

PL ISSN 0324-833X

P2435

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

TOM 9 · NR 1

1982 (1-130)

Postępy Biologii Komórki



PWN – WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Współredaktorami tego zeszytu są Zofia BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA i Aleksandra PRZEŁĘCKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01 - 813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 513 + 97 egz. Ark. wyd. 10, Ark. druk. 8 $\frac{1}{8}$. Papier druk. sat. III kl. 80 g, 70 × 100 cm.
Oddano do składania w październiku 1981 r. Podpisano do druku w lipcu 1982 r. Druk ukończono w lipcu 1982 r. 438/81

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

RECEPTORY KOMÓRKOWE ESTRADIOLU
I PROGESTERONU

ESTRADIOL AND PROGESTERONE CELL RECEPTORS

Stanisława STOKŁOSOWA

Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek,
Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

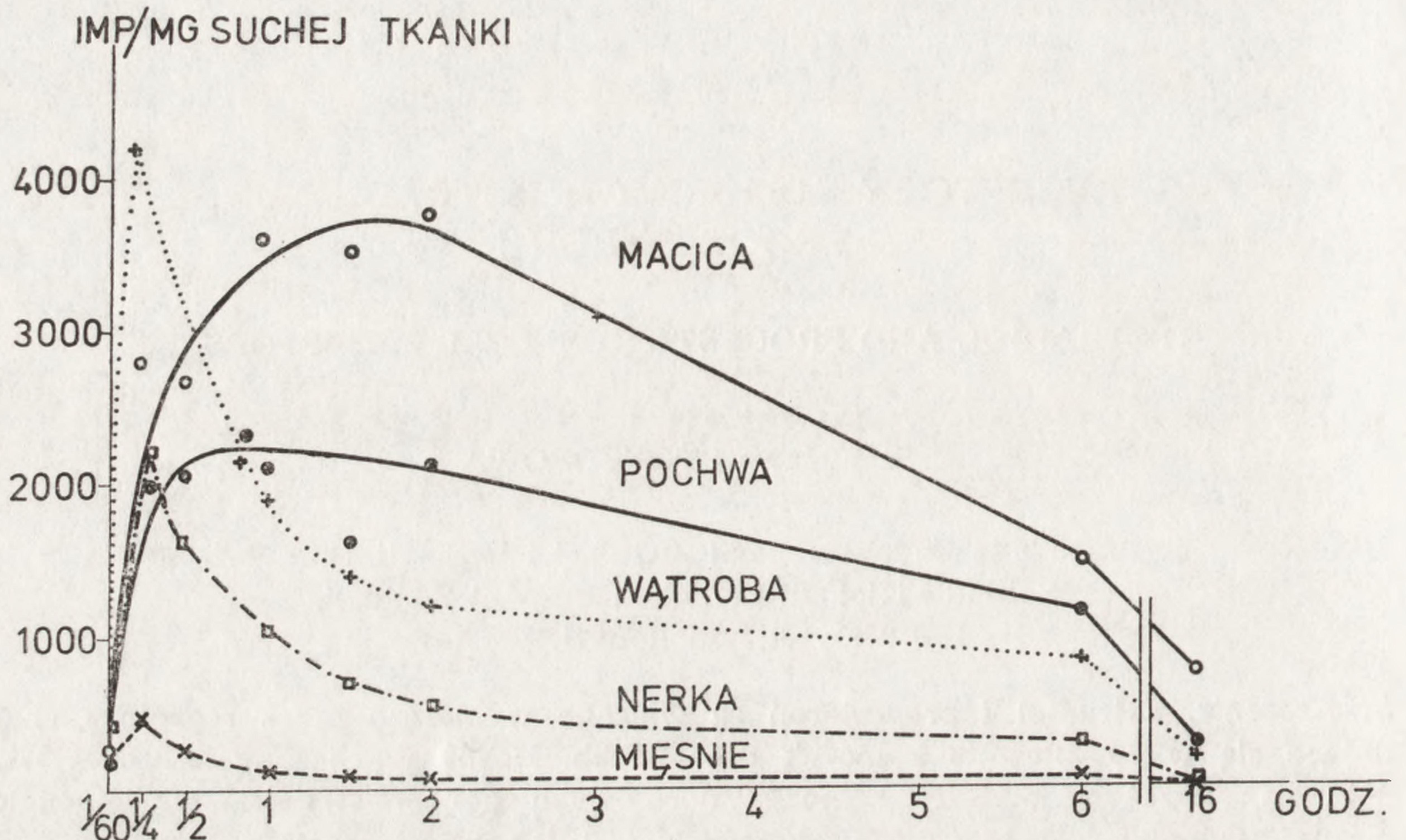
Streszczenie. Estradiol i progesteron są wiązane wybiórczo przez receptory znajdujące się w cytoplazmie komórek docelowych. Hormon związany z receptorami pobudza aparat genetyczny komórek docelowych do swoistej odpowiedzi biologicznej. Odpowiedzią biologiczną komórek jest ich proliferacja, różnicowanie się oraz wydzielanie swoistych substancji.

Summary. Estradiol and progesterone are selectively bound by receptors present in the cytoplasm of the target cells. The hormone bound by the receptors stimulates the genetic apparatus of these cells to a specific biological response which consists in proliferation, differentiation and secretion of specific substances.

Estradiol i progesteron, podobnie jak inne hormony, wywierają działanie na różne narządy dzięki istnieniu w komórkach cząsteczek rozpoznawczych swoistych dla każdego hormonu zwanych receptorami. Wiążą one wybiórczo odpowiedni hormon. Nie wszystkie komórki są wyposażone w receptory. Te które je zawierają nazywamy docelowymi. Receptory hormonów sterydowych reprezentowanych w tym artykule przez estradiol i progesteron znajdują się wewnątrz komórek docelowych, a nie jak receptory hormonów białkowych w błonie komórkowej. Hormon związany z receptorami komórek docelowych pobudza następnie ich aparat genetyczny do swoistej odpowiedzi biologicznej. Najczęstszą reakcją komórek docelowych na estradiol i progesteron jest ich

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r., zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie.

prolifracja, różnicowanie się oraz wydzielanie swoistych substancji. Sam hormon nie bierze udziału w zapoczątkowanych przez siebie procesach.



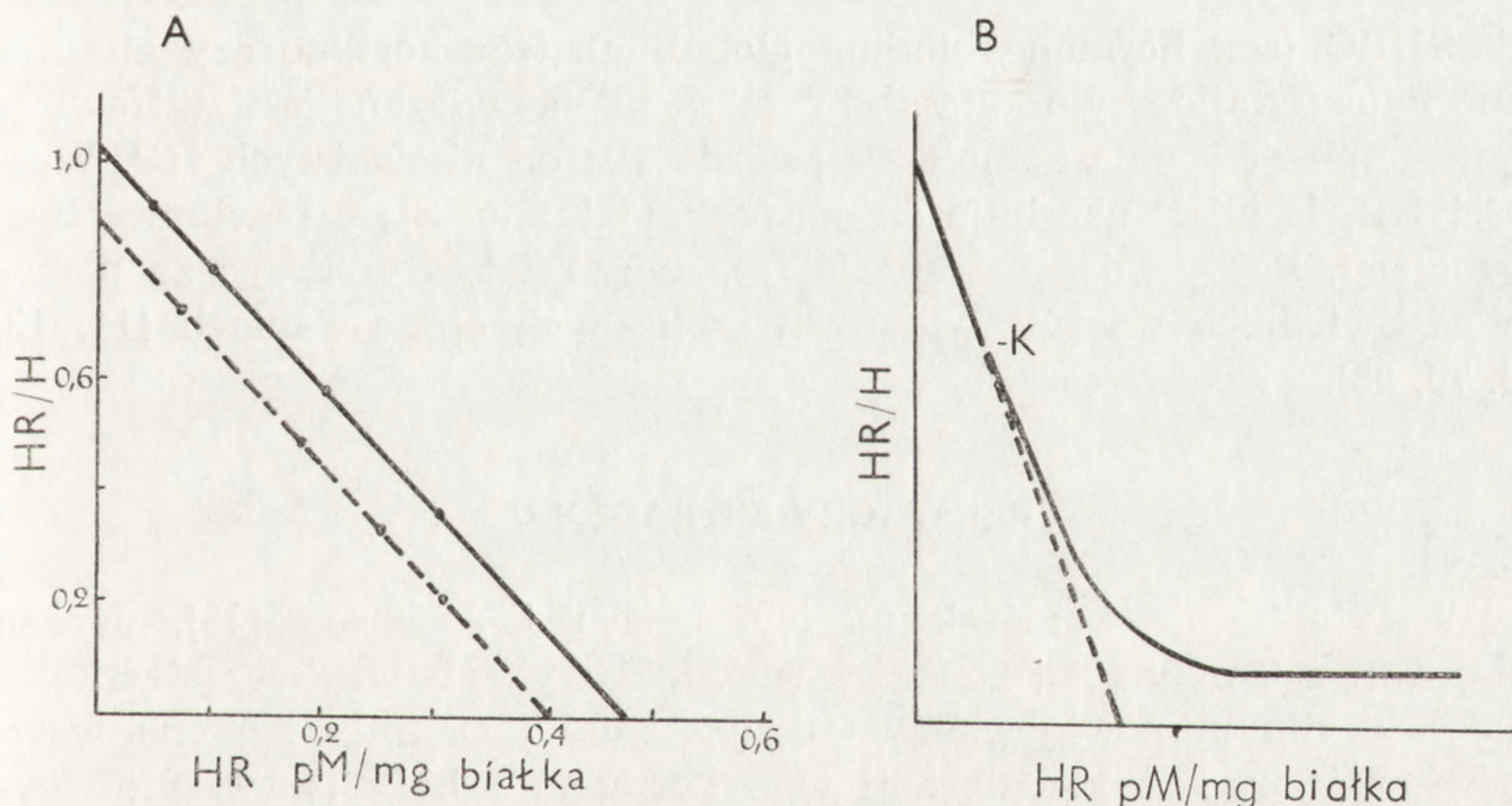
Ryc. 1. Wiązanie radioaktywnego estradiolu w różnych narządach niedojrzałej samicy szczura po wstrzyknięciu jednorazowej dawki hormonu. Najsilniejsze wiązanie w narządach docelowych, macicy i pochwie [35]

Pierwsze doświadczenia, w których rozwinięto intensywne i rozległe badania nad receptorami, przeprowadzili Glasscock i Hoekstra [20] oraz Jensen i Jacobson [35]. Wykazali oni, że radioaktywny estradiol podany niedojrzałym samicom szczura gromadzi się głównie w komórkach macicy już po 20 minutach od chwili podania (ryc. 1). Komórki macicy odznaczają się więc szczególnym powinowactwem do tego hormonu oraz zdolnością jego akumulowania.

Według klasycznego określenia, receptor jest biologicznym przekaźnikiem, który przetwarza informację reprezentowaną przez dany hormon w biologiczną odpowiedź, np. wzrost syntezy RNA i białek.

Receptor charakteryzuje się wysokim powinowactwem do ligandu, z którym tworzy trwałe kompleksy HR (H — hormon, R — receptor). Wiązanie to jest procesem odwracalnym cechującym się wysoką stałą asocjacji, powinowactwa i niską stałą dysocjacji. Wynikiem tego jest łatwe i szybkie tworzenie się kompleksu HR, lecz trudny i powolny jego rozpad. Gwarantuje to trwałość kompleksu. *In vitro* dysocjuje tak wolno, że współistniejące wiązania nieswoiste rozpadają się znacznie wcześniej. Ułatwia to izolowanie kompleksów. Krzywą dysocjacji oraz

liczbę miejsc wiążących w tkance docelowej ocenia się za pomocą analizy Scatcharda [69], która jest matematyczno-graficznym przedstawieniem danych dotyczących kinetyki wiązania. Jeżeli krzywa Scatcharda ma przebieg prostoliniowy (ryc. 2A), świadczy to o jednorodności wiązania. Na ryc. 2A podano przykład wiązania znakowanego estradiolu przez komórki macicy szczurzyce w dwóch różnych temperaturach. Jednakowy kąt nachylenia obu prostych do osi odciętych świadczy, że w obu doświadczeniach wiązanie jest tego samego rodzaju. Z krzywych tych można również odczytać, że podwyższenie temperatury obniża liczbę miejsc wiązania w komórkach. Spadek krzywej określa stałą dysocjacji; im krzywa jest bardziej stroma, tym stała dysocjacji jest mniejsza, czyli powinowactwo większe. Mniejsza jest także liczba miejsc wiązania, a zatem wiązanie bardziej swoiste. Prawie horyzontalny przebieg krzywej świadczy o słabym powinowactwie i wysokiej stałej dysocjacji. Zwiększa się także liczba miejsc wiązania. Wykres Scatcharda pozwala więc także odróżnić rodzaje wiązań, tzn. wiązanie swoiste z receptorem od wiązania nieswoistego z innym białkiem wiążącym (ryc. 2B).



Ryc. 2. A — Krzywe Scatcharda przedstawiające wiązanie estradiolu przez receptory komórek macicy szczurzyce inkubowane w temp. 0°C (linia ciągła) i 21°C (linia przerywana). HR — kompleks hormon — receptor, H — hormon niezwiązany, wolny; oś rzędnych — stosunek HR/H, oś odciętych — ilość miejsc wiążących [60]; B — Krzywe Scatcharda przedstawiające swoiste (linia przerywana) i nieswoiste (linia ciągła) wiązanie estradiolu. —K stała dysocjacji [13]

Z fizykochemicznego punktu widzenia receptor musi przejawiać dwie właściwości: wysokie powinowactwo do ligandu oraz małą pojemność. Dzięki wysokiemu powinowactwu receptory wychwytyją hormony krą-

zące w bardzo niskich stężeniach, zatrzymują je w komórkach i w ten sposób cała pula hormonu gromadzi się w komórce w formie kompleksu HR [4, 87]. Taki sposób gromadzenia hormonu zapewnia najoszczędniejszą nim gospodarke. Mała pojemność wiąże się z niewielką liczbą miejsc wiążących w cząsteczce receptora, przeważnie 1-2. Dzięki temu wysycenie populacji receptorów obecnych w tkance docelowej odbywa się zwykle w stężeniach niewiele wyższych od fizjologicznego. Ta właściwość receptorów stwarza naturalne ograniczenie stężenia aktywnego hormonu w komórce do wartości fizjologicznych. Po podaniu dużych dawek hormonu egzogenego jego nadmiar wiązany jest w cytoplazmie w sposób nieswoisty. Z wiązań takich, jak wiemy, łatwo dysocjuje i zostaje usunięty z komórki [58]. W warunkach doświadczalnych receptor nie odróżnia hormonu radioaktywnego od nieznakowanego i dzięki temu wiązanie tego pierwszego można powstrzymać podaniem hormonu nieznakowanego lub jego analogu. Konkurencja między znakowanym hormonem naturalnym a jego analogami, bądź jego formą nieradioaktywną jest jednym z ważniejszych sposobów pozwalających odróżnić wiązanie swoiste przez receptor od nieswoistego, np. przez różne białka wiążące jak SHBG (sex hormone binding globuline), transkortynę czy alfa fetoproteinę. Najlepszym sposobem odróżniania wiązań jest ultrawirowanie, które oddziela kompleksy swoiste HR od nieswoistych HP. Wartości HR, H i HP uzyskuje się eksperymentalnie. Stałe powinowactwa, dysocjacji, liczby miejsc wiązania itp. można także wyliczyć za pomocą odpowiednich wzorów podanych w licznych opracowaniach [11, 13, 60, 79, 83].

RECEPTORY ESTRADIOLU

W cytoplazmie komórek macicy Jensen i Jacobson [35], Jensen [36], Toft i Gorski [81], Gorski i wsp. [22] wykryli wielkocząsteczkowe białka o silnym powinowactwie do estradiolu. Okazały się one wewnątrzkomórkowymi receptorami tego hormonu i były pierwszymi wykrytymi doświadczalnie i scharakteryzowanymi receptorami hormonalnymi. Również komórki i tkanki inkubowane *in vitro* z radioaktywnym estradiolem zachowują zdolność wiązania tego hormonu. Ilość gromadzonego hormonu wzrasta szybko z upływem czasu inkubacji, aż do osiągnięcia poziomu charakterystycznego dla danej tkanki docelowej.

Jeżeli homogenat komórek macicy, które związały uprzednio radioaktywny estradiol, poddać wirowaniu z siłą około 100 000 g, wówczas znakowany hormon gromadzi się w nadsączu zawierającym frakcję cytoplazmatyczną zwaną cytozolem. Część radioaktywności wykrywalna jest także w osadzie zawierającym głównie jądra komórkowe [84]. Estra-

diol w cytozolu występuje w formie kompleksu z receptorem. Kompleks ten wirowany w gradiencie sacharozy osadza się ze stałą sedymentacji 8S. W roztworach o wysokiej sile jonowej (0,3M KCl) stała sedymentacji wynosi 4S, a w roztworach niskojonowych powraca do poprzedniej wielkości. Świadczy to o zdolności receptora do rozpadu na mniejsze podjednostki. Receptor estradiolu jest białkiem o cząsteczce asymetrycznej i ciężarze cząsteczkowym około 240 000 [64, 73]. Podobne właściwości przejawia receptor progesteronowy macicy [88]. Dowodem białkowej natury receptorów jest utrata własności wiążących po trawieniu kompleksu pronazą lub trypsyną. Znakowany estradiol podany zwierzęciu można znaleźć za pomocą metod autoradiograficznych lub biochemicznych głównie w jądrach komórkowych. Tylko około 20% radioaktywności zawarte jest w cytoplazmie. Podobnie dzieje się *in vitro*, gdy skrawki macicy inkubuje się w temperaturze ciała. W 0°C cała ilość hormonu pozostaje w cytoplazmie związana z receptorem 8S. Wiązanie estradiolu przez receptory cytozolowe nie zależy od obecności jąder komórkowych w homogenacie, natomiast same jądra wyizolowane z komórki i umieszczone w buforze zawierającym radioaktywny estradiol nie gromadzą hormonu w ogóle. Po połączeniu izolowanych jąder z cytozolem zawierającym kompleksy HR obserwujemy przemieszczanie się radioaktywnego hormonu z cytozolu do jąder. Warunkiem takiego włączania jest podniesienie temperatury do 20° i wyżej. Zjawisko to nazwano aktywacją receptora cytoplazmatycznego i jest charakterystyczne dla wszystkich hormonów sterydowych [3, 38, 57]. Zmieniony na drodze aktywacji receptor cytozolowy, zwany od miejsca nowej lokalizacji jądrowym, cechuje się stałą sedymentacji 5,2S. Daje się on ekstrahować roztworami soli o podwyższonym stężeniu jonowym. Dla porównania receptor cytozolowy w takim samym stężeniu soli ma stałą sedymentacji 3,8S. Receptor cytoplazmatyczny różni się od jądrowego także ciężarem cząsteczkowym (200 000-240 000 versus 60 000-75 000).

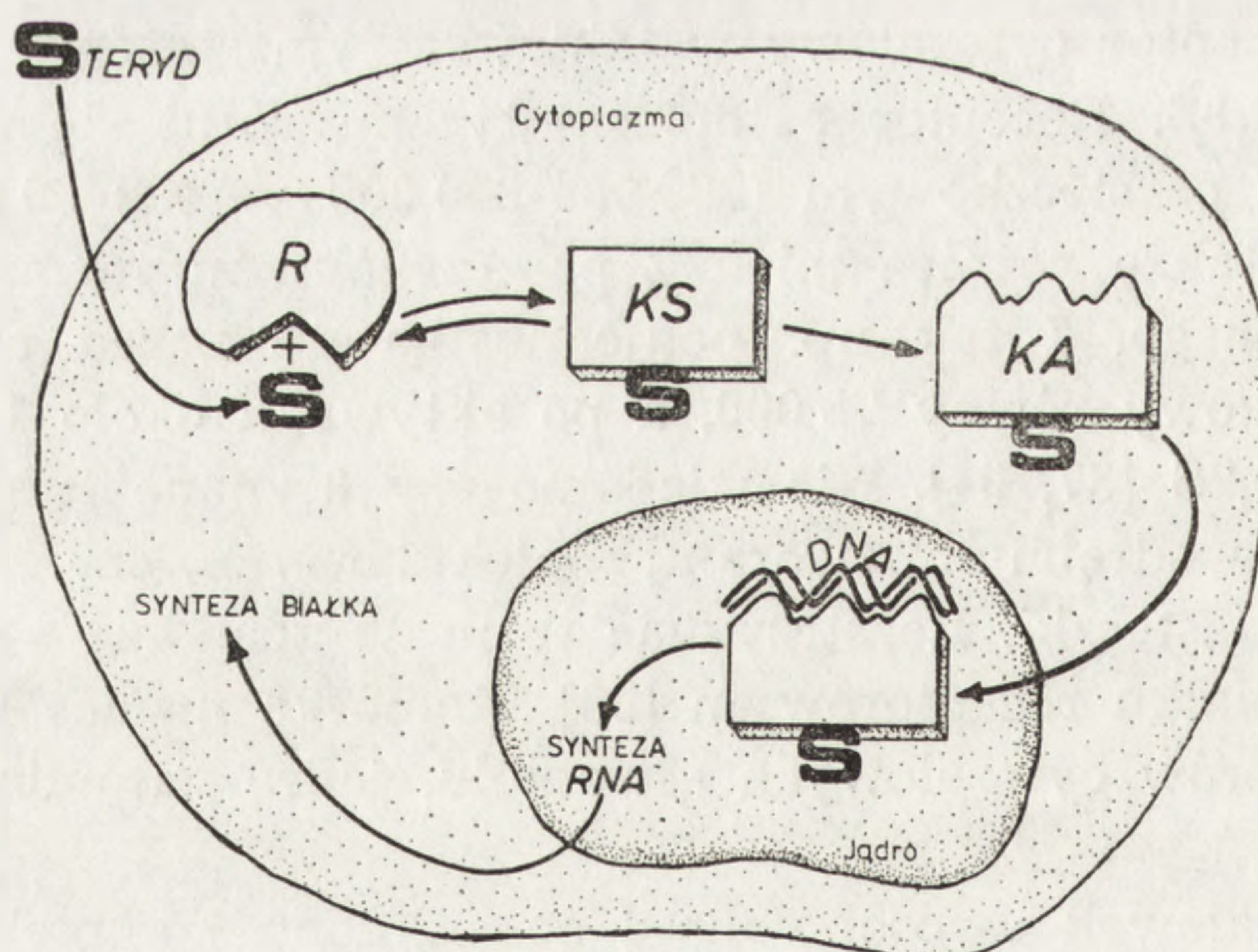
Występują także różnice między poszczególnymi formami receptora cytoplazmatycznego. I tak np. podjednostka 4S przed aktywacją ma ciężar cząsteczkowy równy 75 000, a po aktywacji około 132 700 i stałą sedymentacji 5,2S [37, 54]. Nie wiadomo czy 3 znane formy receptora: 8S, 4S i 5,2S są odrębnymi tworami molekularnymi, czy kolejnymi formami jednej cząsteczki. Rozstrzygnąć to może zbadanie sekwencji aminokwasów w białku receptorowym [58]. Komórka macicy zawiera około 100 000 receptorów cytozolowych estradiolu, jądro natomiast tylko około 7000.

