przyjmując jako kryterium masę cząsteczkową (m.cz.) wyróżnia się wśród nich trzy rodziny: niskocząsteczkowe hsp 20–30 (18–30 kDa), średnicząsteczkowe hsp 60–70 (56–78 kDa) i wysokocząsteczkowe hsp 100 (80–100 kDa). Powyższy podział nie jest idealny, zidentyfikowano bowiem białka hsp nie mieszczące się w powyższej klasyfikacji [39]. Funkcje większości białek indukowanych hipertermią poznano dzięki badaniom ich izoform konstytutywnych – hsc [49]. W prawidłowych komórkach białka hsc70 występują w większości przedziałów komórkowych, tj. w cytosolu, mitochondriach, aparacie Golgiego, endoplazmatycznym retikulum (ER). W wyniku zadziałania podwyższonej temperatury białka tej rodziny ulegają translokacji do jądra komórkowego, gdzie ulegają nagromadzeniu [28, 56, 67]. Wcześniejsze prace sugerowały wybiórczą lokalizację białka hsp70 w jąderku [41]. Dotyczyły one jednak krótkotrwałej ekspozycji komórek na hipertermię (1–3 godz.). Dłuższe działanie szoku termicznego (komórki HeLa; 24 godz.), który jest jednocześnie czynnikiem stabilizującym szkielet jądrowy [3, 23, 30], powoduje nagromadzenie hsp70 w matriks jądrowej [31, 36, 58]. Przeciwciała rozpoznające białka hsp70 reagują krzyżowo z polipeptydami o m.cz. ok. 70 kDa wielu nawet odległych ewolucyjnie organizmów, co potwierdza ich daleko posuniętą konserwatywność [24]. Członkowie rodziny hsp 80–100 przeważają w cytosolu, choć spotyka się je w endoplazmatycznym retikulum [39]. Mogą tworzyć kompleksy z tubuliną, wimentyną, aktyną, kalmoduliną oraz niektórymi kinazami białkowymi (por. rys. 1). Ponadto przedstawiono wyniki wskazujące, że zewnątrzkomórkowe receptory hormonów wchodzi w interakcje z hsp90, a następnie w połączeniu z hsp70 i hsp56 formują „transportosom” przenoszący receptor między cytoplazmą a jądrem komórkowym [49]. Wciąż słabo poznane niskocząsteczkowe białka hsp najszerszej opisano u drożdży i roślin [39]. U roślin lokalizują się głównie w cytosolu, choć opisano je również w mitochondriach, chloroplastach i endoplazmatycznym retikulum [12, 19, 27]. U zwierząt opisano je w kompleksach z aktyną [34].

Welch i Suhan [67] na podstawie obszernych analiz w mikroskopie elektronowym fibroblastów szczura, kontrolnych i poddanych działaniu temperatury 42–43°C przez 3 godz., opisali następujące zmiany wywołane tym czynnikiem:

- niszczenie i fragmentację aparatu Golgiego, łagodne nabrzmiewanie siateczki ER, nagromadzenie w obszarze okołojądrowym elementów błonistych,



Rys. 1. Rozmieszczenie białek szoku termicznego w komórce (wg Schlesingera [49]; za zgodą Autora). Główne białka asocjujące z różnymi organelami komórkowymi ujęto w ramki. Na schemacie zaznaczono: J – jądro komórkowe; ER – endoplazmatyczne retikulum; elementy cytoszkieletu: Mf – mikrofilamenty; Mt – mikrotubule; If – filanty pośrednie; M – mitochondria; CV – ośrodkowe pęcherzyki; L – lizosom; Ub – ubiquityna; BIP – izoforma hsp70; białko wiążące łańcuch ciężki immunoglobulin

– nabrzmiewanie mitochondriów z gęstym upakowaniem grzebieńi, czemu towarzyszy powiększenie przestrzeni między grzebieńiami,

– załamanie i dezorganizacja ciągłości cytoszkieletu, związane głównie z agregacją filamentów pośrednich oraz filamentów aktynowych wokół jąder komórkowych,

– pojawianie się wewnątrz jąder komórkowych pałeczkowatych tworów, reorganizacja sieci włókien w jąderkach.

Zmiany ultrastruktury i funkcjonowania komórek stresowanych podwyższoną temperaturą mogą przebiegać dwoma torami, tj.:

1) przez ograniczenie rozpuszczalności wielu białek (głównie jądrowych) i ich agregacji m. in. na elementach szkieletu jądrowego [24, 55, 66]. Wytrącone i zagregowane białka o zmienionej konformacji tracą częściowo lub całkowicie swoją aktywność biologiczną. Z kolei funkcje szkieletu jądrowego, zwanego również matriks lub macierzą jądrową, któremu przypisuje się pierwszoplanową rolę w metabolizmie jądrowym oraz w utrzymaniu architektury jądra komórkowego [4–6, 13, 14, 22, 32] ulegają zakłóceniu wskutek agregacji na jego powierzchni białek indukowanych szokiem termicznym [20, 62, 64];

2) przez zmniejszenie biosyntezy białek prawidłowych, a indukcję ekspresji genów szoku termicznego, których produkty białkowe mają zdolność przywracania właściwej konformacji uszkodzonych podwyższoną temperaturą polipeptydom [48, 49].

Aktualnie uznaje się, że główne działanie hsp wiąże się z pełnieniem przez nie funkcji tzw. „molekularnych przyzwoitek” (ang. *molecular chaperones*) [2, 40, 49]. W odgrywaniu tej roli wykorzystują one zdolność tworzenia kompleksów zarówno z białkami występującymi w komórkach w warunkach fizjologicznych, jak i pojawiających się po zadziałaniu stresu. Polipeptyd będący w takim kompleksie jest chroniony przed zmianą konformacji, a także nieodwracalną denaturacją. Dysocjacja utworzonego kompleksu zachodzi bądź przez przyłączenie ATP, bądź pod wpływem nieznanego białka. Eksperymenty *in vitro*, w których zdenaturowane białka renaturowano w obecności białek hsp oraz liczne doświadczenia genetyczne z wykorzystaniem drożdży i bakterii, potwierdziły koncepcję funkcjonowania hsp jako „molekularnych przyzwoitek” [40, 49]. Częsteczki hsp funkcjonują jako enzymy, które uczestniczą w szlakach metabolicznych aktywowanych podwyższoną temperaturą [39]. W przypadku enzymów cyklu glikolitycznego komórek stresowanych hipertermią dochodzi do wzrostu ich aktywności, dzięki czemu mogą one korzystać z beztlenowego pozyskiwania ATP. Doniesiono również o zwiększonej aktywności enzymów związanych z ATP-zależną ubikwitynacją białek [26]. Umożliwia to usuwanie zdenaturowanych białek z komórek stresowanych temperaturą. Opisano przykłady niektórych enzymów w komórkach po hipertermii, których aktywność jest regulowana tym czynnikiem stresogennym, m. in. enzymów zaangażowanych w zwijanie łańcuchów polipeptydowych, np. izomeraza *cis/trans* peptydyloprolilowa [6, 9], czy ich fosforylację [21].

Stosunkowo mało wrażliwe na łagodny stres termiczny, pomimo pewnych zmian w ultrastrukturze, są mikrotubule, siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego i pęcherzyki wydzielnicze [49, 67]. Również drogi przenoszenia sygnału są niezbyt wrażliwe na hipertermię, co potwierdzono badając cykl inozytolotrifosforanowy oraz efekt różnych stężeń jonów Ca^{2+} i ATP, a także różne wartości pH [49]. Podwyższona temperatura okazuje silny wpływ na strukturę, replikację i transkrypcję DNA, stopień upakowania chromatyny, modyfikację histonów, składanie i dojrzewanie prekursorów mRNA i rRNA, tworzenie rybosomów [20].