Z macicy jałówek wyosobniono i oczyszczono kompleksy estradiolu z białkiem receptorowym zwanym estrofiliną. Takim kompleksem immunizowano króliki i otrzymano przeciwciało, które reaguje zarówno z kom-

pleksami cytozolowymi, jak i jądrowymi. Wskazuje to na podobieństwo immunochemiczne obu form receptora i popiera koncepcję istnienia 2-stopniowej interakcji przekształcającej receptor plazmatyczny w jądrowy [25]. Przeciwciała to daje reakcje krzyżowe z estrofilinami otrzymanymi z tkanek docelowych różnych zwierząt, a także z komórek nowotworów sutka zwierząt i ludzi. Nie reaguje natomiast z kompleksami dwuhydrotestosteronu, z receptorem komórek prostaty oraz z kompleksami progesteronu z receptorami z jajowodu kury. Dane te wskazują na podobieństwo immunochemiczne między estrofilinami różnych gatunków ssaków. Nie ma jednak podobieństwa do białek receptorowych innych hormonów sterydowych. Jest to więc przeciwciało o dużej swoistości tylko w stosunku do białka wiążącego estradiol. Zastosowanie anty-estrofiliny do badań histochemicznych pozwoli na dokładne zlokalizowanie w komórce obu form receptora. Ułatwi również ilościowe oznaczenie receptorów, zwłaszcza zależnych od estradiolu, w komórkach nowotworów sutka skoro tylko zostanie opracowana odpowiednia metoda radioimmunologiczna [26].

MECHANIZM DZIAŁANIA HORMONÓW STERYDOWYCH

Na ryc. 3 przedstawiono schematycznie drogę hormonu z otoczenia komórki do cytoplazmy i jądra oraz jego działanie na aparat genetyczny komórki. Lipofilny hormon sterydowy wnika do wnętrza komórki, gdzie trafia na białkowy receptor plazmatyczny, z którym wiąże się szybko i trwale. *In vivo*, w temperaturze ciała, kompleks HR ulega

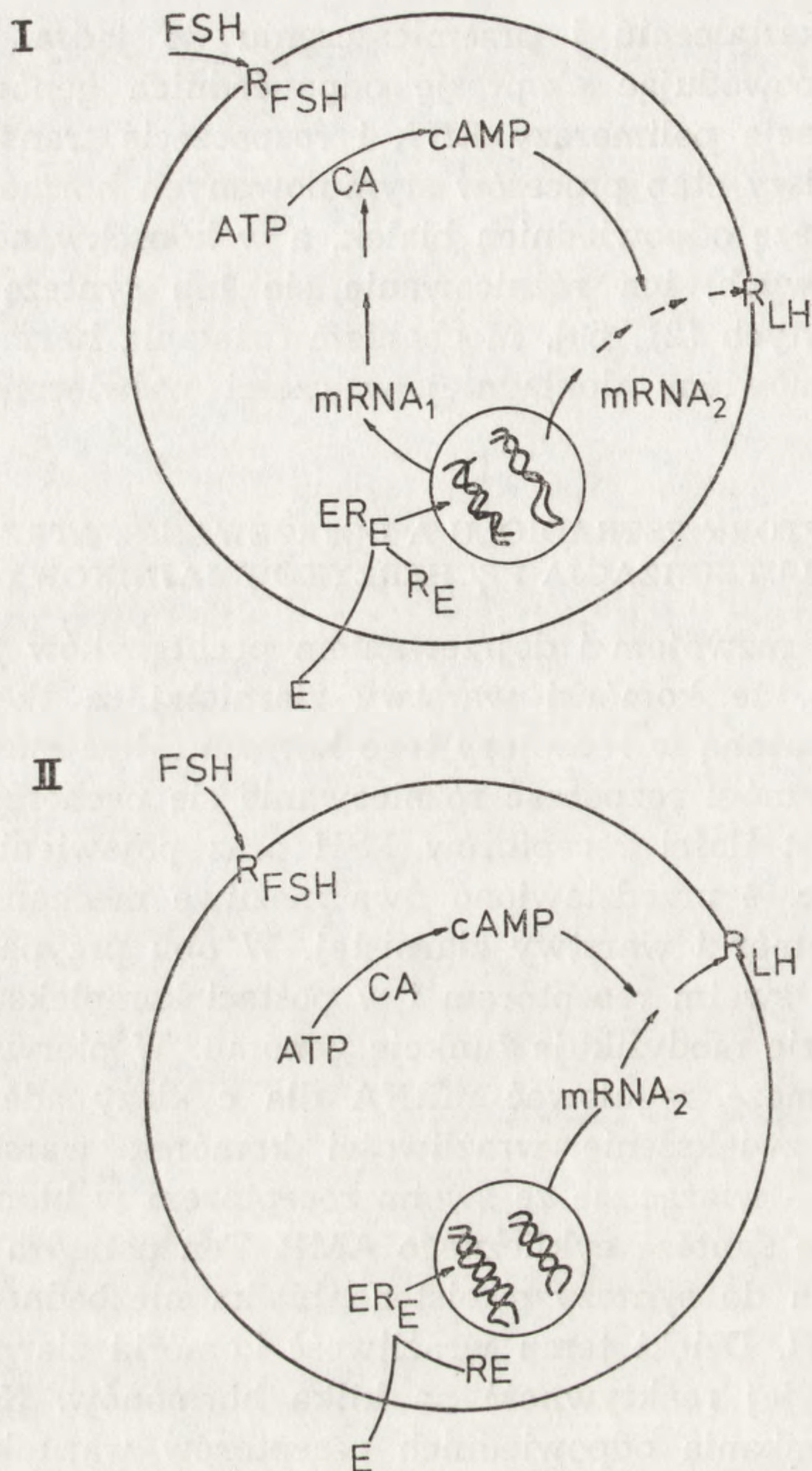


Ryc. 3. Mechanizm działania hormonu sterydowego S; R — receptor, KS — kompleks hormon receptor przed aktywacją, KA — kompleks aktywowany

aktywacji, przekształceniu i przemieszczeniu do jądra. Tu wiąże się z chromatyną, powodując ekspresję odpowiednich genów. Rezultatem tego jest aktywacja polimerazy RNA i rozpoczęcie transkrypcji swoistego mRNA. Dalszy etap procesów stymulowanych hormonem obejmuje translację i syntezę odpowiednich białek, a w konsekwencji proliferację komórek docelowych, ich różnicowanie się lub syntezę i uwalnianie produktów swoistych [21, 50]. Mechanizm działania hormonów sterydowych będzie omówiony dokładniej w części poświęconej receptorom progesteronu.

RECEPTORY ESTRADIOLU A DOJRZEWANIE, ATREZJA LUB LUTEINIZACJA PĘCHERZYKÓW JAJNIKOWYCH

Z badań nad rozwojem i dojrzewaniem pęcherzyków jajnika wiadomo [45, 67, 68], że komórki warstwy ziarnistej są tkanką docelową estradiolu wyposażoną w receptory tego hormonu, być może niezbędnego po to, aby FSH mógł rozpocząć różnicowanie się pęcherzyka, tworzenie się jamki, wzrost ilości receptorów FSH oraz pojawienie się receptorów LH. Na ryc. 4 przedstawiono dwa możliwe mechanizmy działania estradiolu na komórki warstwy ziarnistej. W obu przypadkach hormon ten wiąże się ze swoim receptorem i w postaci kompleksu przemieszcza się do jądra, gdzie modyfikuje funkcję genomu. W pierwszym przypadku (ryc. 4, I) może regulować mRNA dla cykazy adenilowej, czego wynikiem jest zwiększenie wrażliwości komórek warstwy ziarnistej na FSH, który — wiążąc się ze swoim receptorem w błonie tych komórek — stymuluje syntezę cyklicznego AMP. Ten pobudza łańcuch reakcji prowadzących do syntezy swoistego białka niezbędnego do tworzenia receptora LH. Dzięki temu wrażliwość komórki ziarnistej zwiększa się rozszerzając jej reaktywność na kilka hormonów. Kolejność pojawiania się i zanikania odpowiednich receptorów warunkuje normalny wzrost i dojrzewanie pęcherzyka albo, w razie utraty receptorów estradiolu i FSH, jego gwałtowną atrezję [28, 68]. Jeśli pęcherzyk będzie lutenizował, to zmniejszy się w komórkach warstwy ziarnistej ilość receptorów estradiolu, a w wyniku tego zmniejszy się ilość receptorów FSH i LH (ryc. 4, II). Równocześnie pojawiają się nowe receptory dla prolaktyny. Wkrótce potem, już w nowo utworzonych komórkach ciała żółtego, receptory prolaktyny i związany z nimi hormon indukują powstawanie receptorów LH zwiększających wrażliwość ciała żółtego na hormon luteotropowy podtrzymujący w nim syntezę progesteronu. Wykryte w ciałku żółtym receptory estradiolu [15] być może pośredniczą w wystąpieniu syntezy receptorów LH. Z przedstawionej tu interakcji receptorów różnych hormonów, warunkującej 3 możliwe losy pęcherzyka jajnikowego, wynika, że receptor estradiolu odgrywa pierwszorzędną rolę.



Ryc. 4. Schemat komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego. Estradiol może stymulować: I — syntezę receptorów FSH i LH lub II — przede wszystkim receptorów LH; FSH — hormon dojrzewania pęcherzyków, LH — hormon luteinizujący, CA — cyklaza adenilowa, R_{FSH} , R_{LH} , R_E receptory odpowiednich hormonów, ER_E — kompleks estradiol-receptor [68]

ROZMIESZCZENIE RECEPTORÓW ESTRADIOŁOWYCH W ORGANIZMIE

Receptory estradiolu są łatwe do wykazania w komórkach macicy kobiet nieciążarnych. W ciąży pojawiają się trudności z jego wykryciem z powodu dużego stężenia estrogenów we krwi i wysycenia nimi receptorów [32]. Interesujących danych dostarczyły badania Hähnela i wsp., [27], gdzie wykazano, że receptor macicy ludzkiej wiąże z równie wy-

sokim powinowactwem nie tylko estradiol 17-beta, lecz także inne sterydy o podobnej konfiguracji cząsteczki. Świadczyłoby to o znaczeniu budowy przestrzennej cząsteczki receptora dla wiązania ligandu, o czym wspominał już w swoich pracach Jensen.

U płodów świnki morskiej receptor estradiolu występuje poza macicą także w płucach, mózgu i nerkach. Podanie estrogenów matce indukuje pojawienie się receptorów progesteronu także w macicy płodów [80]. Znaleziono również receptory estradiolu w jajowodzie kury [29], jednakże tu ilość ich okazała się zadziwiająco niska w porównaniu ze skutkami, jakie wywołuje estradiol w komórkach tego narządu. W komórkach doczesnowych macicy pseudociężarnych szczurów ilość receptorów estradiolu zmniejsza się poczynając od 7 dnia pseudociąży [52]. Wiąże się to z różnicowaniem się komórek endometrium i spadkiem ich wrażliwości na hormony pod koniec ciąży.

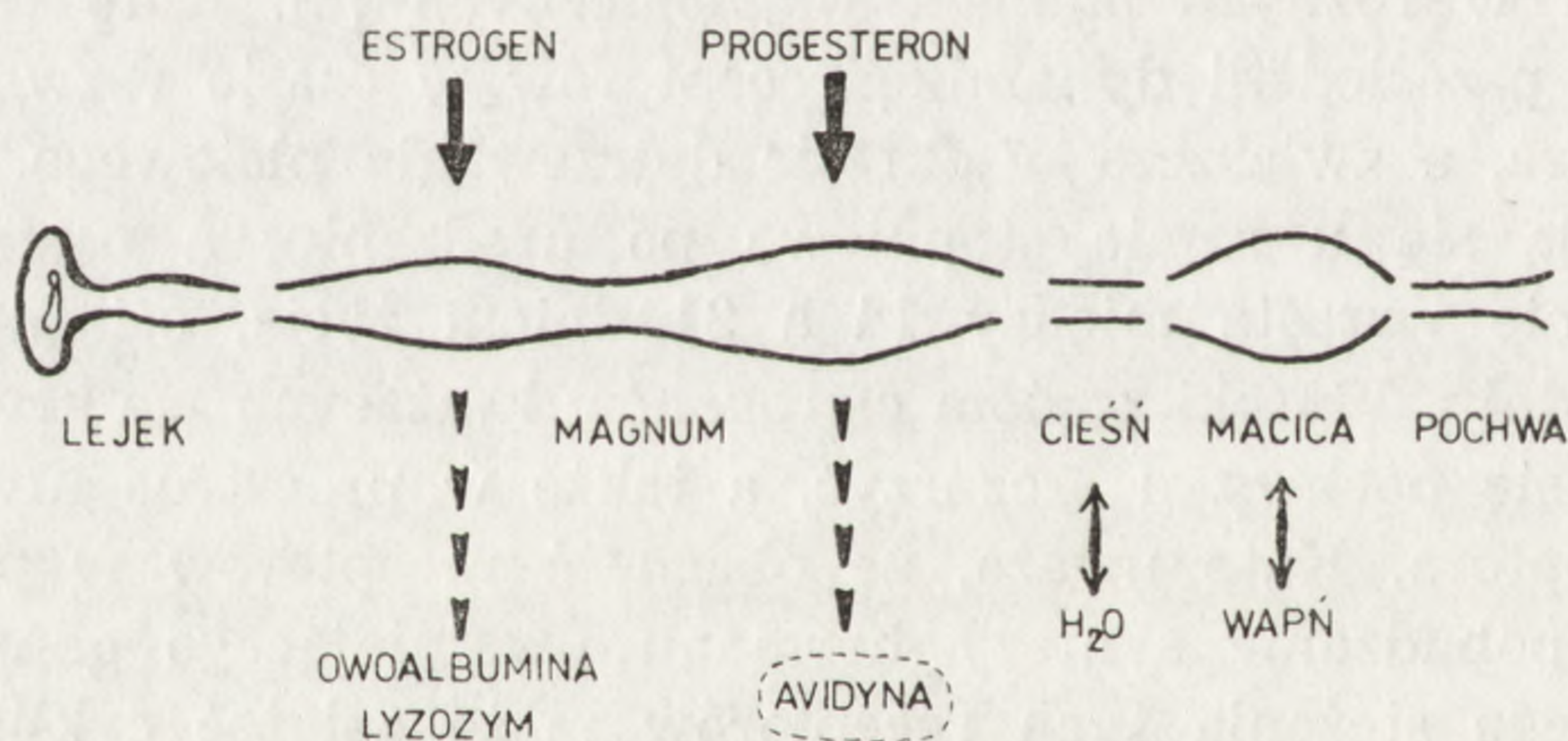
Wiele pracy poświęcono poszukiwaniu receptorów w innych narządach, a zwłaszcza w mózgu. Szczególnie duże ich ilości znaleziono w podwzgórzu i przysadce [12, 51, 63, 66]. W przysadce mózgowej nie stwierdzono różnic w zawartości receptorów u samic i u samców [42]. Natomiast u samic szczurów obserwowano dynamikę zmian ilości receptorów w macicy w zależności od stadiów cyklu płciowego oraz większe powinowactwo tych receptorów do estradiolu w diestrus niż w estrus. Sugeruje to istnienie różnic strukturalnych lub czynnościowych między receptorami w różnych stanach fizjologicznych [6]. Kato [39] i Kato i wsp. [40] prześledzili dynamikę receptorów w czasie rozwoju osobniczego szczura, a zwłaszcza w okresie dojrzewania płciowego. Receptory te pojawiają się u samic stopniowo po urodzeniu, a następnie ilość ich raptownie wzrasta między 14 a 21 dniem życia, osiągając maksimum w 28 dniu. Wysoki poziom estrogenów krążących we krwi w czasie otwierania się pochwy u szczurzy, a także w proestrus utrudnia wykrycie receptora. Kato uważa, że obecność receptorów w podwzgórzu umożliwia pobudzenie syntezy hormonu uwalniającego gonadotropiny. Od zmiennego stężenia tych receptorów może zależeć cykliczna regulacja przez estradiol czynności rozrodczych samicy. Również Wiese i wsp. [85] wykazali różnice w powinowactwie wiązania estradiolu w przysadce mózgowej owcy, silniejsze w sezonie rozrodczym niż w anestrus. Fox [19] wyizolował receptory estradiolu z podwzgórza zarodków i noworodków myszy. W tym okresie badanie receptorów jest szczególnie trudne z powodu obecności dużych ilości białka wiążącego estrogeny (neonatal binding protein-NBP). Receptory estradiolu są wykrywalne już między 2 a 7 dniem życia, a więc w okresie krytycznym, gdy podanie estrogenów lub androgenów może na stałe zmienić zróżnicowanie seksualne podwzgórza. Wysoki poziom NBP w życiu płodowym i po

urodzeniu pełni prawdopodobnie rolę ochronną przed wysokim stężeniem estrogenów matki.

Receptory estradiolu występują również w komórkach wątroby kurczęcia, szczura, a także płazów i ryb [5, 11, 24, 72]. Estradiol stymuluje w tych komórkach syntezę lipoprotein, glikogenu, reniny u ssaków, a u ptaków i niższych kręgowców białek żółtka jaj zwanych vitellogeniną. Receptory estradiolu w wątrobie są jeszcze jednym przykładem receptora zależnego od innego hormonu. Ich ilość zależy od obecności i poziomu prolaktyny we krwi.

RECEPTORY PROGESTERONU

Receptory progesteronu były trudniejsze do zidentyfikowania, bowiem w narządach docelowych, takich jak macica, a zwłaszcza jajowód, występują w niewielkich ilościach, a ich stężenie wzrasta znacząco dopiero po uprzednim zadziałaniu estradiolu. O'Malley i wsp. [55] wybrali jajowód kury jako model do badań tego receptora. Jest to narząd, który w sposób niezmiernie regularny, a zarazem spektakularny reaguje na obecność estradiolu wzrostem i różnicowaniem się oraz produkcją dużych ilości swoistego białka — albuminy jaja, tworzącej jedną z błon jaja kurzego. Sukcesywne podanie progesteronu pobudza syntezę innego

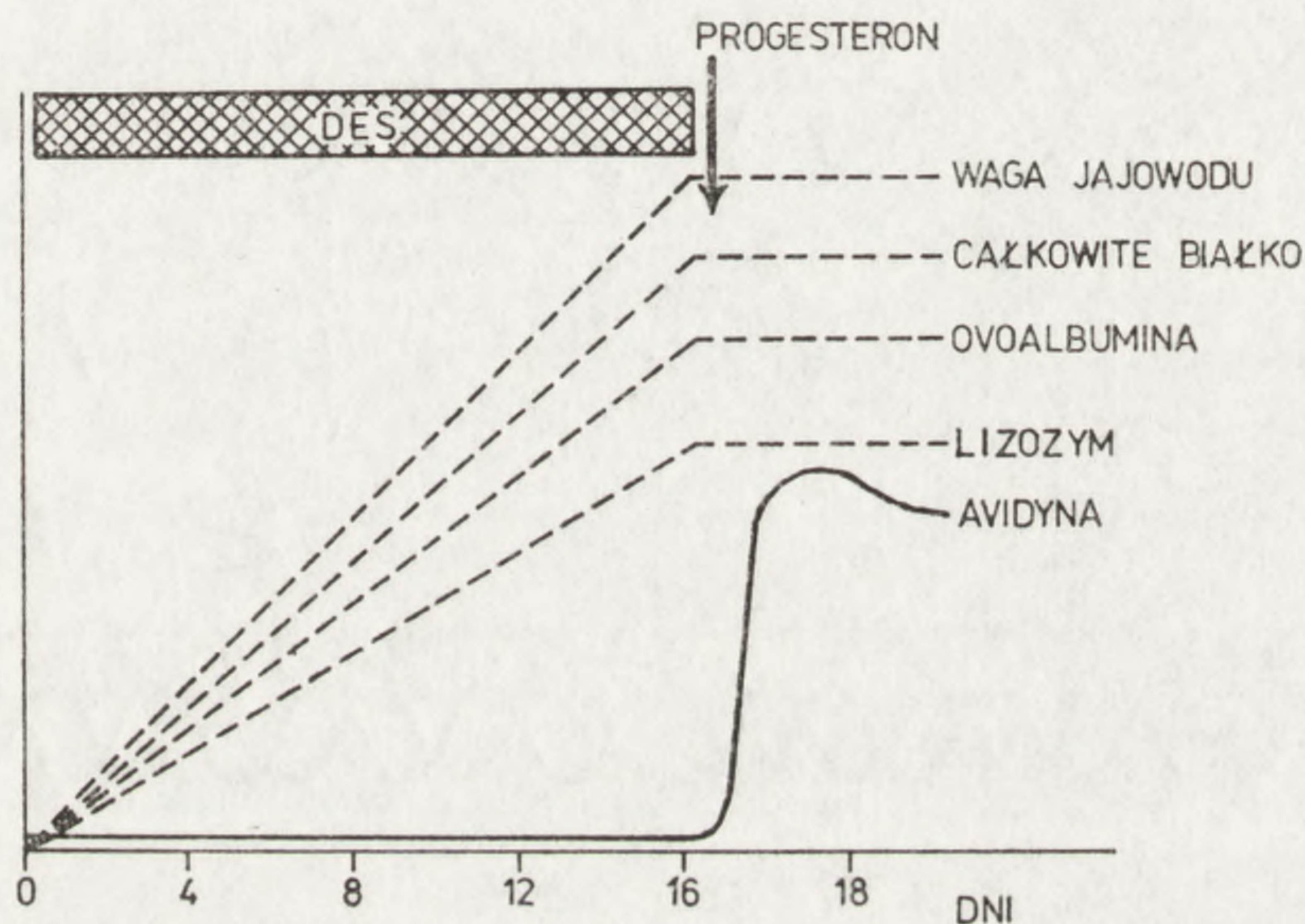


Ryc. 5. Schemat jajowodu kury z zaznaczonymi miejscami syntezy białek: albuminy jaja i avidyny magnum — bańka jajowodu [55]

białka — avidyny (ryc. 5 i 6). Schimke i wsp. [70] wywołali różnicowanie się jajowodu kokoszek manipulując podawaniem i wycofywaniem estradiolu i progesteronu w odpowiedniej kolejności.