Niniejszy artykuł dotyczy zmian w ultrastrukturze i składzie polipeptydowym jąder, a głównie ich struktur szkieletowych w komórkach poddanych hipertermii, które okazują wpływ na metabolizm komórkowy.

WPŁYW SZOKU TERMICZNEGO NA JĄDRA KOMÓRKOWE

Z licznych badań wynika, że ekspozycja komórek ssaków na stres termiczny przyczynia się do zwiększonej asocjacji białek z frakcją jąder komórkowych, na co wskazuje wyższy stosunek białko/DNA [24, 46–48, 60]. Po raz pierwszy zjawisko to odnotowano we frakcji chromatyny wydzielonej z komórek jajnika chomika chińskiego (CHO; ang. *chinese hamster ovary*) [54] oraz komórek raka szyjki macicy – HeLa [46], poddanych działaniu szoku termicznego, w której obserwowano zwiększony poziom białek niehistonowych.

Warters i wsp. [66] donieśli, że ilość białek ekstrahowanych zbuforowanym 2 M roztworem NaCl z jąder komórek CHO ekspozycyjnych na hipertermię (45°C, 30 min) obniżała się o połowę, natomiast zawartość białek związanych z DNA i z matriks jądrową wzrosła odpowiednio 2,2 i 3,4 razy (tab. 1).

Tabela 1

Porównanie wewnątrzjądrowej zawartości białek w komórkach CHO kontrolnych i poddanych hipertermii [66]

Rodzaj białek jądrowych	Komórki kontrolne	Komórki poddawane szokowi
Białka rozpuszczalne	0,794 ± 0,024	0,399 ± 0,050
Białka związane z DNA	0,076 ± 0,020	0,166 ± 0,048
Białka matriks jądrowej	0,129 ± 0,020	0,434 ± 0,049

Komórki znakowano mieszaniną ³H-aminokwasów. Jądra otrzymane z komórek kontrolnych lub poddanych hipertermii (45°C, 30 min) ekstrahowano zbuforowanym 2 M roztworem NaCl (białka rozpuszczalne). DNA usuwano z pozostałości jądrowej przez trawienie DNazą I i ponowną ekstrakcję zbuforowanym 2 M roztworem NaCl (białka związane z DNA). Pozostałość jądrową traktowano jako matriks jądrową. Wyniki przedstawiono jako stosunek radioaktywności poszczególnych frakcji do całkowitej radioaktywności jąder komórkowych.

Wzrost wartości stosunku białko/DNA zależy od wysokości temperatury, czasu ekspozycji na jej działanie i wynika ze zwiększenia masy białek w jądrach komórkowych. Bezpośrednio po zadziałaniu podwyższonej temperatury w różnych przedziałach czasu, tj. 43°C/15 min; 44°C/15 min; 45°C/7,5 min; 45°C/10 min i 45°C/15 min zaobserwowano w jądrach komórek CHO wzrost masy białek odpowiednio 1,37; 1,64; 1,58; 2,02 i 2,30 razy w porównaniu z wartościami kontrolnymi [20].

Białka pojawiające się w jądrach komórek HeLa indukowanych szokiem termicznym zostały nazwane dodatkowymi i opisane symbolem HIENP (ang. *heat induced excess nuclear proteins*) [24]. Warters i Brizgys [64]

oszacowali, że aż ok. 70% białek obecnych w jądrach komórkowych po hipertermii ulega asocjacji z matriks jądrową. Pojawienie się białek HIENP wydaje się być spowodowane adsorpcją oraz agregacją poprzednio rozpuszczalnych polipeptydów na elementach bardziej nierozpuszczalnych – DNA i białkach struktur szkieletowych oraz przemieszczaniem białek z cytoplazmy do jąder komórkowych (ok. 30%). Podjęto próbę charakterystyki na drodze elektroforezy dwuwymiarowej w żelu poliakrylamidowym białek frakcji jądrowych wydzielonych z komórek kontrolnych i poddanych szokowi termicznemu. Stwierdzono, że istotnymi ilościowo składnikami HIENP są członkowie rodziny hsp70. Ta rodzina białek reprezentuje składniki pochodzenia cytoplazmatycznego; obecność w jądrze spowodowana jest migracją jej członków z cytoplazmy. Oprócz hsp w skład HIENP wchodzi polipeptydy o m.cz. 130, 95, 75, 58, 53, 46, 37, 28 i 26 kDa.

Za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC; ang. *differential scanning calorimetry*) wykazano, że białka jądrowe, których denaturacja następuje w przedziale temperatury 42–60°C, ulegają ekstrakcji podczas wydzielania z komórek kontrolnych [8]. Okazało się, że większość termolabilnych polipeptydów pozostaje w tej strukturze, gdy komórki ulegają stresowi. Przypuszcza się, że zmniejszenie rozpuszczalności białek podczas hipertermii jest wynikiem ich denaturacji. Konsekwencją wzrostu oddziaływań międzycząsteczkowych w tak zmienionych polipeptydach jest ich agregacja i tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów. Białka HIENP w wyniku asocjacji z matriks jądrową ograniczają ruchy superskręconej cząsteczki DNA. Ich obecność hamuje syntezę DNA oraz mechanizm naprawy jego uszkodzeń powstałych w wyniku działania promieniowania jonizującego czy UV. Polipeptydy te ograniczają proces transkrypcji, a także wydarzenia potranskrypcyjne i wywołują zmiany w lokalizacji polimeraz DNA.

Charakterystyka i dalsza identyfikacja białek, których ilość rośnie podczas szoku termicznego, jest niezbędna do zrozumienia złożonych mechanizmów odpowiedzi komórkowej na ten typ stresu oraz procesu śmierci komórek nim indukowanej. Do polipeptydów, które zmieniają swoją rozpuszczalność pod wpływem hipertermii należą m.in. polimerazy DNA i RNA, białka kompleksu replikacyjnego, hnRNP i produkt genu *c-myc* [24, 25].

Metabolizm w jądrach komórkowych poddanych działaniu podwyższonej temperatury

Matriks jądrowa stanowi fizyczną podporę utrzymującą DNA w postaci upakowanej; struktura ta zawiera zespół enzymów niezbędnych do jego

replikacji, naprawy i ekspresji [13]. W puli DNA jądrowego można wyróżnić dwie frakcje: 1) główną, stanowiącą około 75% ekstrahowanego z izolowanych jąder za pomocą zbuforowanego 0,2 mM roztworu $MgCl_2$ oraz 2) zasocjowaną ze szkieletem jądrowym, stanowiącą 25% całości jądrowego DNA. Tę ostatnią można dalej rozdzielić na frakcję rozpuszczalną w zbuforowanym 2 M roztworze NaCl oraz resztkową, reprezentującą ok. 1% całości jądrowego DNA, ściśle związaną ze strukturą opisywaną jako matriks jądrowa III [6].

Szok termiczny wpływa na biosyntezę DNA – m. in. na tworzenie nowych replikonów, przyłączanie nukleotydów do rosnącego łańcucha DNA, jego dojrzewanie, a także wiązanie maszyneryj replikacji DNA (ang. *clustersome*) do chromosomu [65]. Zaobserwowano różnice we wrażliwości poszczególnych etapów replikacji na hipertermię. Etap elongacji łańcucha DNA wydaje się być oporny na podwyższoną temperaturę (43,5°C) i nie dochodzi do jego hamowania nawet przy inkubacji w czasie 60 min. Zaobserwowano, że wiązanie histonów do powstającego DNA zachodzi szybciej w temperaturze 42°C niż 37°C. Każdy z tych etapów wydaje się być związany z matriks jądrową i okazuje odmienną wrażliwość na hipertermię. Podwyższona temperatura najsilniej hamuje wiązanie „clustersomów” do chromosomu i dojrzewanie nowo syntetyzowanego łańcucha w ostateczną postać DNA. Zahamowanie wiązania „clustersomów” do DNA jest czynnikiem warunkującym tworzenie nowych replikonów i ograniczającym semikonserwatywną replikację. Podczas ekspozycji na temperaturę 43°C (lub wyższą) aktywność dojrzewania zmniejsza się przynajmniej o 50% lub jest zahamowana. Natomiast w czasie inkubacji w temperaturze 45°C dojrzewanie DNA w ogóle nie zachodzi, a ilość wyznakowanego DNA związanego z matriks jądrową wzrasta. Powyższe warunki hipertermii blokują dojrzewanie DNA przy aktywnej elongacji jego łańcucha, co wskazuje na oddzielenie aktywności tych dwóch etapów. Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że przeniesienie komórek inkubowanych uprzednio w podwyższonej temperaturze (45°C, 30 min) do temperatury 37°C doprowadza do przywrócenia dojrzewania powstającego łańcucha DNA, jednak wydajność tego procesu jest znacznie niższa. Zachodzi on 35–45 razy wolniej niż w kontroli [65].

W poszukiwaniu wyjaśnienia molekularnych podstaw hamowania replikacji DNA wywołanej hipertermią podjęto analizę aktywności enzymów związanych z tym procesem, tj. polimerazy DNA α i β oraz topoizomerazy II, białek wykazujących zdolność do asocjacji ze szkieletem jądrowym [66]. Szok termiczny zmniejsza aktywność wymienionych enzymów w komórce, przy czym polimeraza DNA β okazała się bardziej nań wrażliwa niż α .

Aktywność polimerazy DNA α i β w jądrach komórek CHO, które poddano hipertermii (45,5°C; 0–30 min), po ich wydzieleniu, pozostaje w logarytmicznej zależności od czasu działania czynnika stresogenego

i okazała się niższa niż w przypadku wartości uzyskiwanych dla tych enzymów w całych komórkach indukowanych szokiem w analogicznym czasie. Stopień utraty aktywności tych enzymów, niższy w przypadku całych komórek, wynika zapewne z faktu słabej zdolności usuwania przez ekstrakcję polimeraz z jąder indukowanych termicznie, w których dochodzi do ogólnego wzrostu białek, w tym enzymatycznych. Zbliżoną tendencję opisano w przypadku topoizomerazy, aczkolwiek enzym ten okazał się bardziej termostabilny. Oszacowano, że inaktywacja (w temp. 45,5°C) w 50% aktywności DNA polimerazy α i β wymagała odpowiednio 10 i 15 min., podczas gdy czas potrzebny do analogicznego spadku aktywności topoizomerazy wynosił 30 min [66].

Mills i Meyn [33] wskazali, że hipertermia wespół z promieniowaniem jonizującym przyczynia się do podwyższenia poziomu uszkodzeń DNA, przy czym nadwrażliwość wynika z zaburzeń naprawy DNA. Autorzy ci zaobserwowali korelację między wzrostem ilości białka a zahamowaniem naprawy DNA w komórkach CHO poddanych działaniu podwyższonej temperatury. Wykorzystując ten sam model doświadczalny – komórki CHO – w laboratorium Wartersa [63] podjęto poszukiwania związku między przyrostem masy białek a zaburzeniami w procesie naprawy pojedynczych pęknięć DNA w komórkach poddanych hipertermii [43, 44 i 45°C]. Przy ocenie zdolności naprawczych komórek wybrano jako parametr czas półtrwania uszkodzeń indukowanych określoną dawką (10 Gy) promieniowania X. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wykazały, że pod wpływem podwyższonej temperatury maleje zdolność naprawy pojedynczych pęknięć DNA oszacowana wzrostem okresu półtrwania uszkodzeń. Hamowanie naprawy DNA pozostawało w ścisłej korelacji z przyrostem ilości białek współizolowanych z matriks jądrową, przy czym wymagany był progowy, około dwukrotny wzrost do zapoczątkowania hamowania. Taką korelację potwierdziła ponadto zbliżona kinetyka powrotu do wartości kontrolnych zdolności naprawczych i masy białek jądrowych. Oszacowana zależność między wzrostem masy białek matriks jądrowej a hamowaniem naprawy DNA sugeruje, że obecność dodatkowych białek w tej istotnej strukturze, stanowiącej rusztowanie dla zorganizowania DNA w domeny strukturalne i funkcjonalne, odpowiada za upośledzenie naprawy DNA, wywołane szokiem termicznym. Jak dotąd rozpatruje się dwie możliwości wyjaśniające wpływ wzrostu ilości białek nukleoskieletu na zaburzenia naprawy DNA [63]: 1) białka HIENP mogą ograniczać aktywność enzymów reperacyjnych przez utrudnienie dostępności uszkodzeń bądź przez agregację tych enzymów na elementach szkieletu jądrowego; 2) zwiększona ilość białek (np. histonów) związanych z matriks jądrową może zmieniać konformację DNA i strukturę chromatyny.

Na uwagę zasługują badania zmierzające do wyjaśnienia wpływu hipertermii na proces transkrypcji. W doświadczeniach Fischera i wsp. [15] wykorzystano jako model zapłodnione jaja *Drosophila melanogaster*. Badacze ci wykazali, że dwie duże podjednostki polimerazy RNA II o m.cz. 215 i 140 kDa w komórkach kontrolnych są związane z „rozpuszczalną frakcją” jądrową, natomiast w komórkach eksponowanych na podwyższoną temperaturę (37°C, 15 min) większość cząsteczek białka enzymatycznego asocjuje z matriks jądrową. W dalszych eksperymentach podjęto analizę aktywności polimerazowej enzymu. W tym celu wykorzystano metodę transkrypcji *in vitro* (z³²P-UTP) w obecności (lub bez) inhibitora polimerazy RNA II – α -amanityny. Okazało się, że wraz z czasem ekspozycji komórek na podwyższoną temperaturę spada aktywność polimerazowa, a po 2 godz. inkubacji w temperaturze 37°C proces transkrypcji ulega blokowaniu. Asocjacja polimerazy RNA II z matriks jądrową nie wydaje się być przypadkowa, gdyż zidentyfikowano w niej obecność dużych podjednostek (215 i 140 kDa), co wskazuje na związanie z tą strukturą holoenzymu, a nie zdenaturowanych podjednostek. Interakcja polimerazy RNA II ze składnikami szkieletu jądrowego prawdopodobnie zwiększa „ochronę” enzymu przed wpływem hipertermii. Aktualnie uważa się, że ten typ stresu przyczynia się do „przestawienia” transkrypcji. Większość typowych szlaków transkrypcji zatrzymuje się, zaś włączają się nowe, np. transkrypcji ulegają geny *hsp*.