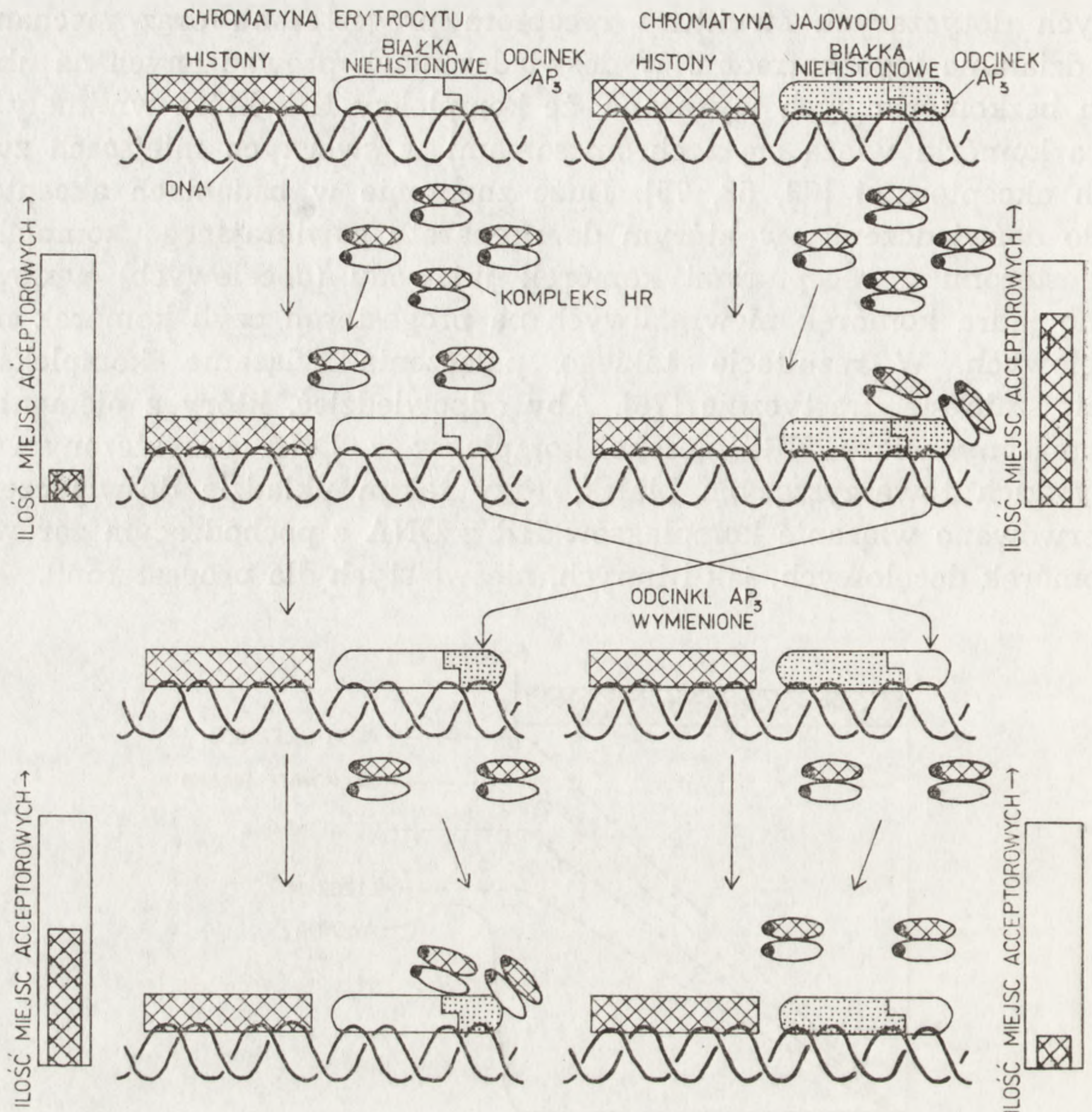
Receptor progesteronu jest podobny pod względem struktury i funkcji do innych receptorów sterydowych. O'Malley i wsp. [56], Schrader i O'Malley [71], Dugaiczek i wsp. [16] dostarczyli wielu bardzo cennych

danych dotyczących struktury receptora progesteronu oraz mechanizmu działania tego hormonu. W doświadczeniach prowadzonych na układach bezkomórkowych wykazano, że kompleksy HR, które wniknęły do jądra komórki wiążą się z chromosomami w swoistych miejscach zwanych akceptorami [33, 58, 75]. Duże znaczenie w badaniach akceptora miało doświadczenie, w którym do preparatu zawierającego kompleksy progesteronu z receptorami komórek jajowodu (docelowych) wprowadzono jądra komórek niewrażliwych na progesteron czyli komórek nie docelowych. W rezultacie takiego połączenia wiązanie kompleksów zmniejszało się drastycznie [76]. Aby odpowiedzieć, który z elementów chromatyny wiąże HR, łączono kompleksy z DNA oczyszczonym ze wszystkich towarzyszących białek. Przy takim układzie doświadczenia obserwowano wiązanie kompleksów HR z DNA z pochodzącym zarówno z komórek docelowych, jak i innych, nieswoistych dla progesteronu. Wy-



Rys. 6. Procesy wywołane w jajowodzie działaniem estrogenu i sukcesywnie progesteronu. DES — stilbestrol [55]

daje się, że DNA komórek nie może być odpowiedzialny za swoistość tkankową wiązania hormonów sterydowych. Zwrócono więc uwagę na białka chromatyny. Białka histonowe okazały się nieaktywne jako akceptory HR, usunięcie ich bowiem z chromatyny nie zmieniało wiązania kompleksu. Zastąpienie białek histonowych jajowodu histonami pobranymi z innych tkanek, a nawet organizmów również nie zmieniało wiązania kompleksu z chromatyną. Wobec tego zainteresowano się grupą białek niehistonowych bardziej heterogennych. Jedno jądro komórkowe może zawierać około 500 rodzajów tych białek [9]. Badanie wiązania kompleksu HR przez poszczególne frakcje białek niehistonowych doprowadziło do odkrycia, że tylko usunięcie jednej frakcji oznaczonej



Ryc. 7. Schemat doświadczenia z wymianą części akceptorowej chromatyny (białka niehistonowe) między komórką docelową jajowodu a erytrocytem kury. Zaznaczono wahania ilości miejsc akceptorowych w wyniku doświadczenia [59]

AP3 (acidic protein 3) zaznaczało się gwałtownym spadkiem wiązania kompleksów [59]. Po ponownym wprowadzeniu frakcji AP3 wiązanie wracało do pierwotnych wartości. Na ryc. 7 przedstawiono w sposób uproszczony wymianę części białek kwaśnych między komórką jajowodu — docelową a erytrocytem kury. W tym układzie nieswoisty erytrocyt nabywał zdolności wiązania kompleksów receptor—progesteron, a docelowa komórka jajowodu traciła je. Przeprowadzono szereg podobnych doświadczeń wybierając do wymiany chromatynę komórek wątroby, płuc, serca, itd., zawsze z tym samym skutkiem nabywania przez chromatynę komórek niedocelowych zdolności wiązania HR, a jej utratą przez komórki jajowodu. Odwrócenie kierunku wymiany przy-

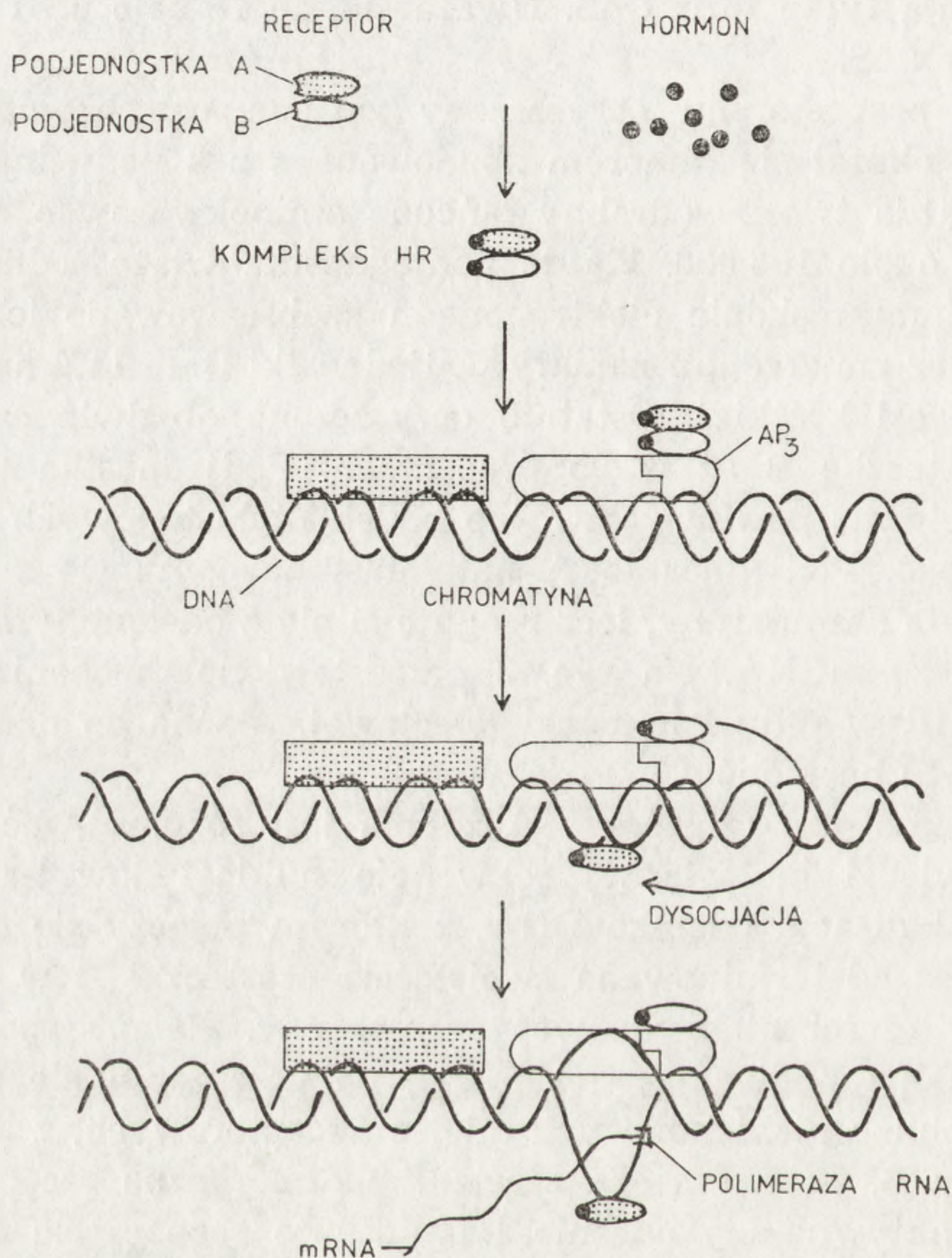
wracało chromatynie komórek jajowodu zdolność wiązania hormonu. Doświadczenia te rozstrzygnęły, że właściwym akceptorem kompleksu hormon—receptor w jądrze są białka niehistonowe chromatyny.

Preparując receptory progesteronu otrzymano, podobnie jak w przypadku estradiolu, kilka ich form. Wirowane w gradiencie sacharozy dają frakcje o stałej sedymentacji 6S i 8S. W roztworach wysokojonowych powstają tylko formy 4S. Uważa się, że frakcje 6S i 8S są agregatami cząstek 4S.

Receptor progesteronu oczyszczony za pomocą chromatografii powinowactwa okazał się dimerem zbudowanym z 2 podjednostek A i B, z których każda tworzy odrębny łańcuch aminokwasów o ciężarze cząsteczkowym około 106 000. Każda podjednostka wiąże jedną cząsteczkę hormonu. W mikroskopie elektronowym zaobserwowano ich elipsoidalny kształt oraz zmierzono rozmiary podjednostki B — 11,4 nm osi długiej i 3,8 nm w osi krótkiej. Ostatnio oczyszczono obydwie cząsteczki receptora, cząsteczkę B aż w 95 procentach. Podjednostka ta przejawia ważne biologicznie powinowactwo do białek niehistonowych czyli akceptora jądrowego. Podjednostka A natomiast odznacza się słabym powinowactwem do chromatyny, lecz reaguje silnie z odsłoniętym DNA i stymuluje syntezę mRNA. Na ryc. 8 przedstawiono mechanizm działania kompleksu HR w jądrze komórki docelowej. Można go odnieść do obu omawianych tu hormonów.

Nie wiadomo, czy cząsteczka A zdolna jest rozpoznawać swoistą dla danej odpowiedzi biologicznej sekwencję nukleotydów na nici DNA. Być może lokalizacja odcinka DNA, z którym połączy się cząsteczka A receptora, jest zdeterminowana swoistością cząsteczki B w stosunku do akceptora w części niehistonowej chromatyny. Należy spodziewać się, że odcinki DNA podlegające ekspresji, po połączeniu się z cząsteczką A, leżą w pobliżu niehistonowych miejsc akceptorowych, z którymi wiążą się człony B. Nienaruszona cząsteczka dimeryczna receptora 6S jest najbardziej aktywna biologicznie i stymuluje rozpoczęcie syntezy łańcucha RNA już przy bardzo niskim stężeniu kompleksów. Głównym zadaniem podjednostki B jest przenoszenie członu A w sąsiedztwo reaktywnych genów. Izolowana podjednostka A jest natomiast białkiem regulatorowym i stymuluje transkrypcję, lecz dopiero w stężeniach 10-15 razy wyższych niż wówczas, gdy występuje w formie dimeru z cząsteczką B [8]. Receptory hormonów sterydowych przejawiają podobne właściwości. Hirose i wsp. [34], Norris i Kohler [53], O'Malley i wsp. [58] wykonali szereg trudnych i precyzyjnych doświadczeń wchodzących w zakres genetyki molekularnej. Wychodząc z modelu dla bakterii, gdzie pierwszym krokiem w syntezie białka jest wiązanie polimerazy RNA w określonych miejscach inicjacji transkrypcji na DNA i gdzie istnieje

jedno miejsce inicjacji na jeden gen, postanowiono zbadać liczbę miejsc inicjacji w chromatynie komórki jajowodu. Liczba taka byłaby miarą ilości genów podlegających ekspresji w następstwie działania hormonów. Okazało się że i tu w każdym miejscu inicjacji wytwarza się jedna cząsteczka mRNA. Jeżeli przerwie się transkrypcję nie dopuszczając do wiązania dalszych cząsteczek polimerazy, wówczas miarą ilości ge-



Ryc. 8. Mechanizm działania kompleksu hormon—receptor na poziomie jądra komórkowego. Wiązanie hormonu z dwuczłonowym receptorem, łączenie się z chromatyną i inicjowanie syntezy mRNA przez podjednostkę A [59]

nów, które uległy ekspresji będzie ilość cząsteczek wytworzonego jednorazowo mRNA. Do sprawdzenia tego wykorzystano właściwości antybiotyku rimfapicyny, który blokuje aktywność tych cząstek polimerazy RNA, które nie uległy związaniu w miejscu inicjacji. Zastosowano odpowiedni układ doświadczenia *in vitro*, dobierając właściwe ilości: chromatyny z komórek jajowodu, polimerazy, rimfapicyny, kompleksów HR i nukleotydów. Wykazano, że ilość miejsc inicjacji była zależna od ilości

kompleksów hormonu z receptorem. Za pomocą podobnego doświadczenia, w którym użyto chromatyny wyisobnionej z komórek niedojrzałego jajowodu kokoszek, które jeszcze nie były pod wpływem hormonów, stwierdzono, że na jedno miejsce akceptorowe przypada jeden kompleks HR i że tylko receptor związany z hormonem stymulował rozpoczęcie transkrypcji, a zatem wiązanie receptora w jądrze komórkowym jest procesem zależnym od hormonu [8].

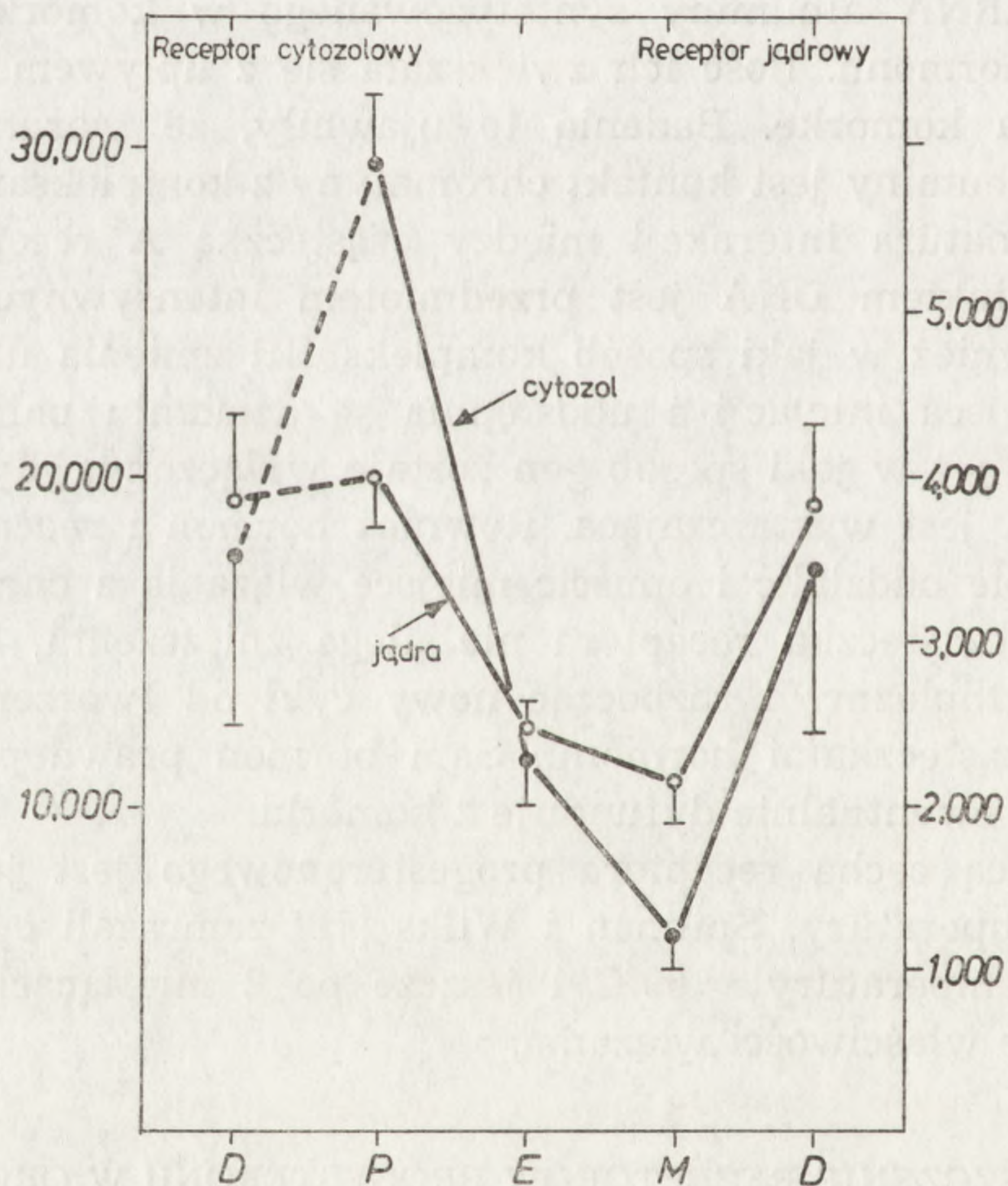
Za pomocą innej techniki zwanej hybrydyzacją RNA—DNA wykazano, że aktywowane geny były tymi, które kodowały białka syntetyzowane w odpowiedzi na hormon. Czyste preparaty mRNA dla albuminy jaja kurzego poddane działaniu odwrotnej transkryptazy posłużyły do syntezy komplementarnych nici DNA. Takie pojedyncze nici następnie izolowano i stosowano jako molekularny „odczynnik” zdolny do wychwytywania z mieszaniny różnych mRNA tylko nici komplementarnego RNA swoistego dla syntezy albuminy. W rezultacie powstawały hybrydy mRNA—DNA. Ich ilość jest miarą ilości mRNA albuminy. Za pomocą tej niezwykle czułej i swoistej techniki oznaczono ilość cząsteczek mRNA albuminy syntetyzowanego w komórkach jajowodu po podaniu hormonu. Ilość ich zwiększała się z upływem czasu od zera do 10 000 na komórkę. Badania te ujawniły, że warunkiem syntezy mRNA dla albuminy jest kontakt chromatyny z kompleksami HR. W dalszym ciągu natura interakcji między cząsteczką A receptora a odpowiednim odcinkiem DNA jest przedmiotem intensywnych badań. Nie wiadomo również w jaki sposób kompleks HR zmienia ukryte lub nieaktywne miejsca inicjacji i udostępnia je działaniu polimerazy RNA. Nie wiadomo też w jaki sposób gen zostaje wyłączony, gdy ilość wytworzonego RNA jest wystarczająca. Również hormon i receptor muszą się jakoś od siebie oddzielić i opuścić miejsce wiązania z chromatyną. Wydaje się, że cząsteczka receptora nie ulega zniszczeniu, lecz może powrócić do cytoplazmy i rozpocząć nowy cykl od tworzenia kompleksu z nowymi cząsteczkami hormonu. Sam hormon prawdopodobnie ulega inaktywacji i ewentualnie dyfunduje z komórki.

Interesującą cechą receptora progesteronowego jest jego odporność na niskie temperatury. Spilman i Wilks [78] zamrażali cytozole macicy królika do temperatury -60°C i jeszcze po 2 miesiącach obserwowali nie zmienione właściwości wiązania.

ROZMIESZCZENIE RECEPTORÓW PROGESTERONU W ORGANIZMIE

Oprócz jajowodu receptory progesteronu wykryto w macicy myszy i szczura [17], świnki morskiej [47, 61], chomika [1, 43], królika [65], suki [44], krowy [2], człowieka [18, 31]. Ilość tego receptora zawsze po-

większa się po podaniu estradiolu [82]. W związku z tym obserwuje się wyraźną fluktuację stężenia receptorów progesteronu w cyklu płciowym, w ciąży i w czasie laktacji. Na przykład u szczura w cyklu płciowym najmniej receptora cytozolowego obserwowano w czasie proestrus, a najniższe w metestrus równoległe z fluktuacją krążącego w krwi estradiolu. Podobnie kształtowała się dynamika receptorów w jądrze komórkowym. Kastracja powoduje obniżenie miejsc wiążących w macicy myszy, a substytucja estrogenowa ich wzrost do wartości normalnych lub wyższych [62]. Wykryto także receptory progesteronu w normalnych, produkujących mleko, gruczołach mlekowych szczura [23], kozy oraz w gruczołach mlekowych z rakiem sutka [86]. Interesujące zachowanie się receptorów progesteronu opisują Haslam i Shyamala [30] w czynnych gruczołach mlekowych myszy, gdzie nie stwierdzili wykrywalnych ilości receptora nawet u zwierząt nastrzykiwanych estradiolem. Natomiast gruczoły myszy niedojrzałych zawierają wykrywalne receptory, których ilość zwiększa się po podaniu estradiolu. Spelsberg i Hal-



Ryc. 9. Fluktuacja ilości receptorów cytoplazmatycznych i jądrowych progesteronu w macicy szczura w cyklu płciowym. D — Diestrus, P — Proestrus, E — Estrus, M — Metestrus [48]

berg [77] zaobserwowali istnienie rocznego sezonowego rytmu w stężeniu receptorów progesteronu w jajowodzie kury.

Receptory progesteronu znaleziono także w przednim płacie przysadki mózgowej i podwzgórzu [41, 49]. Świadczy to o istnieniu interakcji hormon — receptor w mechanizmie działania progesteronu w centralnym układzie nerwowym. Moguilewsky i Raynaud uważają że progesteron, przez receptory w podwzgórzu, pobudza, a następnie hamuje wystąpienie lordozy w czasie rui u szczurzy. MacLusky [46] wykazał, że u myszy poziom receptora progesteronowego jest niski w podwzgórzu i przysadce do 25 dnia życia, ale już w 3 dniu życia można podnieść jego stężenie przez wstrzyknięcie estradiolu. Większa ilość receptorów obserwowana u myszy 3-tygodniowych zbiega się z dojrzewaniem seksualnym i wzrostem poziomu estrogenów w tym czasie. W korze mózgowej natomiast występują receptory niewrażliwe na estrogeny. Ich rola nie została jeszcze poznana.

Ilościowe oznaczanie receptorów progesteronu jest bardzo trudne, bowiem ich kompleksy w odróżnieniu od estradiolu są bardzo labilne i cechują się stosunkowo wysoką stałą dysocjacji. Sytuację komplikuje jeszcze obecność dużych ilości transkortyny (CBG — corticosterone binding globuline) w krwi, która odznacza się wysokim powinowactwem do progesteronu.

Niedawno otrzymano syntetyczny progestagen R5020 o wysokim powinowactwie do receptora progesteronu z którym tworzy kompleksy o bardzo niskiej stałej dysocjacji (ryc. 9). W dodatku R5020 nie wiąże się z transkortyną. Dzięki tym jego właściwościom opracowano czuły test do oznaczania receptorów progesteronu [48]. Poszerzy on warsztat badawczy nad tym receptorem nie tylko w dziedzinie molekularnego mechanizmu działania tego hormonu, lecz przede wszystkim w badaniach roli receptorów w fizjologicznych procesach regulujących rozwój i funkcję organizmu.

LITERATURA

- [1] ALLEN T. C., LEAVITT W. W., Characterization and comparison of progesterone receptor in hamster vagina and uterus, *J. Steroid Biochemistry*, **14**: 29–36, 1981.
- [2] ATKINS D. T., KRAEMER D. C., HARMS P. G., FLEEGER J. L., Progesterone-receptor complex in the nuclear fraction of the bovine endometrium, *Biol. Reprod.*, **23**: 317–323, 1980.
- [3] BAULIEU E. E., ALBERGA A., RAYNAUD-JAMMET C., WIRA C. R., New look at the very early steps of oestrogen in uterus, *Nature (New. Biol.)*, **236**: 236, 1972.
- [4] BAULIEU E. E., Estrogen receptors and hormone receptivity. New approaches in pharmacology and therapeutics, [w:] *Cell Membrane Receptors for*

- Drugs and Hormons, red. Straub R. W., Raven Press, New York 1978, 129.
- [5] BERGINK E. W., WALLACE R. A., Van De BERG J. A., BOS E. S., GRUBER M., AB G., Estrogen induced synthesis of yolk proteins in roosters, *Ann. Zool.*, **14**: 1175, 1974.
- [6] BÜCHI K. A., KELLER P. J., The apparent in vivo affinity of estradiol binding sites in the uterus varies during the estrous cycle of the rat, *J. Steroid Biochemistry*, **13**: 1253-1260, 1980.
- [7] BULLER R. E., KUHN R. W., SCHRADER W. T., O'MALLEY B. W., Physiologic function and structure of a steroid hormone receptor purified to homogeneity, *Clin. Res.*, **23**: 387A, 1975.
- [8] BULLER R. E., TOFT D. O., SCHRADER W. T., O'MALLEY B. W., Progesterone binding components of chick oviduct. VIII. Receptor activation and hormone-dependent binding to purified nuclei, *J. Biol. Chem.*, **250**: 801, 1975.
- [9] BULLER R. E., O'MALLEY B. W., The biology and mechanism of steroid hormone receptor interaction with eukariotic nucleus, *Biochem. Pharmacol.*, **25**: 1, 1976.
- [10] CHAMNES G. C., COSTLOW M. E., McGUIRE W. L., Estrogen receptor in rat liver and its dependence on prolactin, *Steroids*, **26**: 363, 1975.
- [11] CHAMNESS G. C., McGUIRE W. L., Scatchard Plots: Common errors in correction and interpretation, *Steroids*, **26**: 4, 538-542, 1975.
- [12] CLARK J. H., CAMPBELL P. S., PECK E. J., Receptor-estrogen complex in the nuclear fraction of the pituitary and hypothalamus of male and female immature rats: measurement by agar gel electrophoresis, *Neuroendocrinology*, **77**: 218, 1972.
- [13] CLARK J. H., PECK E. J., Female sex steroids, Chapter II-Receptors and function, in *Monographs on Endocrinology*, red. F. Gross et al Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1979, 3-4.
- [14] DAVIES J., NAFTOLIN F., RYAN K. J., SIU J., Estradiol receptors in the pituitary and anterior hypothalamus of the rat: Measurement by agar gel electrophoresis, *Steroids*, **25**: 591, 1975.
- [15] DRAKE R. G., COOK B., The estrogen receptor of rabbit corpus luteum: Binding, dissociation, and stability characteristics, **105**: 561, 1979.
- [16] DUGAICZYK A., WOO S. L. C., O'MALLEY B. W., Genes in pieces, [w:] *Ontogeny of receptors and reproductive hormone action* red. Carl J., Sadler W. A., Raven Press, New York 1979, 1-11.
- [17] FEIL P. D., GLASSER S. R., TOFT D. O., O'MALLEY B. W., Progesterone binding in the mouse and rat uterus, *Endocrinology*, **91**: 738, 1972.
- [18] FEIL P. D., MANN W. J., Jr., MORTEL R., BARDIN C. W., Nuclear progestin receptors in normal and malignant human endometrium, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **48**: 327, 1979.
- [19] FOX Th. O., Oestradiol receptor of neonatal mouse brain, *Nature*, **258**: 4441, 1975.
- [20] GLASSCOCK R. K., HOEKSTRA W. G., Selective accumulation of tritium labeled hexoestrol by the reproductive organs of immature female gnats and sheep, *Biochem. J.*, **72**: 673, 1959.
- [21] GORSKI J., Early estrogen effects on the activity of uterine ribonucleic acid polymerase, *J. Biol. Chem.*, **239**: 889, 1964.
- [22] GORSKI J., TOFT D., SHYAMALA G., SMITH D., NOTIDES A., Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with the uterus, *Rec. Progr. Horm. Res.*, **24**: 45, 1968.

- [23] GORAL J. E., TURNELL R. W., WITTLIFF J. L., Properties of progesterone binding proteins in mammary tissues, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **16**: 154, 1975.
- [24] GREEN C. D., TATA J. R., Direct induction by estradiol of vitellogenin synthesis in organ cultures of male *Xenopus laevis* liver, *Cell*, **7**: 131, 1976.
- [25] GREEN G. L., CLOSS L. E., De SOMBRE E. R., JENSEN E. V., Antibodies to estrogen receptor: immunochemical similarity of estrophilin from various mammalian species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3681, 1977.
- [26] GREEN G. L., CLOSS L. E., De SOMBRE E. R., JENSEN E. V., Immunochimistry of estrophilin, [w:] *Ontogeny of receptors and reproductive hormone action*, red. Hamilton T. H., Clark J. H., Sadler W. A., Raven Press, New York 1979, 13-21.
- [27] HÄHNEL R., TWADDLE E., RATAJCZAK Th., The specificity of the estrogen receptor of human uterus, *J. Steroid Biochem.*, **4**: 21, 1973.
- [28] HARMAN S. M., LOUVET J. P., ROSS G. T., Interaction of estrogen and gonadotropins of follicular atresia, *Endocrinology*, **96**: 1145, 1975.
- [29] HARRISON R. W., TOFT D. O., Estrogen receptors in the chick oviduct, *Endocrinology*, **96**: 199, 1975.
- [30] HASLAM Z., SHYAMALA G., Effects of oestradiol on progesterone receptors in normal mammary glands and its relationship to lactation, *Biochem. J.*, **182**: 127, 1979.
- [31] HAUKKAMAA M., LUUKKAINEN T., The cytoplasmic progesterone receptor of human endometrium during the menstrual cycle, *J. Steroid Biochem.*, **5**: 447, 1974.
- [32] HENDERSON S. R., SCHALCH D. S., Estrogen receptors in human uterus, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **112**: 762, 1972.
- [33] HIGGINS S. J., ROUSSEAU G. G., BAXTER J. D., TOMKINS G. M., Nature of nuclear acceptor sites for glucocorticoids — and estrogen receptor complex, *J. Biol. Chem.*, **248**: 5873, 1973.
- [34] HIROSE M., TSAI M. J., O'MALLEY B. W., Effects of estrogen on gene expression in chick oviduct. VII. Kinetics of initiation of in vitro transcription on chromatin, *J. Biol. Chem.*, **251**: 1137, 1976.
- [35] JENSEN E. V., JACOBSON H. I., Basic guides to the mechanism of estrogen action, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **18**: 387, 1962.
- [36] JENSEN E. V., Metabolic fate of sex hormones in target tissues with regard to tissue specificity, *Proc. Sec. Int. Congr. Endocrin. London*, Excerpta Med. Found., Amsterdam 1965, 420-433.
- [37] JENSEN E. V., SUZUKI T., KAWASHIME T., STUMPF W. E., JUNGBLUT P. W., DeSOMBRE E. R., A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**: 632, 1968.
- [38] JENSEN E. V., DeSOMBRE E. R., Mechanism of action of the female sex hormones, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**: 541, 1972.
- [39] KATO J., Localization of oestradiol receptors in the rat hypothalamus, *Acta Endocrinol.*, **72**: 663, 1973.
- [40] KATO J., YACHIYO ATSUMI, MACHICO INABA: Estradiol receptors in female rat hypothalamus in the development stages and during pubescence, *Endocrinology*, **94**: 309, 1974.
- [41] KATO J., ONOUCHI T., Nuclear progesterone receptors and characterization of cytosol receptors in the rat hypothalamus and anterior hypophysis, *J. Steroid Biochem.*, **11**: 845, 1979.

- [42] KORACH K. S., MULDOON Th. G., Comparison of specific 17 beta-estradiol-receptor interactions of male and female rats, *Endocrinology*, **92**: 322, 1973.
- [43] LEAVITT W. W., TOFT D. O., STROTT C. A., O'MALLEY B. W., A specific progesterone receptor in the hamster uterus: Physiologic properties and regulation during the estrous cycle, *Endocrinology*, **94**: 1041, 1974.
- [44] LESSEY B. A., GORELL T. A., Analysis of the progesterone receptor in the beagle uterus and oviduct., *J. Steroid Biochemistry*, **13**: 1173-1180, 1980.
- [45] LOUVETT J. P., VAITUKAITIS J. L., Induction of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming, *Endocrinology*, **99**: 758, 1976.
- [46] MacLUSKY N. J., McEWEN B. S., Oestrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others, *Nature*, **274**: 276, 1978.
- [47] MILGROM E., PERROT M., ABGER M., BAULIEU E. E., Progesterone in uterus and plasma: V. An assay of the progesterone cytosol receptor of the guinea-pig uterus, *Endocrinology*, **90**: 1964, 1972.
- [48] MILGROM E., Vu HAI M. T., LOGEAT F., Use of ³H-R5020 for the assay of cytosol and nuclear progesterone receptor in the rat uterus, [w:] Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues, red. McGuire W. L., Raynaud J. P., Baulieu E. E., Raven Press, New York 1977, 261-270.
- [49] MOGUILLEWSKY M., RAYNAUD J. P., The relevance of hypothalamic and hypophyseal progestin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behaviour in the female rat, *Endocrinology*, **105**: 516, 1979.
- [50] MOHLA S., DeSOMBRE E. R., JENSEN E. V., Tissue specific stimulation of RNA synthesis by transformed estradiol-receptor complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**: 661, 1972.
- [51] MORRIS I. D., MURCOTT C., Changes in the concentration of cytoplasmic oestrogen receptors in the hypothalamus, amygdala, pituitary, and uterus of the ovariectomized rat after administration of oestradiol 17-beta, *J. Endocrinol.*, **64**: 23P, 1974.
- [52] MOULTON B. C., KOENIG B. B., Estrogen receptor in deciduoma cells separated by velocity sedimentation, *Endocrinology*, **108**: 484-488, 1981.
- [53] MORRIS J. S., KOHLER P. O., Steroid receptors in cultured cells: Characterization of the androgen receptor from a Syrian Hamster ductus deferens tumor cell line (DDT₁), *Science*, **192**: 898, 1976.
- [54] NOTIDES A. C., NIELSEN S., The molecular mechanism of the in vitro transformation of 4S to 5S of the uterine estrogen receptor, *J. Biol. Chem.*, **249**: 1866, 1974.
- [55] O'MALLEY B. W., McGUIRE W. L., KOHLER P. O., KORENMAN S. G., Studies on the mechanism of steroid hormones regulation of synthesis of specific proteins, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **25**: 105-160, 1969.
- [56] O'MALLEY B. W., TOFT D. O., SHERMAN M. R., Progesterone receptors in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **67**: 501, 1970.
- [57] O'MALLEY B. W., MEANS A. R., Female steroid hormones and target cell nuclei, *Science*, **183**: 610, 1974.
- [58] O'MALLEY B. W., BULLER R. E., Current concepts in steroid hormone action, [w:] *The year in Endocrinology*, red. Ingbar S. H., 1975-1976, Plenum Medical Book Co, New York, London 1976, 277-315.

- [59] O'MALLEY B. W., SCHRADER W. T., The receptors of steroid hormones, *Sc. American.*, **234**: 32, 1976.
- [60] PADZIK M., PASZKO Z., Oznaczenie receptora estrogenowego w cytozolu komórek docelowych dla estrogenów. Różnicowanie wiązań swoistych od nieswoistych, [w:] *Mechanizmy molekularne w działaniu hormonów. Biomolekularne podstawy interakcji hormon-komórka*, red. Dawidowicz A., PZWL, Warszawa 1975, 56-74.
- [61] PASQUALINI J. R., NGUYEN B. L., Progesterone receptors in the foetal uterus of guinea-pig: Its stimulation after oestradiol treatment, *Experimentia*, **35**: 1116, 1979.
- [62] PHILIBERT D., RAYNAUD J. P., Cytoplasmic progestin receptors in mouse uterus, [w:] *Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues*, red. McGuire W. L., 1977, 227-243.
- [63] PHUONG N. T., SAUER G., RAPOPORT S., Evidence for a specific estradiol receptor in the rat hypothalamus, *Acta Biol. med. germ.*, **28**: 379, 1972.
- [64] PUCA G. A., NOLAN E., SICA V., BRESCIANI F., Estrogen-binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins, *Biochemistry*, **10**: 3769, 1971.
- [65] RAO R., WIEST W. G., ALLEN W. M., Progesterone "receptor" in rabbit uterus. I. Characterization and estradiol-17beta augmentation, *Endocrinology*, **92**: 1229, 1973.
- [66] RAYNAUD J. P., MOGAILEWSKY M., Steroid competition for estrogen receptors in the central nervous system, *Prog. reprod. Biol.*, **2**: 78, 1977.
- [67] RICHARDS J. S., Content of nuclear estradiol-receptor complex in rat granulosa cells during follicular development: Modification by estradiol and gonadotropins, *Endocrinology*, **97**: 1174, 1975.
- [68] RICHARDS J. S., Hormone regulation of hormone receptors in ovarian follicular development, [w:] *Ovarian follicular development and function*. red. Midgley A. R., Sadler W. A., Raven Press, New York 1979, 225-242.
- [69] SCATCHARD G., The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **51**: 660, 1949.
- [70] SCHINKE R. T., McKNIGHT G. S., SHAPIRO D. J., SULLIWAN D., PALACIOS R., Hormonal regulation of ovalbumin synthesis in the chick oviduct, *Rec. Progr. Horm. Res.*, **31**: 175, 1975.
- [71] SCHRADER W. T., O'MALLEY B. W., Progesterone-binding capacity of chick oviduct, *J. Biol. Chem.*, **247**: 51, 1972.
- [72] SHAPIRO J., BAKER H. J., Estrogen regulation of *Xenopus laevis* vitellogenin gene expression, [w:] *Ontogeny of receptors and reproductive hormone action* red. Hamilton T. H., Clark J. H., Sadler W. A., Raven Press, New York 1979, 309-330.
- [73] SICA V., NOLA E., PARIKH I., PUCA G. A., CUATRECASAS P., Purification of oestradiol receptors by affinity chromatography, *Nature, New Biology*, **244**: 132, 36-39, 1973.
- [74] SMITH R. G., IRAMAIN C. A., BUTTRAM V. C., O'MALLEY B. W., Purification of human uterine progesterone receptor, *Nature*, **253**: 271, 1975.
- [75] SPELSBERG T. C., STEGGLES A. W., O'MALLEY B. W., Progesterone-binding components of chick oviduct. III. Chromatin acceptor sites, *J. Biol. Chem.*, **246**: 4188, 1971.
- [76] SPELSBERG T. C., STEGGLES A. W., CHYTIL F., O'MALLEY B. W., Pro-

- gesterone binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatin, *J. Biol. Chem.*, **247**: 1368, 1972.
- [77] SPELSBERG T. C., HALBERG F., Circannual rhythms in steroid receptor concentration and nuclear binding in the chick oviduct, *Endocrinology*, **107**: 1234-1233, 1980.
- [78] SPILMAN C. H., WILKS J. W., Progesterone receptor binding characteristics following freezer storage of uterine cytosol, *J. Steroid Biochemistry*, **13**: 1249-1251, 1980.
- [79] STUPNICKI R., Opracowywanie wyników oraz kontrola jakości w radioimmunologii, [w:] *Metody radioimmunologiczne i radiokompetycyjne stosowane w klinice.*, F. Kokot i R. Stupnicki, PZWL, Warszawa 1979, 66.
- [80] SUMIDA C., PASQUALINI J. R., Relationship between cytosol and nuclear oestrogen receptors and oestrogen concentrations in fetal compartment of guinea-pig, *J. Steroid Biochem.*, **11**: 267, 1979.
- [81] TOFT D. O., GORSKI J., A receptor molecule for estrogens: Isolation from the rat uterus and preliminary characterization, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **55**: 1574, 1966.
- [82] TOFT D. O., O'MALLEY B. W., Target tissue receptors for progesterone. The influence of estrogen treatment, *Endocrinology*, **90**: 1041, 1972.
- [83] WESTPHAL U., Steroid Protein Interactions., [w:] *Monographs on Endocrinology*, Springer Verl., Berlin-Heidelberg-New York 1971, 4: 75-78.
- [84] WILLIAMS D., GORSKI J., A new assessment of subcellular distribution of bound estrogen in the uterus, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **45**: 258, 1972.
- [85] WISE P. M., PAYNE A. H., KARSCH F. J., JAFFE R. B., Cytoplasmic oestrogen receptor complex of female ovine pituitary: Changes associated with the reproductive state and oestrogen treatment, *J. Endocr.*, **67**: 447, 1975.
- [86] WITTLIFF J. L., Steroid binding proteins in normal and neoplastic mammary cells, [w:] *Methods in Cancer Research*, red. Busch H., Academic Press, New York 1975, **11**: 293-354.
- [87] ZAKRZEWSKI K., Mechanizmy molekularne w działaniu hormonów, [w:] *Biomolekularne Podstawy Interakcji hormon — komórka*, red. Dawidowicz A., PZWL, Warszawa 1975, 2-24.
- [88] ZIMMERLING D. E., KAHN I., LIEBERMAN S., Estradiol and progesterone binding fraction of ovine endometrial cytoplasm, *Biochemistry*: 2498, 1970.