Ostatnio przedstawiono dowody wskazujące, że pierwotny transkrypt mRNA wiąże się z matriks jądrową, a kompleksy rybonukleoproteinowe budują jej sieć wewnętrzną [71]. Wiele badań wskazuje, że wieloenzymatyczne kompleksy prowadzące biosyntezę pre-rRNA oraz zespół zdarzeń towarzyszących jego dojrzewaniu (ang. *processing*) są bezpośrednio zasocjowane z elementami matriks jądrowej. Stąd wysoce prawdopodobne wydają się sugestie, że szok termiczny przyczynia się do wzrostu zawartości białek jądrowych, które mogą wiązać się z maszyną enzymatyczną i hamować dojrzewanie RNA [59].

Coss i Wachsbarger [58] przedstawili wyniki badań nad lokalizacją białek C kompleksu hnRNP zaangażowanych w proces dojrzewania pre-mRNA i wiążących hnRNP do matriks jądrowej. Białka C dołączają się do polipirymidynowego 3' końca intronów, udostępniając w ten sposób sekwencje pierwotnego transkryptu w konformacji umożliwiającej jego składanie (ang. *splicing*), co wskazuje na pełnienie przez nie funkcji molekularnej opieki [16]. Za pomocą monoklonalnych przeciwciał (4F4), skoniugowanych ze złotem (tzw. technika immunozłocenia), zlokalizowano białka C w matriks jądrowej komórek CHO stresowanych i kontrolnych. Pozytywną reakcję immunozłocenia obserwowano głównie w sieci włókien matriks jądrowej i resztkowym jąderku, zarówno w preparatach pochodzących

z komórek poddawanych szokowi termicznemu, jak i kontrolnych. Ponadto w materiale jądrowym po hipertermii wykazano wzrost intensywności fluorescencji przeciwciał skierowanych przeciw białkom C. Na tej podstawie przypuszcza się, że podwyższona temperatura wpływa na wzrost i/lub stabilizację wiązania białek C kompleksu hnRNP w jąderku i włóknach matriksu jądrowej. Nagromadzenie białek C w miejscach syntezy rRNA może hamować proces dojrzewania pre-rRNA oraz jego transport [58].

Hipertermia hamuje składanie pre-mRNA i w ten sposób blokuje matrycę w syntezie nieprawidłowych białek, które mogłyby być szkodliwe dla komórki [16]. Szok termiczny (podwyższona temp. przez 1–2 godz.) prowadzi *in vitro* do inaktywacji składania pre-mRNA w ekstraktach jądrowych komórek HeLa. W takich warunkach struktura cząstek różnych U-snRNP, które są składnikami spliceosomów, ulega zmianom. Na podstawie badań immunologicznych stwierdzono, że cząstki U-snRNP, które uczestniczą w dojrzewaniu pre-mRNA tworzą w nukleoplazmie siateczkę połączoną z włóknami matriksu jądrowej [50]. W wyniku działania podwyższonej temperatury układ sieci tworzonej przez cząstki U-snRNP ulega rozproszeniu. Ostatnio opublikowane wyniki badań ujawniły, że szok (45°C, 10 min) prowadzi do znacznej inaktywacji składania *in vitro* pre-mRNA β globiny oraz podstawowego czynnika transkrypcyjnego Sp1 i prawie całkowicie blokuje dojrzewanie pre-mRNA Sp4. Wykazano, że blokowanie składania prekursorowej cząstki mRNA w ekstraktach komórek poddanych działaniu podwyższonej temperatury (45°C, 10 min) jest wynikiem oddysocjowania białek M z kompleksu hnRNP i silnego związania z matriksu jądrową. Białka te mogą pełnić funkcję „molekularnej opiekuńki”, wiążąc się do homorybopolimerów poli(G) i poli(A), w ten sposób zmieniać konformację pre-mRNA. Proces ten jest odwracalny po 6 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C. Przypuszcza się, że omawiane antygeny mogą stanowić włączniki i/lub wyłączniki składania pre-mRNA [16].

Lee i wsp. [25] wykazali, że hipertermia powoduje uwalnianie nowosyntetyzowanych białek z polisomów i ich nagromadzenie w jądrze komórkowym. Analiza elektroforetyczna i autoradiograficzna białek komórek CHO znakowanych przez 2 min. [³⁵S]-metioniną, a następnie poddanych działaniu podwyższonej temperatury (45,5°C, 10 min), dostarczyła wyników świadczących, że w jądrach komórek tak traktowanych znajduje się ok. 10 razy więcej radioaktywnych polipeptydów niż w kontrolnych. Hydrofobowe regiony nowosyntetyzowanych białek są eksponowane na powierzchni. Polipeptydy te charakteryzują się szerokim zakresem mas cząsteczkowych, znaczną ich część stanowią składniki niskocząsteczkowe, zbudowane z ok. 10–100 reszt aminokwasowych (m.c. 1–14 kDa). Nagromadzone białka związane z matriksu jądrową mogą oddziaływać na proces replikacji DNA,

jego naprawę i transkrypcję. Na podkreślenie zasługują obserwacje, że inhibitory translacji (cykloheksymid, puromycyna czy histydynol) ograniczają biosyntezę potencjalnie cytotoksycznych białek i stanowią czynnik ochraniający przed podwyższoną temperaturą [51, 52].

Przywrócenie poziomu prawidłowej syntezy DNA, RNA i białek, zahamowanej przez hipertermię, wymaga rozbicia kompleksów przez nią indukowanych [20]. Zmniejszenie zawartości białek jądrowych w czasie inkubacji w temperaturze 37°C początkowo przebiega bardzo szybko, natomiast w miarę zbliżania się do wartości kontrolnej znacznie słabnie. Wykazano liniową zależność między procesem zmniejszania poziomu białek do wartości 125% kontroli a odzyskaniem pełnej sprawności komórek w syntezie RNA i białek. Wydaje się, że opisana zależność dla replikacji DNA ma charakter wprost proporcjonalny, co potwierdzono w szerokim zakresie oddziaływania na komórki szoku termicznego (w czasie od 30 min do 60 godz.) powodującego jej blok. Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami przedstawionymi przez badaczy [61, 68] replikacja DNA jest bardziej wrażliwa na hipertermię niż synteza RNA i białek. Wzrost poziomu białek jądrowych nagromadzonych w różnych substrukturach jądra komórkowego może być przyczyną odmiennej wrażliwości syntezy DNA i RNA na szok termiczny. Ponadto pojawienie się dodatkowych białek jądrowych wpływa na stopień skręcenia DNA. Wydaje się, że podczas transkrypcji DNA charakteryzuje niższy poziom relaksacji niż podczas replikacji, co może tłumaczyć odmienna wrażliwość omawianych procesów na stres termiczny.

Pozostaje otwartym pytanie, czy istnieje związek między czasem wymaganym do wznowienia pełnej syntezy DNA, RNA i białka a okresem, w którym dochodzi do odzyskania prawidłowej struktury matriks jądrowej zmienionej hipertermią? Na uwagę zasługują wyniki ostatnio prezentowanych eksperymentów [59], w których stwierdzono, że w 20 godz. po zastosowaniu szoku (45°C, 20 min) poziom syntezy RNA stanowi tylko 8% wartości obserwowanej w kontroli. Okazało się, że w tych warunkach ultrastruktura matriks jądrowej aż w 90% przypomina analogiczną strukturę komórek niestresowanych. Na tej podstawie można wnioskować, że przywrócenie prawidłowej postaci szkieletu jądrowego następuje przed wznowieniem pełnej syntezy RNA. Jednak nie można wykluczyć, że transkrypcja określonych podklas RNA (pre-rRNA, pre-rRNA, czy snRNA) jest nieodzowna do powrotu prawidłowej struktury matriks jądrowej, zmienionej przez hipertermię. Integralność szkieletu jądrowego jest uzależniona od obecności RNA, co potwierdzają wyniki licznych badań [3, 18, por. 23].

Zmiany w metabolizmie jądrowym indukowane podwyższoną temperaturą znajdują odzwierciedlenie w składzie chemicznym i obrazach ultrastruktury matriks jądrowej [55, 58].

Zmiany w ultrastrukturze i składzie chemicznym matriks jądrowej wywołane hipertermią

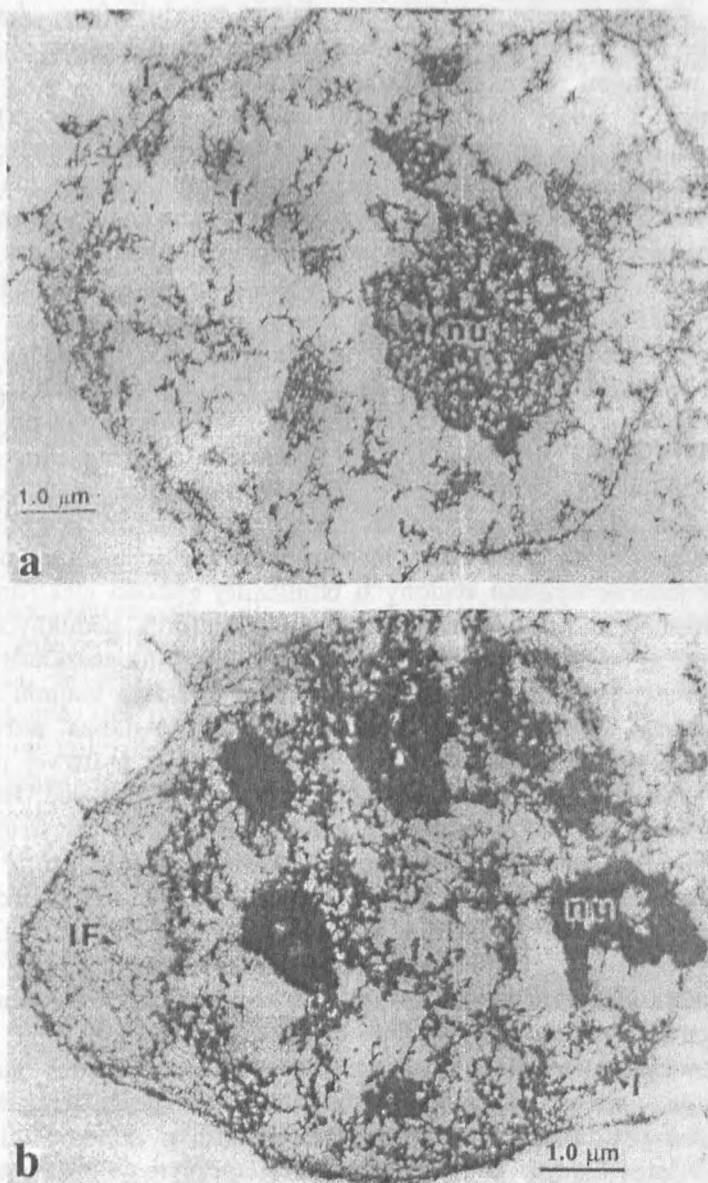
Matriks stanowi szkielet jąder komórkowych, który pozostaje w tej strukturze po ich ekstrakcji solami, detergentami oraz trawieniu nukleazami [4–6, por. 22, 23]. Ta definicja ma charakter operacyjny i jest stosowana dla resztkowej, pozachromatynowej infrastruktury jądra komórek interfazowych. W jej skład wchodzi: 1) resztkowa otoczka jądrowa (ang. *residual envelope*) nazywana również warstwą peryferyczną, zbudowana z blaszki i porów otoczki jądrowej; 2) resztkowe jąderko (a), zwane również matriks jąderkowy; 3) sieć włóknisto-ziarnista (ang. *internal matrix*) łącząca powyższe elementy strukturalne (rys. 2a).

Ultrastruktura i skład chemiczny matriks jądrowej w znacznym stopniu zależą od sposobu jej wydzielenia, tj. 1) kolejności ekstrakcji jąder komórkowych; 2) sposobu usunięcia histonów (NaCl, LIS, siarczan amonu, polianiony: siarczan dekstranu-heparyna); 3) stosowania detergentów wymywających lipidy (dezoksycholan sodu, Nonidet NP-40, Triton X-100, Tween 40, saponina); 4) enzymów nukleolitycznych (DNaza I, mikrokokalna nukleaza, RNaza A, restrykazy) oraz 5) obecności jonów dwuwartościowych [5, 6, por. 23, 37, 38]. Do istotnych różnic w składzie chemicznym preparatów matriks jądrowej przyczyniają się: eliminacja w sposobie ich izolowania, trawienia RNazą, blokowanie grup tiolowych, umożliwienie powstania wewnątrzcząsteczkowych połączeń białek poprzez mostki disiarczkowe oraz stabilizacja termiczna [por. 23, 32].

Różnice w ultrastrukturze matriks jądrowej komórek poddanych działaniu podwyższonej temperatury jako pierwsi odnotowali Warters i wsp. [62]. Analiza preparatów matriks jąder komórek HeLa kontrolnych i poddanych hipertermii, zarówno w klasycznym mikroskopie elektronowym jak i skaningowym, ujawniła znaczne różnice głównie dotyczące sieci włóknisto-ziarnistej oraz warstwy peryferycznej.

Badania matriks komórek erytroleukemicznych myszy (ang. *mouse erythroleukemia cells*; MEL), wydzielonej z jąder stabilizowanych *in vitro* w temperaturze 37°C, oraz komórek poddawanych szokowi termicznemu *in vivo* (43°C, 15 min) sugerują, że natura stabilizacji *in vitro* jest odmienna od tej wywołanej stresem *in vivo* [31].

Wachsberger i Coss [58, 59] w badaniach ultrastruktury matriks jądrowej wykorzystali hodowle synchronicznych komórek CHO, zatrzymane w fazie G₁ (co pozwoliło wyeliminować zmiany wynikające z różnic w fazach cyklu komórkowego). W preparatach nukleoskieletu komórek CHO, przygotowanych techniką zatapiania bez żywicy (ang. *resinless section*), po usunięciu rozpuszczalnych w detergencie Triton X-100 elementów cytoskieletu,



Rys. 2. Ultrastruktura matriks jądrowej komórek CHO w fazie G_1 ; a – kontrola; b – po działaniu szoku termicznego (45°C , 30 min wg Wachsbergera i Cossa [59]; za zgodą Autorów. Na fotografiach zaznaczono: resztkowe jąderka (nu), blaszkę jądrową (I), włókna sieci matriks jądrowej (I), cytoplazmatyczne filamenty pośrednie (IF)

blon cytoplazmatycznych i jądrowych, wyróżnia się blaszkę jądrową, natomiast wewnątrz wypełniają cienkie, miejscami zespolone włókna matriks jądrowej tworzące struktury przypominające „plaster miodu” (ang. *honeycomb*). Z kolei chromatyna występuje w postaci elektronowo gęstych nitek powiązanych z włóknami matriks i blaszką jądrową.