Otrzymano: 28 stycznia 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autorki: ul. Karasia 6, 30-060 Kraków.

RECEPTORY KOMÓRKOWE PROLAKTYNY I LAKTOGENU ŁOŻYSKOWEGO *

CELLULAR PROLACTIN AND PLACENTAL LACTOGEN RECEPTORS

Piotr CHOMCZYŃSKI

Instytut Fizjologii Zwierząt SGGW — AR, Warszawa

Streszczenie. W artykule przedyskutowano występowanie receptorów prolaktyny i laktogenu łożyskowego w różnych narządach. Opisano budowę receptorów i mechanizm wiązania hormonów oraz regulację poziomu receptorów w gruczole mlekowym, wątrobie, nerce i narządach rozrodczych.

Summary. The occurrence of prolactin and lactogen receptor in various organs is discussed, their structure and the mechanism of hormone binding are described and so is the regulation of the level of these receptors in the mammary glands, liver, kidney and reproductive organs.

Prowadzone w latach siedemdziesiątych badania nad receptorami komórkowymi prolaktyny (PRL) i laktogenu łożyskowego (PL) wykazały, że oprócz gruczołu mlekowego również inne narządy i tkanki zwierzęce mają zdolność wybiórczego wiązania obu laktogenów. Stało się to podstawą do przewartościowania poglądów dotyczących działania PRL i PL, tradycyjnie uznawanych za hormony o działaniu skoncentrowanym na sterowaniu procesem laktogenezy w gruczole mlekowym.

Istnienie komórkowego receptora dla PRL wykazane zostało po raz pierwszy w gruczole mlekowym przez Turkingtona i wsp. [49]. Autorzy ci, stosując ^{125}J -PRL, stwierdzili występowanie w błonie komórkowej gruczołu mlekowego dwóch miejsc wiążących znakowany hormon. Jedno z miejsc posiadało niskie powinowactwo wobec PRL, a związany hormon można było usunąć poprzez kilkakrotne wirowanie. Drugie

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r. zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie

TABELA 1

Specyficzne wiązanie ^{125}J -oPRL do narządów różnych zwierząt

Zwierzę	% specyficznego wiązania		
	> 3%	3–1%	< 1%
Małpa rezus ♀ ♂	—	serce, jajnik	wątroba, nerka, płuca, śledziona, mięśnie szkieletowe, macica, łożysko, nadnercza, mózg, gr. mlekowy, jądra
Szczur ♀	wątroba [10, 30]	przepona	nerka, płuca, śledziona, mózg, m. szkieletowe, macica, tkanka tłuszczowa, łożysko, gr. mlekowy
Królik ♀	wątroba [42] nadnercza (10) gr. mlekowy [23, 30] jajnik [11, 30] (5,3)	nerka, tkanka tłuszczowa, trzustka, macica	serce, mięśnie szkieletowe, łożysko
Owca ♀	macica (11,2) jajnik (6)	gr. mlekowy nadnercza	nerka, płuco, trzustka, śledziona, tkanka tłuszczowa, łożysko
Świnka morska ♀	—	tk. tłuszczowa	wątroba, nerka, płuco, trzustka, śledziona, macica, serce, łożysko
Gołąb	wątroba (3,2)	—	nerka, serce, mózg, mięśnie szkieletowe
Żaba ♀	nerka (2,9)	—	wątroba, serce, mięśnie szkieletowe

W nawiasach podano procent specyficznego wiązania. Specyficzne wiązanie ^{125}J -prolaktyny wyrażono jako procent całkowitej ilości radioaktywnego hormonu dodanego do badanej próby (według Posnera i wsp. [39]). o PRL = owczy PRL.

miejsce wiążące charakteryzowało się wysokim powinowactwem wobec PRL, a utworzony kompleks nie rozpadał się w czasie wirowania. Wiązanie ^{125}J -PRL hamowane było przez nieznakowaną PRL oraz hormony mające działanie laktogenne (PL, hormon wzrostu), natomiast inne hormony białkowe nie wykazywały wpływu na to wiązanie. Miejsce wiążące hormonu — wykazujące wysokie powinowactwo i specyficzność wiązania — odpowiada, zgodnie z obecnie przyjętym kryterium, miejscu receptorowemu. Wkrótce potem wykazano istnienie receptorów PRL w innych narządach i tkankach. W tabeli 1 przedstawiono wyniki doświadczeń wykonanych przez Posnera i wsp. [38]. W badaniach stosowano frakcję błon komórkowych odwirowanych przy 100 000 g. Frakcja ta wykazuje największą aktywność wiązania ^{125}J -PRL oraz najwyższą zawartość fragmentów błony komórkowej. Porównując wyniki badań prowadzonych na różnych gatunkach zwierząt, można zauważyć szcze-

gólnie wysoką aktywność receptorów PRL w wątrobie. W przypadku małpy i świnki morskiej nie stwierdzono wysokiej aktywności wiązania ^{125}J -PRL do preparatów uzyskanych z różnych narządów i tkanek obu zwierząt. Można sądzić, że używana w badaniach owcza ^{125}J -PRL nie nadaje się do testowania aktywności receptorów PRL u tych dwu gatunków. Niektóre z przytoczonych w tab. 1 wyników nie znalazły potwierdzenia w badaniach innych autorów. Zestawienie danych zawarte w tab. 1 i 2 wskazuje na znaczne różnice w aktywności wiązania ^{125}J -PRL, szczególnie w przypadku komórek nadnerczy, macicy i nerki królika. Również badania wykonane przez Marshala i wsp. [30] nad receptorem PRL z komórek nerki szczura i badania Hayden'a i wsp. [21] prowadzone przy użyciu gruczołu mlekowego, wskazują na znacznie wyższe specyficzne wiązanie PRL (sięgające do kilkunastu procent) niż wynikałoby to z tab. 1.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przy użyciu preparatów błon komórkowych narządów królika wskazują, że miejsce receptorowe wiążące PRL posiada wysokie powinowactwo również wobec PL. Przyłą-

TABELA 2

Specyficzne wiązanie owczego ^{125}J -PL w różnych narządach królika

Wyszczególnienie	Specyficzne wiązanie %		Kompetycja przez inne hormony %				
	^{125}J -oPL	^{125}J -oPRL*	oPL	hPL	bPRL	bGH	bPL
Nadnercza	58	51	100	100	98	53	45
Wątroba	21	26	100	100	98	75	36
Jajnik	20	13	100	100	100	54	39
Gr. mlekowy	16	20	100	98	100	37	26
Macica	12	3	100	100	100	36	31
Nerka	8,8	7	100	99	100	52	26
Mózg	8,5		100	100	100	72	69
Tk. tłuszczowa	7,9		100	99	100	44	22
Wątroba płodu	2,8						
Serce	2,5						
Łożysko	2,1						
Mięśnie szkieletowe	< 2						
Płuco	< 2						

Według Bolander i wsp. [11].

* Posner i wsp. [39]; Frieson i wsp. [18].

o — owczy, b — bydłocy, h — ludzki.

czanie się obu laktogenów do jednego receptora stwierdzone zostało początkowo w gruczole mlekowym, a następnie w innych narządach królika [11, 47]. Zjawisko to ilustrują wyniki przedstawione w tab. 2. Związany z receptorem ^{125}J -oPL wypierany jest całkowicie przed nad-

miar nieznakowanego hPRL i bPRL oraz w 50% przez bPRL. Dla porównania w tabeli zamieszczono wyniki oznaczeń aktywności receptorowej dla oPRL wykonanych w innym laboratorium. Jak widać, aktywność wiązania PRL w badanych narządach jest bardzo podobna do

TABELA 3

Specyficzne wiązanie ^{125}J -oPRL do frakcji błon komórkowych wątroby owcy

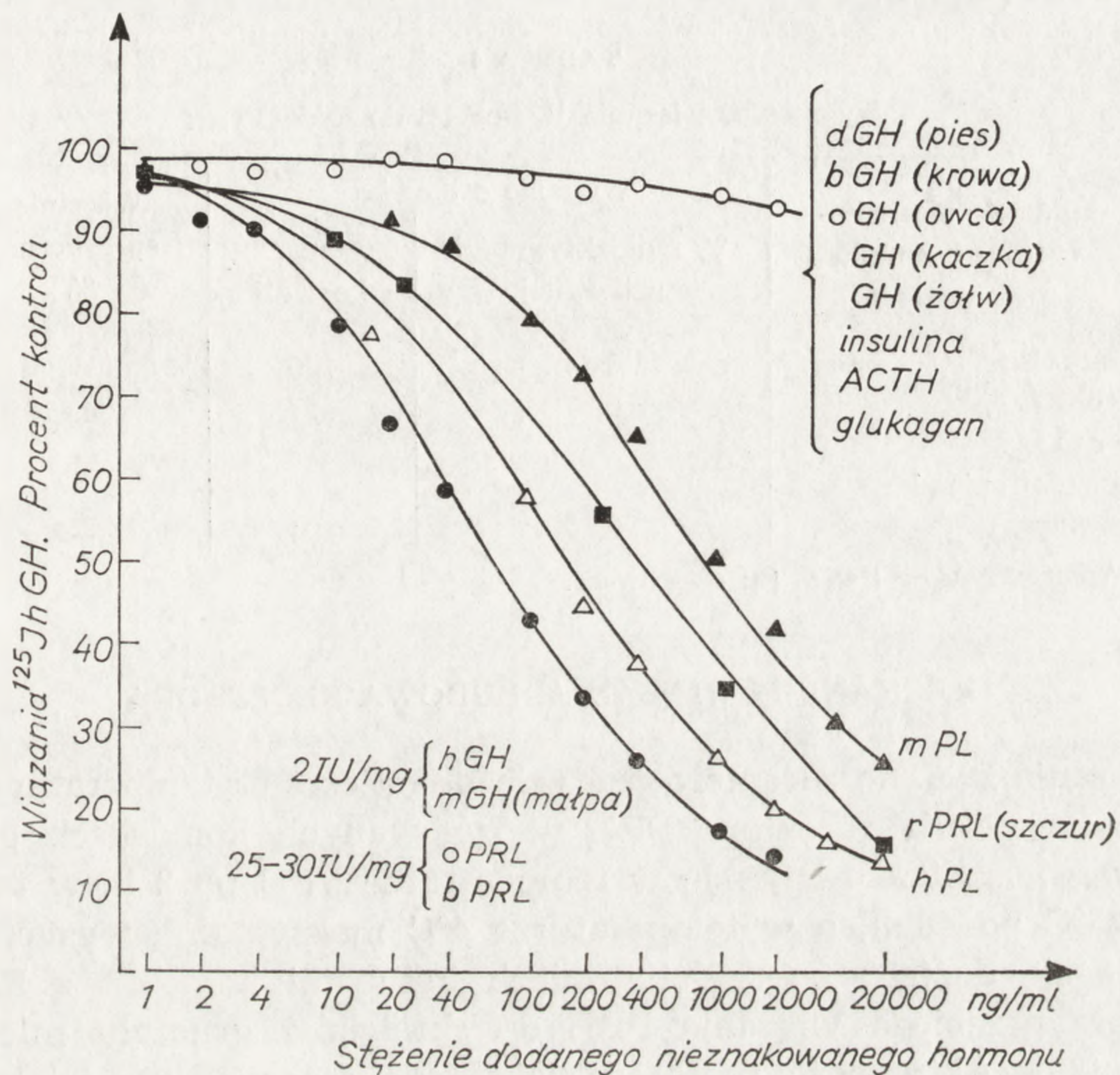
Ilość dodawanego nieznakowanego hormonu, ng/ml	Wiązanie ^{125}J -oPRL (% kontroli)		
	+ oPL	+ oGH	+ oPRL
0 (kontrola*)	100	100	100
10	94	98	100
1000	53	65	100
10000	52	55	97

* Wiązania specyficzne w kontroli — 10,4%.
Według Chan i wsp. [12].

aktywności wiązania PL. Można sądzić, że przynajmniej u królika PL i PRL wiążą się do tego samego miejsca receptorowego. Podobnie wspólny receptor dla obu laktogenów stwierdzono w komórkach nabłonka nasieniowodu i komórkach gruczołu mlekowego szczura [7, 23] oraz w komórkach nowotworowych gruczołu mlekowego szczura [40, 48]. Trudno jest obecnie sądzić, czy wspólny receptor dla PRL i PL istnieje u wszystkich zwierząt. Oznaczenia wykonane w pracowni Friesena [11] zdają się nie potwierdzać tej reguły. W tab. 3 przedstawiono wyniki wiązania oPRL do różnych narządów owcy. Wiązanie oPRL hamowane jest przez oGH, natomiast dodanie oPRL nie obniża wiązania laktogenu łożyskowego. Brak kompetycji między oPL i oPRL wskazywałoby na różne miejsca receptorowe dla obu hormonów. Jednakże, jak podają autorzy tej pracy, z nieznanых przyczyn oPRL wiąże się bardzo słabo do tkanek i narządów owcy (poniżej 3% specyficznego wiązania). Wyjątek stanowi macica w okresie ciąży, gdzie specyficzne wiązanie ^{125}J -PRL wynosi około 14%. Natomiast gruczoł mlekowy czy wątroba wskazuje nikłą aktywność receptora PRL. Można zauważyć, że jest to jedna z nielicznych prac, w której stosowano system homologiczny, tj. użyte hormony izolowano z tego samego gatunku zwierząt, na którym prowadzono badania. Uzyskano jednak dość nieoczekiwane i trudne do interpretacji wyniki.

Dane zawarte w tab. 2 i 3 wskazują, że powinowactwo do receptora laktogennego wykazuje również hormon wzrostu (GH). Fakt ten pozostaje w zgodzie z laktogennym działaniem tego hormonu. Kompetycyjne wiązanie hormonów wzrostowych i laktogennych szczególnie dokładnie przedstawione zostało w pracy Posnera i wsp. [38] (ryc. 1). Hor-

mony wzrostowe naczelnych oraz hPRL, oPRL i bPRL są równocenne w usuwaniu ^{125}J -hGH z miejsca receptorowego w preparacie frakcji błon komórkowych wątroby szczura. Wysoką kompetycję wykazuje także rPRL, hPL i mPL (r — szczur, h — człowiek, m — małpa).



Ryc. 1. Specyficzność wiązania ^{125}J -hGH do frakcji błon komórkowych izolowanej z wątroby samicy szczura (według Posnera i wsp. [38])

Krzywe przedstawiają zależności między wzrastającą ilością nieznakowanych hormonów a wiązaniem ^{125}J -hGH. Obok krzywych podano źródło izolacji nieznakowanych hormonów. 100% wiązania — ilość związanego ^{125}J -hGH w próbce bez dodatku nieznakowanego hormonu; h — człowiek

Niektórzy autorzy sugerują istnienie w wątrobie szczura dwóch rodzajów miejsc receptorowych dla GH. Jedno z nich, laktogenne potencjalnie wiążące PRL i PL oraz drugie wiążące przede wszystkim GH. Wydaje się jednak bardziej prawdopodobne, że wątroba zawiera tylko jeden rodzaj miejsca receptorowego wiążącego GH i laktogeny. Sugestię tę zdaje się potwierdzać fakt, że nawet tak specyficzną odpowiedź wątroby na GH, jaką jest produkcja somatomedyny, można wywołać stosując oPRL lub oPL [9].

Rozważając występowanie receptorów w komórkach różnych tkanek należy brać pod uwagę, że specyficzne wiązanie hormonu (szczególnie

przy niskim poziomie wiązania) nie jest wystarczającym dowodem docelowości tkanki dla danego hormonu. Można tu przypomnieć doświadczenia Cuatrecasas'a i Hollenberga [15] wykazujące specyficzne wiązanie insuliny do szkła czy talku. Podobne zjawisko wykazano w przypadku PRL (tab. 4).

TABELA 4
Specyficzne wiązanie ^{125}J -oPRL do szkła Pyrex

Dodatek nieznakowanego hormonu	Wiązanie całkowite		Wiązanie specyficzne %
	% radioaktywności całkowitej	% kontroli	
Kontrola	0,64	100	—
+ oPRL	0,37	57	43
+ oCG (gonadotropina kosmówkowa)	0,69	104	—

Według Barkey i wsp. [6]; o — owcza.

MECHANIZM WIĄZANIA, BUDOWA RECEPTORA

Wiązanie PRL do receptora jest zależne od czasu i temperatury. Maksimum wysycenia receptora PRL w izolowanych komórkach gruczołu mlekowego królika osiąga się w temperaturze 37°C po 2 h, w temperaturze 23°C po 48 h, a w temperaturze 4°C maksymalne wysycenie obserwuje się dopiero po sześciu dniach inkubacji komórek z PRL [2]. Podobnie przebiega wiązanie PRL do skrawków gruczołu mlekowego myszy [29]. Aktywność receptora laktogenów zanika po działaniu na komórki lub preparaty błon komórkowych trypsyną (spadek do 53% po 15 min) oraz fosfolipazą A lub C. Natomiast kolagenaza, neuraminidaza, rybonukleaza i dezoksyrybonukleaza nie wpływają na aktywność receptora PRL [2, 49]. Miejsce receptorowe dla PRL w jajniku ludzkim, krowy i szczura wykazuje podobne właściwości jak w gruczole mlekowym. Maksimum aktywności receptora obserwowano przy pH 7 w temperaturze 37°C . Wiązanie PRL w tym narządzie hamowane jest całkowicie przy pH 10, a w środowisku kwaśnym (poniżej pH 3) receptor ulega nieodwracalnej denaturacji [41].

Shiu i Friesen [45] przeprowadzili izolację receptora PRL z frakcji błon cytoplazmatycznych gruczołu mlekowego królika. Przeprowadzono solubilizację receptora stosując triton X-100, a następnie oczyszczano receptor metodą chromatografii powinowactwa. Uzyskany preparat nie był homogeny i zawierał oprócz receptora kilka rodzajów białek widocznych po rozdziale elektroforetycznym. Stwierdzono, że receptor jest

białkiem o masie 220 000. Białko to wykazuje wyższą stałą asocjacji wobec PRL ($K_a 16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) w porównaniu z wiązaniem PRL do frakcji błon cytoplazmatycznych ($K_a 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$). Mając na uwadze hamowanie wiązania PRL przez fosfolipazę można sądzić, że receptor PRL jest fosfolipidem. Na udział fosfolipidów w wiązaniu hormonów do receptora laktogenów wskazują również badania przeprowadzone przez Vonderhaar i Bhattacharya [5]. Stwierdzono w nich, że donor grup metylowych S-adenozyno-L-metionina (AdoMet) zwiększa liczbę miejsc receptorowych dla PRL w błonie cytoplazmatycznej. Obserwowany efekt jest specyficzny dla AdoMet i ulega zmniejszeniu w obecności S-adenozylhomocysteiny (kompetycyjny inhibitor metylotransferaz błonowych). Znakowane grupy metylowe pochodzące z AdoMet znaleziono wyłącznie we frakcji lipidów. Obecne w błonie cytoplazmatycznej metylotransferazy katalizują syntezę fosfatydylocholina z fosfatydyloetanolaminy. Utworzona fosfatydylocholina wędruje ku powierzchni błony cytoplazmatycznej zmieniając tym samym jej strukturę przestrzenną.

Powinowactwo PRL do receptora laktogenów zanika po modyfikacji dwu reszt tryptofanowych w jej cząsteczce [27]. Stwierdzono, że chemiczna modyfikacja zmienia sposób zwinięcia łańcucha PRL, co wydaje się być przyczyną utraty powinowactwa hormonu do receptora. Zmiany konformacyjne zmodyfikowanej PRL wykazano na podstawie pomiarów dichroizmu kołowego. Jednocześnie z utratą zdolności wiązania się do receptora zmodyfikowana PRL traci swoje właściwości biologiczne [28]. Znajomość sekwencji aminokwasów w cząsteczce PRL pozwoliła na sporządzenie modelu obrazującego przestrzenne ułożenie łańcucha PRL [27]. Występuje w nim 67% struktury α -helisy, 17% zwinięć (turn), 11% struktury aperiodycznej oraz 5% struktury β (β -sheet). Modyfikacja dwu reszt tryptofanowych zwiększa zawartość w PRL struktury β . Autorzy cytowanej pracy przeprowadzili ciekawe porównanie ułożenia przestrzennego łańcuchów PRL i GH. Mimo różnic w składzie aminokwasowym oba te hormony wykazują ogromne podobieństwo konformacyjne. Mając na uwadze ich zbliżone powinowactwo do receptorów, można sądzić, że nie sama sekwencja aminokwasów, lecz przede wszystkim ułożenie przestrzenne łańcucha decyduje o wiązaniu hormonu do receptora.

Otrzymanie częściowo oczyszczonego receptora laktogenów pozwoliło na podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie czy receptor występujący w różnych tkankach jest tą samą cząsteczką białkową [46]. W badaniach tych posłużono się przeciwciałami antyreceptorowymi uzyskanymi po wstrzyknięciu świnie morskiej preparatu receptora laktogenów wyizolowanego z gruczołu mlekowego królika. Otrzymane przeciwciała antyreceptorowe hamowały specyficzne wiązanie PRL w tkan-

ce gruczołu mlekowego i wątroby królika. Ponadto przeciwciała te hamowały wiązanie PRL również w przypadku użycia błon cytoplazmatycznych izolowanych z różnych tkanek szczura (samic i samców), myszy i człowieka (tab. 5). Przedstawione wyniki wskazują, że badane

TABELA 5

Zestawienie tkanek wykazujących immunologiczne podobieństwo receptora PRL

Gatunek	Tkanka	Użyty do oznaczeń preparat
Królik	gr. mlekowy	skrawki w hodowli, błony, oczyszczony receptor
	wątroba	błony
Szczur	gr. mlekowy	błony
	gr. mlekowy (nowotwór)	błony
	wątroba	błony
	prostata	błony
Mysz	gr. mlekowy (nowotwór)	błony
Człowiek	gr. mlekowy (nowotwór)	błony

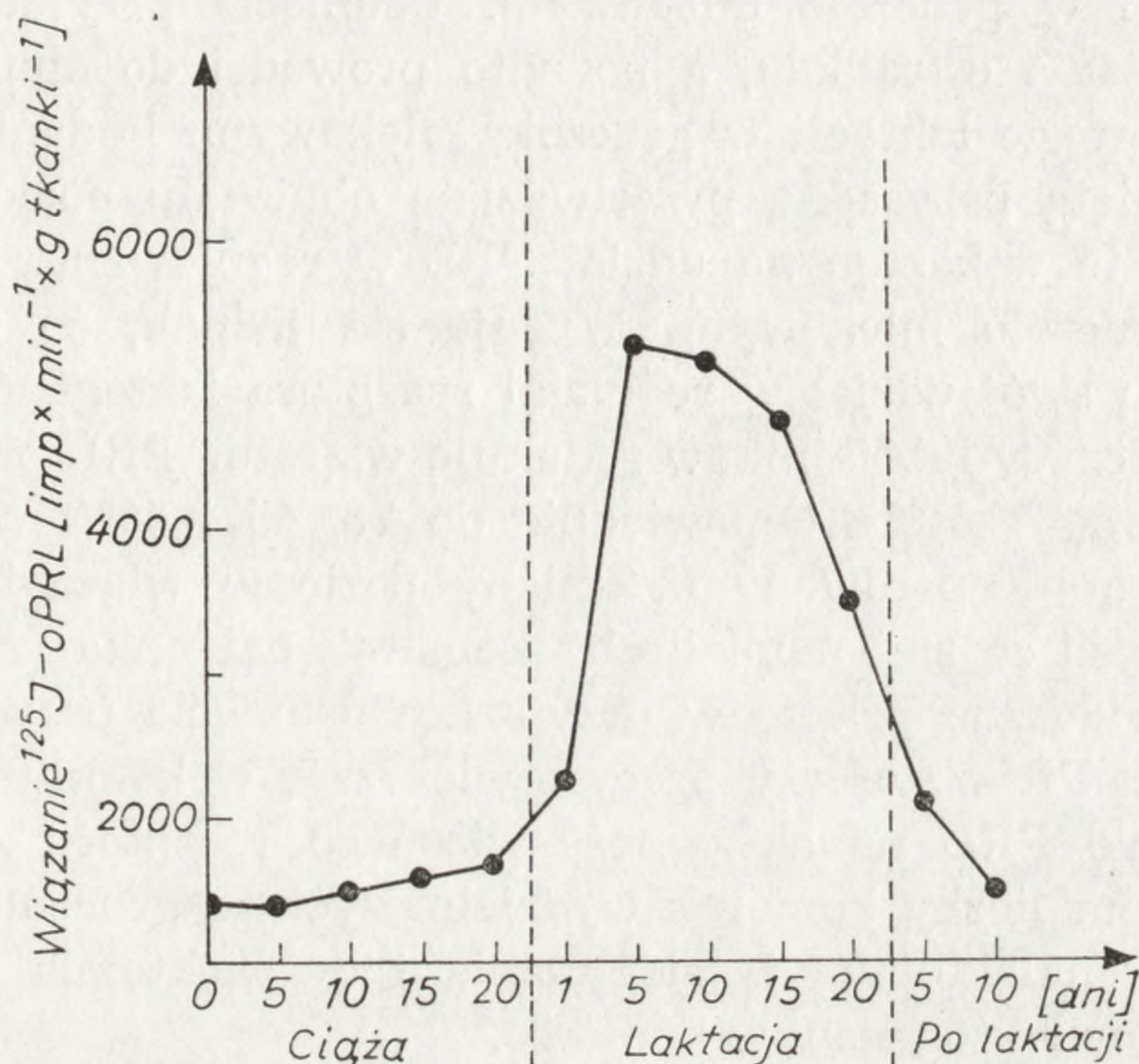
Według Shiu i Friesen [46].

tkanki zawierają w miejscu receptora laktogenów tę samą determinantę antygenową. Można więc sądzić o filogenetycznym podobieństwie receptora laktogenów u różnych gatunków zwierząt.

REGULACJA POZIOMU RECEPTORA

Wiązanie hormonu do receptora jest jednym z istotnych momentów regulujących odpowiedź tkanki na impuls hormonalny. Tworzenie kompleksu hormon—receptor powinno więc pozostawać w korelacji z aktywnością metaboliczną komórki i podlegać kontroli określonych czynników. Jednym z czynników decydujących o ilości utworzonego kompleksu jest oczywiście stężenie hormonu, zależne od intensywności pracy gruczołów dokrewnych. Stężenie drugiego elementu tworzącego kompleks, tj. receptora, również nie jest stałe i zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia. W odniesieniu do receptora laktogenów stwierdzono szczególnie duże zmiany w jego poziomie w okresie ciąży i laktacji. Zmiany aktywności wiązania ^{125}J -PRL do gruczołu mlekowego szczura przedstawione są na ryc. 2. Podobnie kształtują się zmiany aktywności wiązania PRL u myszy [29]. Jest rzeczą zastanawiającą, że w okresie ciąży, podczas intensywnego rozwoju gruczołu mlekowego, obserwuje się stosunkowo niewysoki poziom receptora laktogenów. Dość proste wytłumaczenie tego faktu przyniosła praca Holcomba i wsp. [23]. Stwierdzono w niej, że niski poziom wiązania ^{125}J -PRL spowodowany

jest maskowaniem miejsc receptorowych przez laktogen endogeny. W okresie ciąży obserwuje się bowiem niezwykle wysoki poziom hormonu laktogenego z łożyska sięgający do $1,2 \mu\text{g/ml}$. Zahamowanie syntezy laktogenu poprzez usunięcie łożyska powodowało kilkakrotny wzrost



Ryc. 2. Wiązanie specyficzne ^{125}J -oPRL do frakcji błon komórkowych z gruczołu mlekowego szczura (według Hayden i wsp. [4])

aktywności receptora dla PRL. Sugerowany efekt maskowania receptora nie wyjaśnia wszystkich znanych faktów. Wiadomo jest np., że u samic szczurów, które nie karmią swego potomstwa, w okresie poporodowym nie obserwuje się wzrostu wiązania ^{125}J -PRL w gruczole mlekowym, mimo obniżenia u nich poziomu laktogenów we krwi [10]. Poza tym według Kohomoto i Sakai [29] wzrost wiązania PRL jest po usunięciu łożyska związany z następstwami pooperacyjnymi, a mianowicie poronieniem i rozpoczęciem laktacji. Autorzy ci wykazali ponadto, że niski poziom wiązania PRL do receptora w gruczole mlekowym myszy w okresie ciąży odzwierciedla niską aktywność receptorową i nie jest wynikiem maskowania miejsc wiążących przez hormon endogeny.

Przytoczone fakty wskazują na istnienie w komórce mechanizmu umożliwiającego zmianę ilości wychwytywanego z krwi hormonu poprzez zmianę aktywności receptora. Wydaje się, że istnieją różnorodne mechanizmy pobudzania lub obniżania aktywności receptora laktogenów w poszczególnych tkankach lub narządach. Wskazuje to na m.in. fakt, że u szczura między trzydziestym i setnym dniem życia poziom receptora w gruczole mlekowym spada o około 40%, a w tym samym okresie w wątrobie wzrasta o około 200% [21].

GRUCZOŁ MLEKOWY

Szczegółowe badania czynników regulujących poziom receptora laktogenów w gruczole mlekowym przeprowadzono w pracowni Forsth [21]. Stwierdzono, że wstrzyknięcie zwierzęciu estradiolu powoduje wzrost wiązania PRL w gruczole mlekowym. Usunięcie przysadki zapobiega efektowi działania estradiolu, a ponadto prowadzi do obniżenia wiązania PRL w okresie laktacji w gruczole mlekowym. Podanie PRL zwierzęciu z usuniętą przysadką przeciwdziała obniżeniu poziomu wiązania PRL. Wyniki te wskazują na udział PRL w regulowaniu własnego receptora w gruczole mlekowym. Wydaje się jednak, że również inne hormony mają swój udział w regulacji receptora laktogenów. Usunięcie nadnerczy, tarczycy lub jajników redukuje wiązanie PRL przez laktujący gruczoł mlekowy szczone odpowiednio do 73, 45 i 59% w porównaniu ze zwierzęciem nieoperowanym. Zmiany poziomu wiązania PRL pozostają w korelacji ze zmianami liczby komórek nabłonka wydzielniczego. Najbardziej widoczne jest to w przypadku usunięcia przysadki i podaniu zwierzęciu PRL. Autorzy pracy stwierdzają w konkluzji, że stymulujące działanie PRL na aktywność własnego receptora związane jest ze zwiększeniem liczby komórek wydzielniczych w gruczole mlekowym. Natomiast adrenalectomia, tyroidektomia i ovariectomia wpływają na ilość receptorów laktogenów w komórce.

TABELA 6

Wpływ hydrokortyzonu na specyficzne wiązanie ^{125}J -PRL w hodowli komórek gruczołu mlekowego myszy (według Sakai i wsp. [42])

Dni hodowli	Wiązanie specyficzne ^{125}J -PRL imp/min	
	+ insulina	+ insulina + hydrokortyzon
0	180	180
1	110	280
2	70	290
3	65	220

wli zwiększa aktywność tego receptora (tab. 6). Podwyższenie aktywności receptora laktogenów obserwowano również po dodaniu do hodowli trójjodotyroniny (T_3) [4]. W odróżnieniu od glukokortykoidów obecność T_3 nie jest konieczna do podtrzymania aktywności badanego receptora. Można przyjąć, że oba rodzaje hormonów mają różny mechanizm działania na receptor. Stymulujące działanie T_3 obserwowane jest również po zahamowaniu syntezy białka w komórkach gruczolowych. Wydaje

Badania prowadzone przy użyciu hodowli komórek nabłonka wydzielniczego oraz skrawków gruczołu mlekowego przyniosły potwierdzenie roli glukokortykoidów i hormonów tarczycy jako regulatorów aktywności receptora laktogenów [4, 29, 42]. Komórki gruczołu mlekowego hodowane w nieobecności glukokortykoidów wykazują znaczny spadek aktywności receptora laktogenów, a dodanie glukokortykoidów do hodo-

się, że działanie T_3 polega na aktywacji cząsteczek receptora. Być może odgrywa tu jakąś rolę lipolityczne działanie T_3 . Wpływ zmian w budowie cytoplazmatycznej błony lipidowej na aktywność wiązania laktogenów wykazały Bhattacharya i Vonderhaar we wspomnianej już pracy dotyczącej metylacji fosfolipidów, jak również w doświadczeniach z rekonstrukcją miejsca receptorowego dla PRL [3, 5]. W zależności od rodzaju użytych do tej rekonstrukcji fosfolipidów obserwowano różną aktywność miejsca wiążącego laktogeny.

Liczne badania nad receptorem laktogenów przeprowadzone zostały przy użyciu tkanki nowotworowej gruczołu mlekowego (przegląd [31, 33]). Nie stwierdzono by indukcja nowotworu związana była z istotnymi zmianami w obrębie miejsca receptorowego dla PRL.

Ciekawe wyniki dotyczące receptora laktogenów uzyskano w doświadczeniach z użyciem inhibitorów przemian energetycznych (dwinitrofenol, KCN, NaN_3) [14]. Okazało się, że po dodaniu wspomnianych inhibitorów do komórek nowotworowych gruczołu mlekowego poziom receptora laktogenów gwałtownie wzrasta osiągając wartość aż dwukrotnie większą niż w hodowli kontrolnej bez dodatku inhibitora. Świadczy to dobitnie o powiązaniu metabolizmu komórki i aktywności receptora.

WĄTROBA

Poziom receptora laktogenów w wątrobie kontrolowany jest przez szereg hormonów. Wydaje się jednak, że kluczowym hormonem dla regulacji receptora jest prolaktyna. Usunięcie przysadki drastycznie obniża wiązanie PRL w wątrobie szczura [38]. Ten sam efekt, choć nie tak silnie zaznaczony, wywołuje usunięcie jajników i nadnerczy [26]. Podanie zwierzęciu PRL lub estrogenów prowadzi do wzrostu aktywności receptora laktogenowego w wątrobie samic i samców [26]. Stymulacja wiązania PRL przez estrogeny zachodzi równie dobrze po uprzednim podaniu bromokryptyny (specyficzny inhibitor wydzielania PRL) [25]. Przypuszcza się więc, że zarówno PRL, jak i estrogeny działają w tym przypadku bezpośrednio na komórkę docelową. Do hormonów stymulujących aktywność receptora laktogenów w wątrobie należy prawdopodobnie także insulina. Stwierdzono bowiem istnienie wysokiej korelacji między poziomem insuliny a aktywnością miejsca wiążącego laktogeny w wątrobie [9].

Negatywną kontrolę aktywności receptora PRL w wątrobie spełniają androgeny. Wstrzyknięcie testosteronu lub dwuhydrot testosteronu samicy szczura prowadzi do obniżenia zależnej od estrogenów stymulacji wiązania PRL. Hamujące działanie androgenów obserwuje się niezależnie od wpływu tych hormonów na poziom PRL we krwi. Na tej

podstawie uważa się, że androgeny działają bezpośrednio na komórki wątroby, a nie poprzez zmiany aktywności wydzielniczej przysadki.

NERKA

Wpływ na specyficzne wiązanie PRL w nerce wywierają estrogeny, androgeny, glukokortykoidy i tyroksyna [30, 31, 32]. Należy sądzić, że głównym czynnikiem regulującym poziom tego wiązania jest tyroksyna. Dane zawarte w tab. 7 wskazują, że obniżeniu wiązania PRL przez nerkę szczura z usuniętą przysadką lub tarczycą można całkowicie zapobiec przez podanie zwierzęciu tyroksyny. W tabeli zawarte są również wyniki oznaczeń aktywności wiązania PRL do nadnerczy. Jak widać, usunięcie tarczycy lub podanie tyroksyny nie zmienia aktywności receptora PRL w tym narządzie. Jest to kolejny przykład specyfiki regulacji aktywności receptora PRL w różnych tkankach.

TABELA 7

Wpływ T_4 na wiązanie specyficzne ^{125}J -oPRL do receptorów z nerki i nadnerczy szczura

Wyszczególnienie	Wiązanie specyficzne%	
	nerka	nadnercza
Kontrola	100 (12)	100 (8)
+ T_4	158	103
usunięcie tarczycy	34	87
usunięcie tarczycy + T_4	106	102
usunięcie przysadki	25	—
usunięcie przysadki + T_4	107	—

PROSTATA, NASIENIOWODY, JĄDRA

Obecność PRL we krwi samców wskazuje, że laktogen może spełniać jakąś rolę w ich organizmach. Jedną z postulowanych ról jest udział PRL w regulacji funkcjonowania gruczołów rozrodczych [22]. Potwierdzeniem tej sugestii jest obecność receptorów PRL w jądrach, prostatie i nasieniowodach [1, 16, 17]. Hormonem wpływającym w decydujący sposób na poziom receptora PRL w tych narządach jest testosteron. W nasieniowodzie i prostatie testosteron jest niezbędny dla utrzymania aktywnego receptora PRL. W tych dwu narządach PRL nie wpływa na aktywność własnego receptora. Odmiennie wygląda regulacja poziomu receptora PRL w jądrach. Testosteron wydaje się być czynnikiem obniżającym poziom receptora PRL, podczas gdy PRL wykazuje zdolność indukcji własnego receptora [41].

JAJNIK

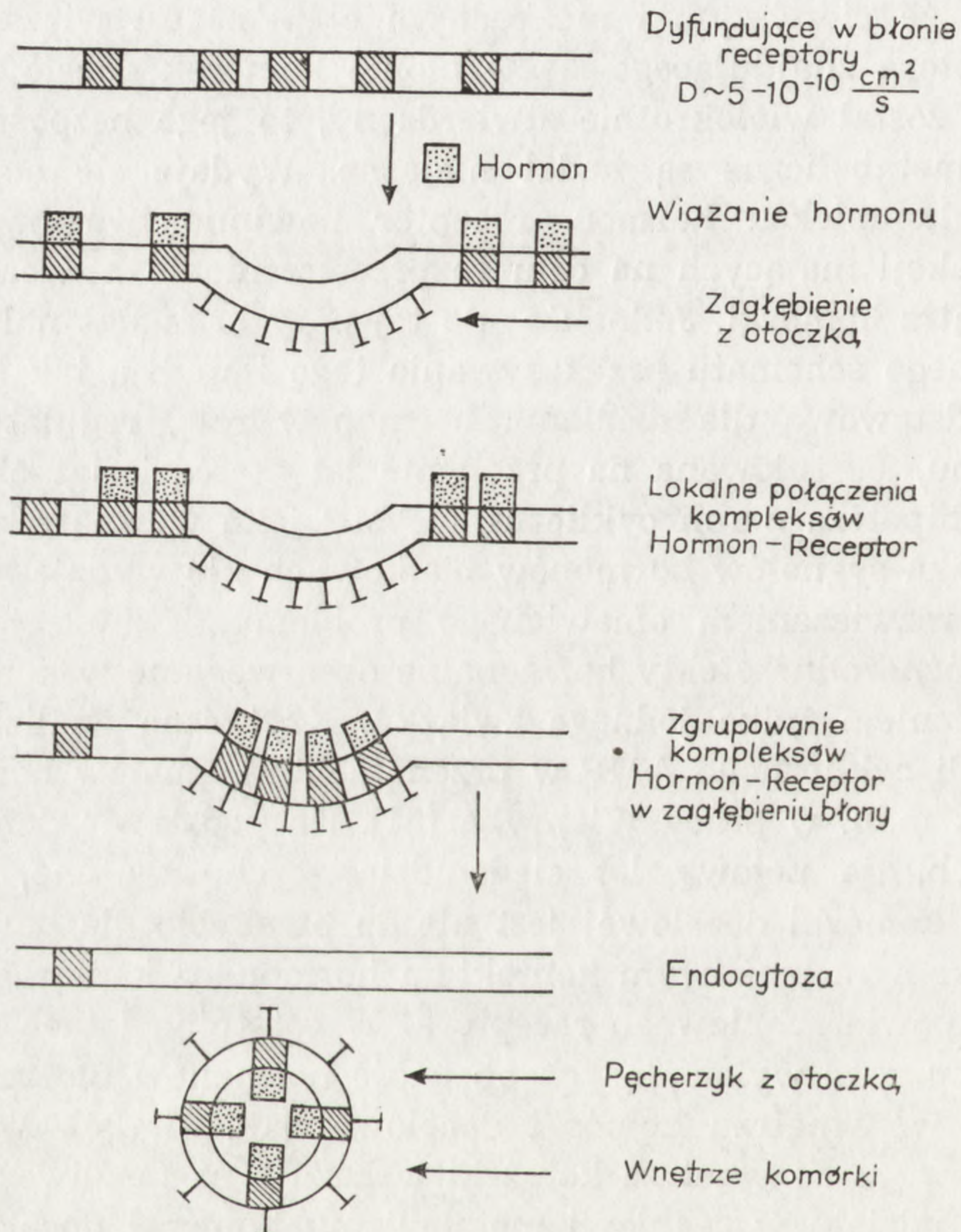
Regulacja poziomu receptora PRL w jajniku nie jest zbyt dobrze poznana. Wiadomo jest dotychczas, że w komórkach warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego stymulatorem receptora PRL jest FSH [50].