Usunięcie z jąder komórek CHO chromatyny poprzez traktowanie DNazą I i siarczanem amonu zmienia obraz włókien matriks jądrowej; stają się cieńsze i luźniej powiązane (rys. 2a). Silnie utkana wewnętrzna struktura nukleoszkieletu po takim działaniu jest mniej upakowana i wykazuje słabiej zarysowaną sieć. W dalszych doświadczeniach cytowani badacze [59] analizowali parametry morfologiczne matriks jądrowej przez pomiar liczby tzw. zespołów włókien (ang. *anastomosing fibers*) przypadających na jednostkę powierzchni szkieletu jądrowego i pomiar długości włókien między punktami zespołów wewnątrz tej struktury jądrowej. Dla opisywanych preparatów nukleoszkieletu komórek CHO średnia liczba włókien zespolonych na powierzchni $1,62 \mu\text{m}^2$ wynosiła $41,9 \pm 7,4$, natomiast średnia długość między punktami zespolenia – $0,133 \pm 0,01 \mu\text{m}$. W strukturze matriks jądrowej obserwowano resztkowe jąderka w postaci elektronowo gęstych ciał, od których rozpościerały się włókna matriks jądrowej dochodzące do blaszki. Wewnątrz jąderka opisano regiony o odmiennej gęstości elektronowej.

Natomiast w matriks wydzielonej z jąder komórek poddanych szokowi (43°C , 60 min) odnotowano szereg zmian (rys. 2b). Nukleoszkielek pozostaje otoczony blaszką, a jego włókna tworzą sieć o wyższym stopniu zespolenia w porównaniu z preparatami kontrolnymi [59]. Analiza porównawcza długości włókien ujawniła, że w preparatach matriks jądrowej poddanych działaniu hipertermii ulegają one średnio dwukrotnemu skróceniu. Jednocześnie zaobserwowano 2,5-krotny wzrost gęstości sieci włókien tej struktury. Do badań włączono technikę densytometrii komputerowej, która wykazała wzrost gęstości elektronowej w strukturach szkieletowych izolowanych z jąder poddawanych działaniu podwyższonej temperatury. Otrzymane rezultaty wskazują, że gęstość nukleoszkieletu zależy zarówno od czasu trwania stresu termicznego, jak i wysokości temperatury stosowanej podczas eksperymentów [58].

Hipertermia powoduje również zmiany w ultrastrukturze jąderka [58, 59]. Cechuje je więcej wolnych przestrzeni niż analogiczne struktury w preparatach nie poddawanych stresowi termicznemu, a ponadto zdolność do agregacji z otaczającym je materiałem peryferycznym. Obecnie uważa się, że szok termiczny prowadzi do utraty lub przemieszczenia materiału ze składnika włóknistego jąderka i nagromadzenie w składniku ziarnistym. Te zmiany morfologiczne mogą być rezultatem blokowania lub spowolnienia syntezy pre-rRNA i/lub dojrzewania powstałego transkryptu spowodowanego zwiększeniem zawartości białek C kompleksu hnRNP w jąderku i we

włóknach matriks jądrowej [58]. Podwyższona ilość białek może także wpływać na utratę zdolności jąder do ich dezintegracji po działaniu podwyższonej temperatury w obecności czynników mitotycznych.

Ultrastrukturalne zmiany w jądrach komórkowych indukowane przez hipertermię, u podstaw których leży zwiększony poziom białek związanych z matriks jądrową, wpływają na procesy jądrowe i mogą prowadzić do powstania defektów. Z kolei, jeśli powstałe uszkodzenia nie ulegną naprawie, wówczas stają się cytotoksyczne i najczęściej prowadzą do śmierci komórki. Okazało się, że zmiany w ultrastrukturze szkieletu jądrowego komórek CHO są odwracalne, jeżeli komórki w określonych warunkach stresu wykazują wskaźnik przeżywalności odpowiadający wartości 0,3 (lub wyższej) [59]. Wskaźnik ten określa liczbę komórek, z pierwotnie wprowadzonych do podłoża 5000/cm², które po szoku termicznym w czasie inkubacji (37°C, 10–12 dni) tworzą kolonię złożoną z co najmniej 50 komórek. Ultrastrukturę nukleoskieletu komórek po działaniu podwyższonej temperatury (45°C, 20 min), a następnie inkubowanych (37°C, 30 min), cechuje silniejsze utkanie sieci jego włókien oraz wyższa gęstość elektronowa ciałek jądrowych. W komórkach tak traktowanych liczba punktów zespolenia włókien matriks jądrowej na określonej powierzchni stanowi 170% wartości charakterystycznej dla komórek kontrolnych, natomiast długość włókien – zaledwie 30% tej obserwowanej w komórkach niestresowanych. Okazało się, że w 20 godz. po działaniu stresu obraz matriks jądrowej w mikroskopie elektronowym przypomina w znacznym stopniu (90%) ultrastrukturę kontrolną. Długość włókien i liczba punktów zespolenia tych włókien odpowiada wartościom charakterystycznym dla komórek niestresowanych. Wskaźnik przeżywalności komórek w opisywanych warunkach stresu wynosił około $0,3 \pm 0,03$.

Wachsberger i Coss [59] ocenili, że po osiągnięciu przez komórki wskaźnika przeżywalności poniżej 0,01 zmiany w ultrastrukturze matriks jądrowej okazały się nieodwracalne. W szkielecie jądrowym wydzielonym z komórek inkubowanych (37°C, 30 min) i poddanych szokowi termicznemu (45°C, 30 min) liczba punktów zespolenia włókien wzrosła o $182 \pm 15\%$, a długość włókien zespolonych uległa skróceniu o $65 \pm 4\%$ w porównaniu z kontrolą. Ultrastruktura matriks jądrowej po 24 godz. od działania czynnika stresu (45°C, 30 min) znacznie zmieniła się w porównaniu do analogicznej struktury komórek niestresowanych. W traktowanych w powyższych warunkach komórkach sieć włókien szkieletu jądrowego cechuje niejednolite rozmieszczenie oraz formowanie agregatów, natomiast ciała jądrowe podlegają fragmentacji i wykazują wyższą gęstość elektronową. Opisane warunki hipertermii hamują proces naprawy uszkodzeń w ultrastrukturze szkieletu jądrowego. Okazało się, że zmiany w ultrastrukturze

matriks jądrowej, obserwowane w 20 godz. po inkubacji (45°C, 30 min) pojawiają się wcześniej i można je zidentyfikować już w 2 godz. po działaniu stresu.