UWAGI KOŃCOWE

W przyjętym powszechnie modelu działania hormonów białkowych zakłada się, że pierwszym i niezbędnym etapem jest wiązanie hormonu do receptora znajdującego się w błonie komórek docelowych. Mimo że fakt ten został wielokrotnie stwierdzony, to jego bezpośrednie konsekwencje metaboliczne są nadal niejasne. Wydaje się oczywiste, że utworzenie kompleksu hormon—receptor powinno być impulsem dla dalszych reakcji mających na celu rozprzestrzenienie bodźca hormonalnego wewnątrz komórki. Jednakże do tej pory brak jest należyście udokumentowanego schematu przekazywania tego impulsu, tak by mógł on spełniać podstawową dla działania hormonów rolę, regulatora aktywności genomu. Postulowana na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych hipoteza o roli cyklicznego AMP jako wewnątrzkomórkowego przekaźnika sygnałów hormonów białkowych nie wydaje się być uniwersalnym rozwiązaniem omawianego problemu. Trudno jest bowiem tłumaczyć różnorodne efekty hormonalne obserwowane w komórce zwierzęcej, działaniem tylko jednego związku. Krytyczna analiza doniesień na temat roli cyklicznego AMP w przenoszeniu sygnałów hormonalnych zawarta jest m.in. w pracy Wienryba [51]. Na podstawie danych eksperymentalnych, do połowy lat siedemdziesiątych uważano, że bariera plazmolemy komórki docelowej jest nie do przebycia dla hormonu białkowego i jedynym możliwym kontaktem hormonu z komórką jest przyłączenie do powierzchniowego receptora. W ostatnich latach ukazało się jednak szereg prac wykazujących obecność hormonów białkowych m.in. PRL i GH, we wnętrzu komórki docelowej [19, 34, 35]. Wejście hormonu białkowego do wnętrza komórki wskazuje na możliwość jego bezpośredniego udziału w regulacji metabolizmu komórki docelowej. Przenikanie hormonów białkowych przez błonę komórkową odbywa się według niektórych autorów wspólnie z białkiem receptorowym [16, 36, 44]. Sugerują oni, że jedną z możliwych funkcji receptora byłby transport hormonu do wnętrza komórki celem jego unieczynnienia.

Zjawisko endocytozy kompleksu hormon—receptor opisane zostało w przypadku insuliny, epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) i nerwowego czynnika wzrostu (NGF). Podsumowanie wyników badań z tego zakresu przedstawione zostało ostatnio w artykule przeglądowym Schlessingera [43]. W badaniach stosowano hormony znakowane barwnikiem fluoryzującym — rodaminą. Hormony te zachowują zdolność wiązania się do receptora i aktywność biologiczną. Fluorescencję związanego

z receptorem hormonu wzbudzano naświetlając mały obszar błony komórkowej ześrodkowaną wiązką laserową. Przemieszczanie hormonu do wnętrza komórki obserwowano przy użyciu specjalnie skonstruowanych kamer telewizyjnych. Zgodnie z przedstawionym schematem przebieg reakcji hormonu z komórką docelową przedstawiałby się następująco (ryc. 3):



Ryc. 3. Przebieg wiązania i endocytozy hormonu [50]

1. hormon wiąże się do receptorów dyfundujących w błonie komórkowej;
2. kompleksy hormon—receptor łączą się w grupy w pobliżu zagłębienia w błonie komórkowej. Proces ten jest zależny od temperatury;
3. Zgrupowania kompleksów hormon—receptor przemieszczają się (proces endoergiczny) i łącząc się tworzy pęcherzyki okryte nie wyjaśnionej budowy otoczką;
4. pęcherzyki przemieszczają się do wnętrza komórki. W końcowym etapie hormon ulega degradacji w lizosomach.

Warto zwrócić uwagę, że przedstawiona hipoteza uwzględnia płynność błony komórkowej nie tylko ze względu na stan fizyczny, lecz również nieustanną ruchliwość jej elementów.

Nie jest jasne czy proponowany model odnosi się także do innych hormonów białkowych, a w szczególności laktogenów. Wyniki badań Haudebine, Ojiane [24] wskazują, że indukcja przez prolaktynę genów kodujących kazeinę nie związana jest z lizosomalną degradacją prolaktyny.

LITERATURA

- [1] ARAGONA C., FRIESEN H. G., Specific prolactin binding sites in the prostate and testis of rats, *Endocrinology*, **97**: 677-684, 1975.
- [2] AUBERT M. L., SUARD Y., SIZONENKO P. C., KLAEHENBUHL J. P., Receptors of lactogenic hormones: Study with dispersed cells from rabbit mammary gland, [w:] *Progress in prolactin physiology and pathology*, red. Robyn C., Harter M., Elsevier Amsterdam 1978, 45-57.
- [3] BHATTACHARYA A., VONDERHAAR B. K., Prolactin binding to mammary gland, *J. Cell. Biol.*, **79**: 64a, 1978.
- [4] BHATTACHARYA A., VONDERHAAR B. K., Thyroid hormone regulation of prolactin binding to mouse mammary glands, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **88**: 1405-1411, 1979.
- [5] BHATTACHARYA A., VONDERHAAR B. K., Phospholipid methylation stimulates lactogenic binding in mouse mammary gland membranes, *Proc. Natl. Acad. USA*, **76**: 4489-4492, 1979.
- [6] BARKEY R. J., SHANI J., AMIT T., BARZILA D., Specific binding of prolactin to seminal vesicles, prostate and testicular homogenates of immature, mature and aged rats, *J. Endocr.*, **74**: 163-173, 1977.
- [7] BARKEY R. J., SHANI J., AMIT T., BARZILA D., Characterization of the specific binding of prolactin to binding sites in the seminal vesicle of the rat, *J. Endocr.*, **80**: 181-189, 1979.
- [8] BARKEY R. J., SHANI J., BARZILA D., Regulation of prolactin binding sites in the seminal vesicle, prostate gland, testis and liver of intact and castrated adult rats: Effect of administration of testosterone, 2-bromo- α -ergocriptine and fluphenazine, *J. Endocr.*, **81**: 11-18, 1979.
- [9] BAXTER R. C., TURTLE J. R., Regulation of hepatic growth hormone receptor by insulin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **84**: 350-357, 1978.
- [10] BOHNET H. G., GOMEZ F., FRIESEN H. G., Prolactin and estrogen binding sites in the mammary gland of the lactating and nonlactating rat, *Endocrinology*, **101**: 1111-1121, 1977.
- [11] BOLANDER F. F., HURLEY T. W., HANDWERGER S., FELLOWS R. E., Localization and specificity of binding of subprimate placental lactogen in rabbit tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**: 2932-2935, 1976.
- [12] CHAN J. S. D., ROBERTSON H. A., FRIESEN H. G., Distribution of binding sites for ovine placental lactogen in the sheep, *Endocrinology*, **102**: 632-640, 1978.
- [13] COSTLOW M. E., BUSCHOW R. A., MCGUIRE W. L., Prolactin stimulation of prolactin receptors in rat liver, *Life Sci.*, **17**: 1457-1459, 1975.

- [14] COSTLOW M., HAMPEL A., Metabolic inhibitors increase prolactin binding to cultured mammary tumor cells, *Biochem, Biophys. Res. Comm.*, **92**: 213-220, 1980.
- [15] CUATRECASAS P., HOLLENBERG M. D., Binding of insulin and other hormones to non-receptor materials: saturability, specificity, and apparent negative cooperativity, *Biochem, Biophys. Res. Comm.*, **62**: 31-41, 1975.
- [16] FOX C. F., DAS M., Internalization and processing of the EFG receptor in the induction of DNA synthesis in cultured fibroblasts: The endocytic activation hypothesis, *J. Supramol. Struc.*, **10**: 595-610, 1979.
- [17] FRANTZ N. L., McINDOE J. H., TURKINGTON R. W., Prolactin receptors, *J. Endocr.*, **60**: 485-497, 1974.
- [18] FRIESEN H., TOLIS G., SHIU R., HWANG P., Studies on human prolactin, [w:] *Human Prolactin*, red. Pasteels J. L., Robins C., Excerpta Medica, Amsterdam 1973, 11-23.
- [19] GHOSH L., GHOSH B. C., DasGUPTA T. K., Intracellular demonstration in human mammary carcinoma cells, *Am. J. Surg.*, **135**: 215-217, 1978.
- [20] HAULIN M. L., YOUNT A. P., Prolactin binding sites in the ventral prostate, *Endocrine Res. Comm.*, **2**: 489-502, 1975.
- [21] HAYDEN T. J., BONNEY R. C., FORSTH J. R., Ontogeny and control of prolactin receptors in the mammary gland and liver of virgin, pregnant and lactating rats, *J. Endocr.*, **80**: 259-269, 1979.
- [22] HORROBIN D. F., *Prolactin*, Eden Press, Montreal 1975, 69.
- [23] HOLCOMB H. H., COSTLOW M. E., BUSCHOW R. A., McGUIRE W. L., Prolactin binding in rat mammary gland during pregnancy and lactation, *Biochim, Biophys. Acta*, **428**: 104-112, 1979.
- [24] HOUEBINE L. M., OJIANE J., Effects of lyzomotropic agents, and of microfilament — and microtubule — disrupting drugs on the activation of casein — gene expression by prolactin in the mammary gland, *Molec. Cell. Endocr.* **17**: 1-15, 1980.
- [25] KELLY P. A., FERLAND I., LABRIE F., DeLEAN A., Hypothalamus and endocrine functions, red. Labrie F., Meites J., Pelletier G., Plenum Press, New York 1976, 321-335.
- [26] KELLY P. A., FERLAND L., LABRIE F., Endocrine control of prolactin receptors, [w:] *Progress in Prolactin physiology and pathology*, red. Robyn C., Harter M., Elsevier, Amsterdam 1978, 59-68.
- [27] KOCHMAN H., GARNIER J., KOCHMAN K., Receptor binding and conformational properties of bovine and ovine prolactins after chemical modification of the two tryptophan residues, *Biochim, Biophys. Acta*, **578**: 125-134, 1979.
- [28] KOCHMAN K., ZWIERZCHOWSKI L., KOCHMAN H., Effect of ovine and bovine NPS-prolactins on mouse mammary gland RNA synthesis, *Bull. Acad. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **26**: 411-413, 1978.
- [29] KOHMOTO K., SAKAI S., Prolactin receptors in the mammary gland, [w:] *Physiology of mammary glands*, red. Yokoyama A. Mizuno H., Nagasawa H., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo 1978, 231-248.
- [30] MARSHALL S., BRUNI J. F., MEITES J., Effects of hypophysectomy, thyroidectomy, and thyroxine on specific prolactin receptor sites in kidneys and adrenals of male rats, *Endocrinology*, **104**: 390-395, 1979.
- [31] MARSHALL S., HUANG H. H., KLEDZIK G. S., CAMPBELL G. A., MEITES

- J., Glucocorticoid regulation of prolactin receptors in kidneys and adrenals of male rats, *Endocrinology*, **102**: 869–874, 1978.
- [32] MARSHALL S., KLEDZIK G. S., GELATO M., CAMPBELL G. A., MEITES J., Effects of estrogen and testosterone on specific prolactin binding in the kidneys and adrenals of rats, *Steroids*, **27**: 187–191, 1976.
- [33] NAGASAWA H., SAKAI S., BANERJEE M. R., Prolactin receptor, *Life Sci.*, **24**: 193–208, 1979.
- [34] NOLIN J. M., Intracellular prolactin in rat luteum and adrenal cortex, *Endocrinology*, **102**: 402–406, 1978.
- [35] NOLIN J. M., WITORSCH R. J., Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation. *Endocrinology*, **99**: 949–958, 1976.
- [36] OLLIVIER-BOUSQUET M., Effects de la cytochalasine B et de la colchicine sur l'action rapide de la prolactine dans la glande mammaire de lapine en lactation, *Eur. J. Cell Biol.*, **19**: 168–174, 1979.
- [37] PASTEELS J. L., HEUSON-STIENNON J., DANGUG A., LEGROS N., HEUSON J. C., Recent experimental data on hormonal dependence of mammary tumors, [w:] *Progress in prolactin physiology and pathology*, red. Robyn C., Harter M., Elsevier, Amsterdam 1978, 69–79.
- [38] POSNER B. I., KELLY P. A., FRIESEN H. G., Induction of lactogenic receptor in rat liver: Influence of estrogen and pituitariness. *Proc. Natl. Acad. USA*, **71**: 2407–2410, 1974.
- [39] POSNER B. I., KELLY P. A., SHIU R. P. C., FRIESEN H., Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding, tissue distribution, species variation and characterization, *Endocrinology*, **95**: 521–531, 1974.
- [40] POWELL B. L., DIAMOND E. J., KOPRAK S., HOLANDER V. P., Prolactin binding in ovariectomy and ovariectomy nonresponsive rat mammary carcinoma, *Cancer Res.*, **37**: 1328–1332, 1977.
- [41] SAITO T., SAXENA B. B., Specific receptors for prolactin in ovary, *Acta Endocr.*, **80**: 126–137, 1975.
- [42] SAKAI S., BOWMAN P. D., YANG J., McCORMICK K., NANDI S., Glucocorticoid regulation of prolactin receptors on mammary cell in culture, *Endocrinology*, **104**: 1447–1449, 1979.
- [43] SCHLESSINGER J., The mechanism and role of hormone-induced clustering of membrane receptor, *Trends in Biochem. Sci.*, Reference Edition, **5**, 210–214, 1980.
- [44] SCHLESSINGER J., SHECHTER Y., WILLINGHAM M., PASTAN J., Direct visualization of binding, aggregation and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 2659–2663, 1978.
- [45] SHIU R. P. C., FRIESEN H. G., Properties of prolactin receptor from rabbit mammary gland, *J. Biol. Chem.*, **249**: 7904–7911, 1974.
- [46] SHIU R. P. C., FRIESEN H. G., Interaction of cell membrane prolactin receptor with its antibody, *Biochem. J.*, **157**: 619–626, 1976.
- [47] SHIU R. P. C., KELLY P. A., FRIESEN H. G., Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones, *Science*, **180**: 968–971, 1973.
- [48] TURKINGTON R. W., Prolactin receptors in mammary carcinoma cells, *Cancer Res.*, **34**: 758–763, 1974.
- [49] TURKINGTON R. W., MAJUMDER G. C., KADOHAMA N., MacINDOE J. H.,

- FRANTZ W. L., Hormonal regulation of gene expression in mammary cells, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **29**: 417-449, 1973.
- [50] WANG Ch., HSUEH A. J., ERICKSON G. F., Induction of functional prolactin receptors by follicle stimulation hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro, *J. Biol. Chem.*, **254**: 11330-11336, 1979.
- [51] WEINRYB I., Cyclic AMP as an intracellular mediator of hormone action: Sutherland's criteria revisited, *Prosp. Biol. Med.*, **22**: 415-420, 1979.

Otrzymano: 20 grudnia 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

RECEPTORY KOMÓRKOWE INSULINY I GLUKAGONU.
OCENA CZYNNOŚCI I ZNACZENIE W PATOLOGII ZABURZEŃ
METABOLICZNYCH *

INSULIN AND GLUCAGON CELLULAR RECEPTORS. EVALUATION OF THEIR
ACTIVITY AND THEIR ROLE IN THE PATHOLOGY OF METABOLIC
DISTURBANCES

Sylwester SOBIESZCZYK

Klinika Endokrynologii, Instytut Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej
w Poznaniu

Streszczenie. W ostatnich latach czyniono próby bliższego opisanie receptorów dla insuliny i poznania regulacji ich ilości w błonie komórkowej. Wygodnymi komórkami modelowymi do tych badań okazały się erythrocyty i inne krwinki. Ponadto zmiany liczby receptorów dla insuliny można śledzić na tych komórkach w trakcie choroby i leczenia pacjenta. Opisano również wyniki badań nad receptorami dla glukagonu.

Summary. In recent years it has been attempted to describe insulin receptors and to gain a knowledge on the regulation of their number in the cell membrane. Convenient as model cells for these studies proved to be erythrocytes and other blood cells. Changes in the number of these receptors may, moreover, be followed on these cells in the course of the disease and treatment of the patient. The results of investigations on glucagon receptors are also reported.

RECEPTORY INSULINY

Nowoczesne badania nad mechanizmem komórkowego działania insuliny mają około 30-letnią historię. W 1949 r. Levine i wsp. wykazali, że insulina pobudza transport glukozy przez błonę komórkową. Efekt biologiczny insuliny utrzymuje się przez pewien czas nawet po dokładnym przemyciu przepony szczura uprzednio inkubowanej z tym hor-

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r. zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie.

monem. Efekt ten może być zniesiony przez dodanie do układu swoich przeciwciał przeciwinulinowych [19]. Przypuszcza się, że działanie biologiczne insuliny zależy od jej kontaktu z błoną komórkową [19].

Za obecnością swoistych białek wiążących insulinę na powierzchni błony komórkowej przemawia także utrata zdolności do odpowiedzi na insulinę w komórce tłuszczowej poddanej działaniu pepsyny [22]. Cuatrecasas [7] wykazał biologiczną aktywność kompleksu insuliny połączonej z wielkocząsteczkowymi polimerami, np. celulozą lub sefarozą, co w znacznym stopniu przyczyniło się do przyjęcia hipotezy o oddziaływaniu insuliny z receptorem błonowym.

Postęp badań nad receptorami insulinowymi stał się możliwy dzięki zastosowaniu preparatów insuliny znakowanej izotopem promieniotwórczym ^{125}J . Obok tradycyjnych metod znakowania insuliny [9], polecane są metody enzymatyczne z zastosowaniem peroksydazy [31] lub ostatnio wprowadzona metoda nie uszkadzająca struktury białkowej polegająca na zastosowaniu chloroglikourylu (jodogenu) [8]. Dzięki stosowaniu znakowanej insuliny wykryto swoiste receptory insulinowe w komórkach szeregu tkanek i narządów: wątroby, mięśni szkieletowych, komórek tłuszczowych, mięśnia sercowego, płuc, nerek, mózgu, nadnerczy, gonad, gruczołu sutkowego, łożyska, śledziony. W badaniach eksperymentalnych szczególnie wygodnym modelem są receptory na błonach komórkowych monocytów, erytrocytów i fibroblastów.

Badania receptorów insulinowych polegają po pierwsze na stwierdzeniu ich obecności w komórce, po drugie zmierzają do izolacji swoistych receptorów i do ustalenia ich bezpośrednich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Najczęściej do badań kinetycznych używane są komórki tłuszczowe lub monocyty. Cuatrecasas i wsp. [14] wykazali, że na powierzchni adipocyta znajduje się około 10 000 miejsc wiążących insulinę.

Zdaniem autorów [7, 14] receptory te wiążą insulinę według prostoliniżnego wykresu Scatcharda ze stałą dysocjacji rzędu 10^{-10}M . Stała dysocjacji jest liczbą określoną na podstawie prawa działania mas, a jej wielkość jest miarą powinowactwa receptora do hormonu. Powinowactwo jest tym większe, im mniejsza jest wartość liczbowa stałej dysocjacji.

Wyniki badań Cuatrecasasa i wsp. są kwestionowane między innymi przez Kono, Gliemana, Kahna i innych badaczy, którzy wykazali mniejsze powinowactwo receptorów do insuliny oraz uzyskali zakrzywiony przebieg wykresu Scatcharda [19]. Wykres taki świadczy o heterogenności miejsc wiążących, które w pierwszej fazie reakcji mają wysokie, a później niskie powinowactwo do insuliny. Stan taki tłumaczony jest przez De Meyts'a zjawiskiem negatywnej kooperacji.

Według tej teorii przyjmuje się, że receptory insulinowe mają budowę pozwalającą na związanie kilku cząsteczek hormonu. W stanie niezwiazanym wszystkie miejsca wiązające mają znaczne powinowactwo do insuliny. Wysycenie jednego z tych miejsc powoduje zmianę struktury receptora, co w następstwie daje zmniejszenie powinowactwa pozostałych miejsc wiązających. Wykładnikiem negatywnej kooperacji jest zakrzywiony przebieg wykresu Scatcharda. Część stroma wykresu odpowiada wysokiemu powinowactwu, a część płaska niskiemu powinowactwu receptorów insulinowych. Stwierdzono, że wystarczy zajęcie od 3 do 10% ogólnej puli receptorów dla wywołania efektu biologicznego, a reszta receptorów stanowi pulę rezerwową. Zjawisko to ma istotne znaczenie w zrozumieniu zmian patologicznych zależnych od receptorów [23].