Tabela 2

Zmiany ilościowe wśród białek jąder i matriks jądrowej komórek HeLa poddanych hipertermii (45°C, 30 min) [55]

Grupa	Białka hsp lub pasma białkowe m.cz. [kDa]	Względny wzrost zawartości białek pod wpływem hipertermii		Metoda detekcji
		jądro komórkowe	matriks jądrowa	
A	146	1,5	2,5	CB ^a
	120	1,4	2,2	CB
	108	1,4	3,1	CB
	97	1,7	2,6	CB
	90	1,6	4,6	CB
	76	1,4	3,0	CB
	47	1,5	2,2	CB
B	30	1,3	1,7	CB
	hsp-70	3,5	4,5	hsp-70; IB ^b
	hip-27	3,7	2,9	hsp-27; IB
	90	1,8	1,7	antyMJ; IB
	72	1,3	1,3	anty MJ; IB
C	28	1,0	1,8	CB
	26	1,0	1,7	CB
	Topo I	0,9	10,1	topo I; IB
	Topo II	0,8	8,2	topo II; IB
	57	1,0	1,3	anty MJ; IB
D	43	1,1	1,0	CB
	38	1,1	1,1	CB
	34	1,1	1,2	CB
	22	1,0	1,2	CB
	20	0,9	0,8	CB
	17	0,9	1,0	CB
	15	0,8	0,9	CB
	47	1,0	1,0	anty MJ; IB

Względna zawartość indywidualnych pasm białkowych uzyskana techniką skaningowej densytometrii laserowej po rozdziale białek jądrowych i matriks jądrowej w żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS i wybarwieniu błękitem brylantowym Coomassie (CB) lub immunodetekcji antygenów techniką Western blot (IB) w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko hsp – 27, hsp – 70, topoizomerazie I i II (topo I i topo II) lub białkom matriks jądrowej (anty MJ). Gęstość optyczną każdego polipeptydu frakcji jądrowej czy matriks jądrowej, wydzielonych z komórek HeLa poddanych hipertermii, porównano z analogicznym pasmem komórek kontrolnych, w których zawartość przyjęto jako 1,0.

W połowie lat osiemdziesiątych Warters i wsp. [62] poddali szerokiej analizie elektroforetycznej białka matriks jądrowej kontrolnych i stresowanych podwyższoną temperaturą (45°C, 30 min) komórek HeLa. Białka tej struktury komórek kontrolnych cechowała obecność głównych składników o m.cz. 45, 47, 55, 57, 59 i 65 kDa. Z kolei szok termiczny przyczyniał się do istotnego wzrostu zawartości polipeptydów tej struktury o m.cz. 28,5, 38,5, 60, 66, 81, 88 i 100 kDa, a w ocenie densytometrycznej wyrażał się wartościami odpowiednio 1,5, 1,9, 1,5, 1,3, 1,7, 2,2 i 1,7 razy wyższymi dla komórek stresowanych w porównaniu z kontrolnymi.

Zmiany w składzie polipeptydowym kilku składników matriks jądrowej komórek poddawanych hipertermii (HeLa, BMK, CHO) odnotowano w literaturze przedmiotu wielokrotnie [24, 35–38, 42, 43, 64, 69].

Na podkreślenie zasługują ostatnio opublikowane wyniki eksperymentów zespołu Roti-Roti [55] dotyczące porównawczej analizy białek jądrowych i tych zasocjowanych z matriks jądrową komórek HeLa eksponowanych na podwyższoną temperaturę (45°C) w czasie (0–75 min). W toku badań oszacowano ilościowe zmiany składników tych struktur poprzez skaningową densytometrię laserową białek wybarwionych błękitem brylantowym Coomassie (po rozdziale metodą SDS-PAGE) oraz detekcję antygenów (techniką Western blot) w obecności przeciwciał skierowanych przeciwko polipeptydom matriks jądrowej (anty MJ) bądź komercyjnie dostępnych przeciwciał (anty-topo I, anty-topo II, anty-hsp27 i anty-hsp70). Wnikliwa ocena ilościowa elektroferogramów analizowanych białek doprowadziła do ich podziału na cztery grupy. W grupie opisywanej jako A znalazły się składniki, których wzrost obserwowano po działaniu podwyższonej temperatury, zarówno w niefrakcjonowanych jądrach, jak i matriks jądrowej, choć w tej ostatniej znacznie wyższy (por. tab. 2). Do grupy B zakwalifikowano polipeptydy, w których zmiany ilościowe były porównywalne w jądrach i matriks jądrowej. Objęto w tej grupie m. in. hsp27 i hsp70 oraz białka o m.cz. 72 i 90 kDa, rozpoznawane przez przeciwciała anty MJ. Z kolei do grupy C zaszeregowano białka, których ilość w niefrakcjonowanych jądrach była zbliżona do tej w jądrach komórek kontrolnych (niestresowanych), zaś znacząco wzrastała w ich szkieletach. Zaskoczeniem jest ponad 10- i 8-krotny wzrost enzymów związanych z topologią i metabolizmem DNA, tj. topoizomerazy I i II. Wśród członków grupy D znalazły się polipeptydy, których ilość zarówno w jądrach jak i matriks jądrowej praktycznie nie zmienia się pod wpływem szoku termicznego.

Z przedstawionych danych wynika, że większość białek wzbogacających jądra komórkowe oraz ich struktury szkieletowe wskutek agregacji bądź zmniejszenia ich rozpuszczalności zakłóca zarówno skład chemiczny, ultrastrukturę, jak i podstawowe procesy, tj. replikację, procesy naprawy DNA,

metabolizm RNA. Te zakłócenia są m. in. przyczyną indukowanej termicznie cytotoksyczności [7, 24, 25, 31, 51, 52, 62, 66].

Wnikliwe analizy wykazały logarytmiczną zależność między wywołanym hipertermią (45°C) wzrostem ilości białek w matriks jądrowej a śmiercią komórek HeLa [62]. Okazało się, że wzrost o 15% zawartości białek zasocjowanych ze szkieletem jądrowym nie przyczynia się do śmierci tych komórek, ale ich 35% wzrost zwiększa jej prawdopodobieństwo do około 63%.

LITERATURA

- [1] Ananthan J., Goldberg A. L., Voellmy R. (1986), *Science*, **232**, 522–524.
- [2] Becker J., Craig E. A. (1994), *Eur. J. Biochem.*, **219**, 11–23.
- [3] Belgrader P., Siegel A. J., Berezney R. (1991), *J. Cell Sci.*, **98**, 281–291.
- [4] Berezney R., Coffey D. S. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1410–1417.
- [5] Berezney R. (1991), *J. Cell. Biochem.*, **47**, 109–123.
- [6] Berezney R., Mortillaro M. J., Ma H., Wei X., Samarabandu J. (1995), *Int. Rev. Cytol.*, **162A**, 1–65.
- [7] Borelli M. J., Stafford D. M., Rausch C. M., Lepock J. R., Lee Y. J., Corry P. M. (1992), *Radiat. Res.*, **131**, 204–213.
- [8] Borelli M. J., Lepock J. R., Frey H. E., Lee Y. J., Corry P. M. (1996), *J. Cell. Physiol.*, **167**, 369–379.
- [9] Callebaut I., Renoir J.-M., Lebau M. C., Massol N., Burnyu A., Baulieu E.-M., Mormon J.-P. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6270–6274.
- [10] Craig E. A., McCarthy B. J. (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4441–4457.
- [11] Craig E. A., Gambill B. D., Nelson R. J. (1993), *Microbiol. Rev.*, **57**, 402–414.
- [12] Chen Q., Osteryoung K., Vierling E. (1994), *J. Biol. Chem.*, **269**, 13216–13223.
- [13] Davie J. R. (1995), *Int. Rev. Cytol.*, **162A**, 191–248.
- [14] De Jong L., Grande M. A., Mattern K. A., Schul W., van Driel R. (1996), *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, **6**, 215–246.
- [15] Fischer P. A., Lin L., McConnell M., Greenleaf A., Jae-Moon L., Smith D. E. (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 3464–3469.
- [16] Gattoni R., Mahé D., Mähl P., Fischer N., Mattei M. G., Stvenin J., Fuchs J. P. (1996), *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2535–2542.
- [17] Gross C. A., Strauss D. B., Erickson J. U., Yura T. (1990), [w:] *Stress Protein in Biology and Medicine*, red. R. Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos, Cold Spring Harbor Press, New York, 167–189.
- [18] He D., Nickerson J. A., Penman S. (1990), *J. Cell Sci.*, **110**, 569–580.
- [19] Helm K. W., Schmeits J., Vierling E. (1995), *Plant Physiol.*, **107**, 287–288.
- [20] Higashikubo R., Roti Roti J. L. (1993), *Radiat. Res.*, **134**, 193–201.
- [21] Keyse S. M., Emslie E. A. (1992), *Nature*, **359**, 644–647.
- [22] Kiliańska Z. (1989), *Post. Biol. Kom.*, **16**, 61–86.
- [23] Kiliańska Z. (1994), *Post. Biol. Kom.*, **21**, 27–42.
- [24] Laszlo A., Wright W., Roti Roti J. L. (1992), *J. Cell. Physiol.*, **151**, 519–532.
- [25] Lee Y. J., Borelli M. J., Corry P. M. (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 1525–1531.

- [26] Lee D. H., Sherman M. Y., Goldberg A. L. (1996), *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4773-4781.
- [27] Lenne C. (1995), *Biochem. J.*, **311**, 805-813.
- [28] Lewis M. J., Pelham H. R. B. (1985), *EMBO J.*, **4**, 3137-3143.
- [29] Livak K. T., Freund R., Schweber M., Wensink P. C., Meselson M. (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5613-5617.
- [30] Martelli A. M., Gilmour R. S., Falcieri E., Manzoli F. A., Cocco L. (1990), *Exptl. Cell Res.*, **190**, 227-232.
- [31] Martelli A. M., Falcieri E., Gobbi P., Manzoli L., Gilmour R. S., Cocco L. (1991), *Exptl. Cell Res.*, **196**, 216-225.
- [32] Martelli A. M., Cocco L., Riederer B. M., Neri L. M. (1996), *Histol. Histopathol.*, **11**, 1035-1048.
- [33] Mills M. D., Meyn R. E. (1983), *Radiat. Res.*, **95**, 327-338.
- [34] Miron T., Vancompernelle K., Vandekerckhove J., Wilchek M., Geiger B. (1991), *J. Cell Biol.*, **114**, 255-261.
- [35] Neri L. M., Santi S., Marugg R. A., Riederer B. M., Capitani S., Cataldi A., Martelli A. M. (1994), *Exptl. Cell Res.*, **213**, 275-285.
- [36] Neri L. M., Riederer B. M., Marugg R. A., Capitani S., Martelli A. M. (1995), *Exptl. Cell Res.*, **221**, 301-310.
- [37] Neri L. M., Riederer B. M., Marugg R. A., Capitani S., Martelli A. M. (1997a), *J. Histochem. & Cytochem.*, **45**, 295-305.
- [38] Neri L. M., Riederer B. M., Marugg R. A., Capitani S., Martelli A. M. (1997b), *J. Histochem. & Cytochem.*, **45**, 1317-1328.
- [39] Nover L., Scharf K.-D. (1997), *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 80-103.
- [40] Pauli D., Arrigo A.-P., Tissières A. (1992), *Experientia*, **48**, 623-629.
- [41] Pelham H. R. B. (1984), *EMBO J.*, **3**, 3095-3100.
- [42] Pouchalet M., St-Pierre E., Birbor-Hardy V., Simard R. (1983), *Exptl. Cell Res.*, **149**, 451-459.
- [43] Reiter T., Penman S. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 4737-4741.
- [44] Ritossa F. (1962), *Experientia*, **18**, 571-573.
- [45] Ritossa F. (1964), *Exptl. Cell Res.*, **35**, 602-607.
- [46] Roti Roti J. L., Winward R. T. (1978), *Radiat. Res.*, **74**, 159-169.
- [47] Roti Roti J. L., Laszlo A. (1988), [w:] *Thermal Effects of Cells and Tissues*, eds. M. Urano, E. Douple, VSP, The Netherlands, 13-56.
- [48] Roti Roti J. L., Turkel N. (1994), *Radiat. Res.*, **138**, 286-290.
- [49] Schlesinger M. J. (1994), *Pediatr. Res.*, **36**, 1-6.
- [50] Spector D. L. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 147-151.
- [51] Stege G. J. J., Li G. C., Li L., Kampinga H. H., Konings A. W. T. (1994), *Int. J. Hyperthermia*, **10**, 659-674.
- [52] Stege G. J. J., Kampinga H. H., Konings A. W. T. (1995), *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**, 203-209.
- [53] Tissières A., Mitchell H., Tracy U. M. (1974), *J. Mol. Biol.*, **84**, 389-398.
- [54] Tomasovic S. P., Turner G. N., Dewey W. C. (1978), *Radiat. Res.*, **73**, 535-552.
- [55] VanderWall R., Thampy G., Wright W. D., Roti Roti J. L. (1996), *Radiat. Res.*, **145**, 746-753.
- [56] Velazquez J. M., Lindquist S. (1984), *Cell*, **36**, 655-662.
- [57] Voellmy R., Goldschmidt-Clermont M., Southgate R., Tissières A., Levis R., Gehring W. (1981), *Cell*, **23**, 261-270.
- [58] Wachsberger P. R., Coss R. A. (1993), *J. Cell. Physiol.*, **155**, 615-624.
- [59] Wachsberger P. R., Coss R. A. (1994), *J. Cell. Physiol.*, **160**, 97-106.
- [60] Warters R. L., Roti Roti J. L. (1982), *Radiat. Res.*, **92**, 458-462.

- [61] Warters R. L., Stone O. L. (1983), *Radiat. Res.*, **96**, 646–652.
- [62] Warters R. L., Brizgys L. H., Sharma R., Roti Roti J. L. (1986), *Int. J. Radiat. Biol.*, **50**, 253–268.
- [63] Warters R. L., Brizgys L. H., Lyons B. W. (1987), *Int. J. Radiat. Biol.*, **52**, 299–313.
- [64] Warters R. L., Brizgys L. H. (1988a), *Cancer Res.*, **48**, 3932–3938.
- [65] Warters R. L. (1988), *Radiat. Res.*, **115**, 258–272.
- [66] Warters R. L., Chu G. L., Wong R. S. L., Lyons B. W., Dewey W. C. (1993), *J. Cell. Physiol.*, **154**, 402–409.
- [67] Welch W. J., Suhan J. P. (1985), *J. Cell. Biol.*, **101**, 1198–1211.
- [68] Wong R. L., Dewey W. C. (1982), *Radiat. Res.*, **92**, 370–395.
- [69] Wright W. D., Higashikubo R., Roti Roti J. L. (1989), *Cytometry*, **10**, 303–311.
- [70] Wu C. (1995), *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**, 441–469.
- [71] Xing Y., Johnson C. V., Moen P. T., McNeil J. A., Lawrence J. B. (1995), *J. Cell Biol.*, **131**, 1635–1647.

Wpłynęło do Redakcji
Folia biochimica et biophysica
24.04.1998

Katedra Cytobiochemii
Uniwersytet Łódzki

Zofia M. Kiliańska, Anetta Ptasinska

CHANGES IN CELL NUCLEI INDUCED BY HEAT SHOCK

Exposure of cells to hyperthermic temperatures (43° to 48°C) results in an increase of the total protein mass which coisolates with the nuclei. Prominent physiological effect of heat-shock on nuclear structure is inhibition of DNA replication and repair, and also RNA synthesis and processing. Heat-shock-induced protein mass increase has been shown to correlate with ultrastructural changes and polypeptide composition of nuclear skeleton – nuclear matrix.