Insulina wywiera wpływ na metabolizm wielu komórek, wśród których są komórki mięśniowe, wątrobowe, tłuszczowe oraz limfocyty, monocyty, erytrocyty, płytki krwi, osteocyty, chondroblasty, fibroblasty [3]. Efektem biologicznym działania insuliny jest aktywacja transportu glukozy, aminokwasów i kwasów tłuszczowych do wnętrza komórki, gromadzenie jonów K^+ oraz Mg^+ w komórkach i aktywacja lub supresja licznych enzymów wewnątrzkomórkowych [3]. Warunkiem działania biologicznego insuliny jest połączenie się ze swoistym receptorem. Według Kahna [19] wiązanie receptorów komórkowych z insuliną i spowodowany tym efekt biologiczny nie mają wyłącznie charakteru oddziaływania ilościowego. Maksymalny efekt biologiczny może zachodzić przy związaniu tylko części receptorów. Autor ten uważa, że różne formy działania biologicznego insuliny mogą uzyskać maksimum przy różnym stopniu wysycenia receptorów. Należy zaznaczyć, że odmienny pogląd reprezentują Jacobs i Cuatrecasas [14], którzy uważają, że maksymalne wysycenie receptora, zachodzące przy stężeniu insuliny około 30 $\mu U/ml$ w środowisku, wywołuje równoczesne maksymalne pobudzenie kilku form działania insuliny.

Efekt biologiczny jest funkcją stężenia kompleksu hormon—receptor i zależy od stężenia wolnego hormonu, od wielkości puli dostępnych receptorów oraz od powinowactwa tych receptorów do insuliny. Bezpośrednia zależność efektu biologicznego od stężenia hormonu istnieje tylko w zakresie maksymalnych stężeń, które dają kompleks powodujący maksymalną odpowiedź biologiczną. Przy niższych stężeniach hormonu odpowiedź biologiczna zależy od powinowactwa oraz ilości dostępnych miejsc receptorowych. Z drugiej strony maksymalna ilość hormonu, potrzebna do uzyskania maksymalnej odpowiedzi, zależy również od ilości receptorów oraz ich stałej dysocjacji. Na przykład komórka mająca 10 000 miejsc receptorowych daje określoną odpowiedź przy za-

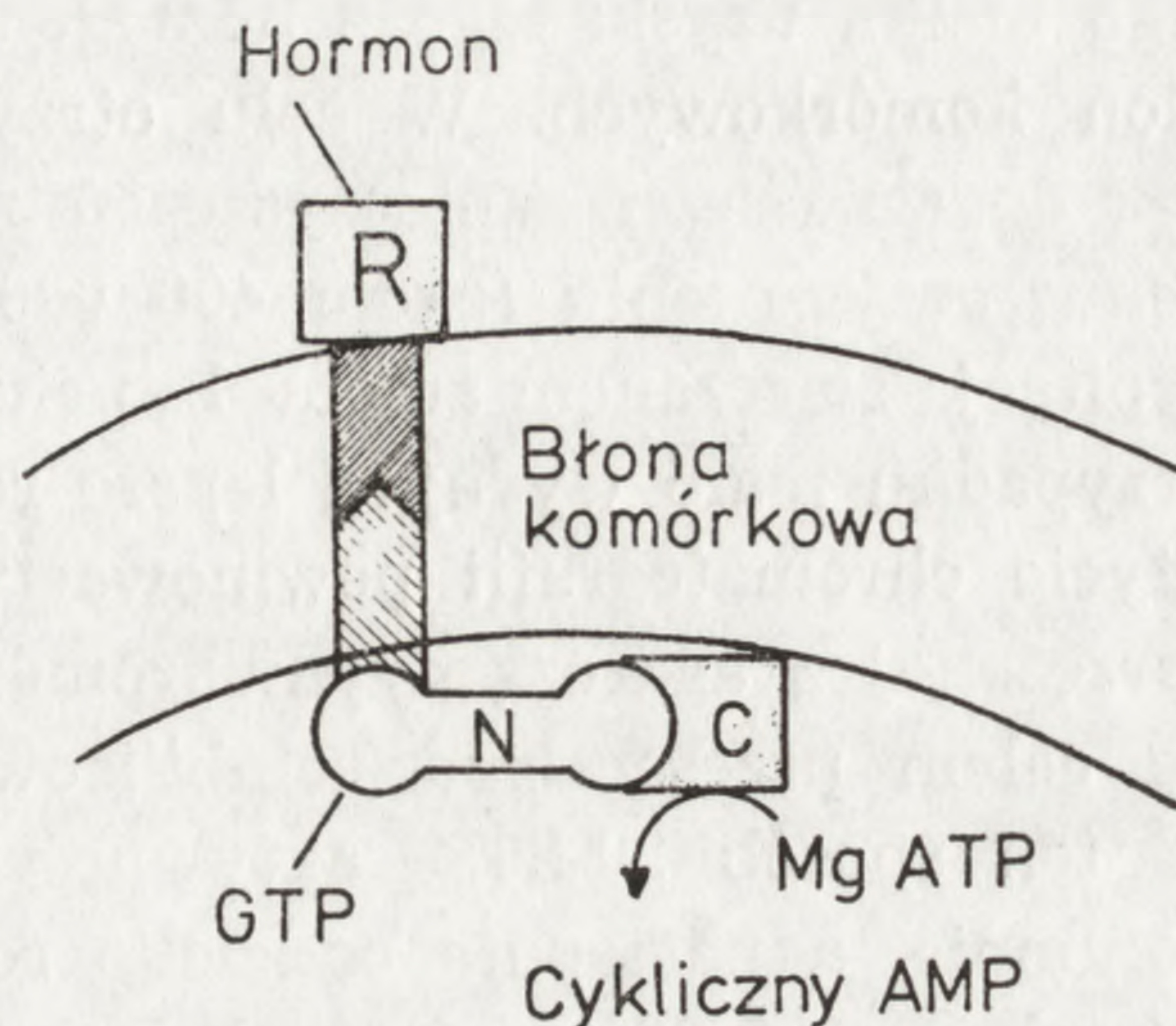
jęciu 100 receptorów, co zachodzi przy stężeniu insuliny 10^{-10} M. Jeżeli jakikolwiek czynnik zewnętrzny zniszczy część receptorów komórkowych zmniejszając ich liczbę do 1000, to wysycenie 100 receptorów komórkowych oraz ta sama odpowiedź biologiczna będzie zachodziła przy stężeniu 10^{-9} M insuliny [19].

Komórka może zmieniać swą wrażliwość na insulinę przez regulację ilości receptorów błonowych lub przez zmianę ich powinowactwa do hormonów [2]. Rozważa się również czy wrażliwość komórkowa na insulinę zależy od ilości receptorów przypadających na komórkę lub na jednostkę powierzchni. Na powierzchni błony komórki wątrobowej oraz tłuszczowej receptory insulinowe układają się w postaci skupień [15]. Sądzone, że zgromadzenie większej ilości receptorów na małej powierzchni może powodować większą odpowiedź biologiczną komórki. Ostatnie badania Jaretta ogłoszone w 1979 r. wskazują jednak, że rozbitcie konglomeratów receptorowych nie zmienia w istotny sposób odpowiedzi biologicznej [16]. Z drugiej strony wykazano, że komórki większe są mniej wrażliwe na insulinę niż mniejsze, mimo posiadania tej samej ilości miejsc receptorowych [26].

Mechanizm działania insuliny polega na oddziaływaniu kompleksu receptor—hormon na układ cyklaz adenilowej i guanilowej. Wykazano bowiem, że insulina ma działanie hamujące na układ cyklazy adenilowej, natomiast stymuluje cyklazę guanilową, co w konsekwencji zwiększa ilość cyklicznego GMP w komórce. Receptory insulinowe nie są połączone w błonie komórkowej z innymi białkami, a zwłaszcza nie mają połączenia z cyklazami [6, 12, 14]. Dopiero po przyłączeniu hormonu receptor insulinowy tworzy kompleks z białkami błony komórkowej jak cyklazą adenilową, cyklazą guanilową, układem białek transportujących cukry i aminokwasy. Kompleksy te aktywują wielokierunkowo metabolizm komórkowy [6, 12, 14].

Według Rodbella [27] oddziaływanie kompleksu hormon—receptor przebiega za pośrednictwem swoistego białka N o ciężarze cząstkowym 40 000. W czasie reakcji hormon—receptor kompleks ten przyłącza białko N, które z kolei przyłącza cząsteczkę GTP i aktywuje jednostkę katalityczną C. Zjawisko to zachodzi w obrębie błony komórkowej oraz wewnątrz komórki w bezpośrednim sąsiedztwie tej błony. Wytworzony układ wpływa pobudzająco lub hamująco na cyklazę adenilową. W przypadku insuliny dochodzi do zahamowania aktywności cyklazy adenilowej. Natomiast insulina aktywuje niezależną od cyklicznego AMP kinazę proteinową znajdującą się w błonach komórkowych [27]. Proces ten jest regulowany przez GTP. Schemat oddziaływania hormon—receptor przedstawia rycina 1.

Właściwości chemiczne receptorów insulinowych zostały częściowo poznane na podstawie badań Cuatrecasasa. Dzięki zastosowaniu neuraminidazy oraz galaktozydazy stwierdzono, że receptory insulinowe są białkiem należącym do glikoproteidów. Badania solubilizowanych re-



Ryc. 1 Działanie kompleksu hormon—receptor na aktywację układu cyklicznej adenilowej za pośrednictwem nukleotydu regulującego N; jednostka katalityczna C (R — receptor). Według M. Rodbella, Nature, 1980, 17, 284

ceptorów insulinowych uzyskanych z komórek wątrobowych lub komórek tłuszczowych pozwoliły wyznaczyć ich ciężar cząsteczkowy na 300 000 i określić promień hydrodynamiczny rzędu 7 nm [14].

Jak już wspomniano, najłatwiej dostępnym materiałem do badań receptorów insulinowych są krwinki, a szczególnie monocyty. Na podstawie wcześniejszych badań przypuszczano, że limfocyty wyposażone są w receptory insulinowe, stwierdzono jednak, że znakowana insulina wiąże się specyficznie jedynie z monocytami, bowiem stopień wiązania wykazuje jedynie w odniesieniu do monocytów korelację liniową [28, 29].

W 1977 r. Gambhir i wsp. [11] opublikowali metodę badania receptorów insulinowych na powierzchni erytrocyta. Stwierdzono, że na powierzchni erytrocyta znajduje się około 2000 miejsc wiążących. Maksymalne wiązanie radioaktywnej insuliny przez receptor erytrocytów wynosi około 10⁰% [11]. Oznaczanie receptorów insulinowych na błonie erytrocytów znalazło zastosowanie w badaniach klinicznych. Wykonane tą metodą badania w przypadkach jadłowstrętu psychicznego [31] wykazały zwiększone wiązanie insuliny przez erytrocyty w tej chorobie. Wiązanie to jest zależne od wzrostu ilości receptorów na komórkę, natomiast w niewielkim stopniu zależy od zmian ich powinowactwa [31].

Badania nad receptorami mogą być prowadzone najdogodniej na materiale izolowanym z komórek wątrobowych i tłuszczowych. W tym celu frakcje błon komórkowych poddaje się działaniu detergentów, takich jak Triton X-100 albo Lubrol Px. Następnie solubilizowany materiał poddaje się wielogodzinnemu wirowaniu z użyciem 300 000 g.

Otrzymany supernatant oczyszcza się na Sefadeksie G-200 i uzyskane w taki sposób białko zawierające receptory można stosować do dalszych badań. Jednakże frakcje te zawierają receptory w minimalnym stężeniu, bowiem receptor insulinowy stanowi zaledwie 2×10^{-4} % całego białka uzyskanego z homogenatu wątroby albo 4×10^{-3} % białka błon komórkowych. W celu otrzymania frakcji białka receptorowego bez dodatkowych zanieczyszczeń należy homogenaty te poddać znacznemu oczyszczeniu (około 400 000 razy). Metody tradycyjne, jak precipitacja siarczanem amonu lub chromatografia jonowymienna są w tym przypadku mało wydajne, lepsze rezultaty uzyskuje się natomiast przez użycie chromatografii powinowactwa. Używa się w tym celu insuliny sprzężonej z agarozą cyjanobromowaną, z której sporządza się kolumnę celem przesączenia solubilizowanych nieoczyszczonych receptorów. W ten sposób 20-90% aktywności receptorowej można zatrzymać na kolumnie, a następnie oddzielić roztworem 4,5 M mocznika w pH 6,5 odzyskując 50-80% związanych z insuliną receptorów. Uzyskane w ten sposób białka receptorowe są oczyszczone 800 razy. Dla dokładniejszego oczyszczenia stosuje się chromatografię powinowactwa z użyciem lektyny, np. konkanawaliny A (w miejsce insuliny) [14].

Nieprawidłowa odpowiedź komórki na insulinę bywa jedną z przyczyn insulinooporności. Niewrażliwość na insulinę może być spowodowana zarówno tzw. defektami przedreceptorowymi (nieprawidłowa degradacja lub obecność przeciwciał przeciwinulinowych), jak i zaburzeniami poreceptorowymi (uszkodzenie metabolizmu wewnątrzkomórkowego), a także zmianą ogólnej ilości receptorów lub zmianą ich powinowactwa.

Przykładem obniżenia wrażliwości na insulinę jest otyłość. U osób otyłych stwierdza się podwyższony poziom insuliny we krwi, a na podstawie oceny wyników badania wiązania insuliny przez monocyty pobrane od chorych z otyłością można sądzić o różnym stopniu upośledzenia wiązania hormonu przez receptor komórkowy. Zmniejszenie wiązania zależy od redukcji ilości dostępnych receptorów. Zastosowanie diety niskokalorycznej u chorych z otyłością prostą często likwiduje insulinooporność i przywraca prawidłowe wiązania znakowanej insuliny przez monocyty. Dochodzi do tego przez wzrost ilości receptorów insulinowych zdolnych do związania hormonów. W leczeniu otyłości można także poprawić wrażliwość komórkową na insulinę przez zastosowanie głodówki w okresie co najmniej 48 godzin. Poprawa wiązania insuliny przez monocyty zachodzi wówczas dzięki zwiększeniu powinowactwa receptorów do insuliny [1, 2, 24, 25].

Zmniejszenie ilości aktywnych receptorów insulinowych na powierzch-

ni komórek u osób z otyłością jest proporcjonalne do podwyższenia stężenia insuliny w osoczu. Patogenezę zaburzeń insulinowych w otyłości przedstawia Kahn następująco: nadmierna podaż pokarmu powoduje wzrost poziomu glukozy i insuliny we krwi, to z kolei wywołuje zmniejszenie ilości dostępnych receptorów określane jako zjawisko "down regulation" [18, 19].

Z innych stanów patologicznych powodujących zmianę ilości i powinowactwa receptorów insulinowych należy wymienić cukrzycę u dorosłych, przebiegającą również z podwyższonym poziomem insuliny we krwi. Monocyty tych chorych wiążą o 50% mniej insuliny radioaktywnej niż osób zdrowych [15, 16].

Kliniczne znaczenie ma także działanie glikokortykoidów oraz hormonu wzrostu, które zmniejszają powinowactwo receptorów insulinowych. Wynikiem tego są zaburzenia przemiany glukozy występujące u chorych leczonych sterydami, w akromegalii i chorobie Cushinga. Odwrotne zjawisko, polegające na wzroście wiązania insuliny przez receptory, stwierdza się w niedoczynności kory nadnerczy oraz przysadki [20].

Powinowactwo do receptorów insulinowych mają również inne peptydy. Należą do nich proinsulina, białko o aktywności insulinopodobnej (NSILA) oraz przeciwciała przeciw receptorom insulinowym. NSILA i przeciwciała przeciwinsulinowe mają istotne znaczenie w badaniach zaburzeń przemiany węglowodanowej [19]. NSILA jest białkiem krążącym we krwi o masie cząsteczkowej 7000 i jest funkcjonalnie oraz budową chemiczną zbliżone do somatomedyn, białek mediatorowych dla hormonu wzrostu. Niezależnie od receptorów insulinowych komórki mają osobne receptory dla białka o aktywności insulinopodobnej NSILA, które wykazują słabe powinowactwo do insuliny. Obecność nadmiernych stężeń NSILA stwierdza się przede wszystkim u chorych z rakiem wątroby wykazujących obniżony poziom glukozy we krwi. U pacjentów tych wykazano obecność NSILA w guzach wątroby. Substancja ta jest bezpośrednią przyczyną stanów hipoglikemicznych u tych chorych. Poza tym podwyższony poziom substancji o aktywności insulinowej występuje w ciąży, a obniżony w karłowatości przysadkowej oraz w jadłowstręcie psychicznym [19].

Insulinooporności występują także w zespole przebiegającym ze zmianami skórnymi o typie zrogowacenia ciemnego (acanthosis nigricans). Główną cechą tego zespołu jest niewrażliwość na endogenną i egzogenną insulinę. Wynikiem tego jest nadmierne wydzielanie insuliny, co przejawia się znacznym, nieraz 100-krotnym, zwiększeniem poziomu insuliny we krwi. U niektórych chorych podwyższony poziom insuliny kompensuje braki receptorowe i tolerancja glukozy przez organizm

jest prawidłowa lub nieznacznie upośledzona. U innych chorych powstaje zespół objawów cukrzycy oporny na leczenie insuliną. Dawki insuliny konieczne do wyrównania hiperglikemii są niejednokrotnie olbrzymie.

Zespół tzw. oporności insulinowej występuje w dwóch postaciach klinicznych. Postać A jest charakterystyczna dla młodych kobiet z objawami hirsutyizmu (nadmierne owłosienie) oraz brakiem miesiączki. U części z nich stwierdza się zespół policystycznych jajników. U chorych tych nie udało się udowodnić istnienia zaburzeń autoimmunologicznych. W drugiej postaci B, występującej u osób starszych, wykryto obecność przeciwciał przeciw receptorom insulinowym. Chorzy ci mają również inne objawy zaburzeń na tle immunologicznym, jak: przyspieszenie odczynu opadania krwinek, obecność przeciwciał przeciw DNA, zmniejszenie liczby leukocytów we krwi (leukopenię), wypadanie owłosienia na głowie, bóle stawowe [19].

Badania wiązania radioaktywnej insuliny przez monocyty pobrane od chorych z *acanthosis nigricans* wykazują zmniejszenie wiązania hormonów przez receptor. Defekt ten jest znaczniejszy niż u osób otyłych, nie ustępuje po zastosowaniu diety, jak to ma miejsce w otyłości, ponadto badania kinetyki wiązania wskazują na zaburzenia powinowactwa receptorów, a nie ich ilości. Oporność insulinowa w tym zespole ma cięższy przebieg kliniczny niż u chorych otyłych. Rolę przeciwciał przeciw receptorom insulinowym w patogenezie zespołu z *acanthosis nigricans* można wykazać przez proste badanie polegające na zmieszaniu kontrolnych monocytów mających receptory insulinowe z surowicą pobraną od chorego. Po przeprowadzeniu inkubacji monocytów w różnych stężeniach surowicy można wykazać zależność stopnia wiązania insuliny przez receptory komórkowe od rozcieńczenia surowicy, któremu odpowiada stężenie przeciwciał antyreceptorowych [19]. Największa aktywność immunologiczna przeciwciał przeciw receptorom insulinowym zawarta jest w klasie globulin IgG, a mniejsza w klasie IgM, co świadczy o ich pochodzeniu poliklonalnym.

RECEPTORY GLUKAGONU

Glukagon jest białkiem o doniosłym znaczeniu w patogenezie zaburzeń gospodarki węglowodanowej i tłuszczowej. Synteza tego hormonu u ludzi zachodzi w komórkach alfa-2 trzustki oraz w komórkach dna żołądka. Największą aktywność biologiczną oraz dostępność dla receptora ma glukagon o masie cząsteczkowej 3500, co potwierdzono przy użyciu preparatu syntetycznego hormonu. Ogólnie w surowicy znajdują się 4 substancje mające właściwości immunologiczne glukagonu. Substancje

te w oznaczeniach glukagonu metodami radioimmunologicznymi interferują między sobą dając często znacznie zawyżone wyniki. Należy do nich białko o ciężarze ponad 20 000, białko o ciężarze 9000, właściwy glukagon — 3500 i wreszcie białko o masie 2000 będące prawdopodobnie produktem degradacji glukagonu.

Stężenie glukagonu w surowicy wynosi 50-150 pg/ml. Regulacja wydzielania tego hormonu zależy od stężenia glukozy i aminokwasów w surowicy. Wzrost poziomu glukozy w surowicy powoduje zmniejszenie wydzielania glukagonu. Wzrost stężenia aminokwasów nasila sekrecję glukagonu. Zależności te mają znaczenie w patogenezie wielu stanów chorobowych. Głównym miejscem biologicznego działania glukagonu w ustroju jest wątroba, gdzie hormon ten pobudza glukoneogenezę na drodze przyspieszenia metabolizmu aminokwasów glikogenicznych — głównie alaniny. Ponadto glukagon odgrywa znaczną rolę w procesie ketogenezy, bowiem w wątrobie aktywuje transferazę acylkarnitylową, która bierze udział w transporcie reszt kwasowych do mitochondriów, gdzie ulegają one utlenieniu do związków ketonowych [17].

Nie ustalono do tej pory, jaki jest wpływ glukagonu w warunkach fizjologicznych na metabolizm innych tkanek poza wątrobą. Prawdopodobnie ma on wpływ na proteolizę w tkance mięśniowej oraz lipolizę w komórkach tłuszczowych. Na drodze badań klinicznych i eksperymentalnych wykazano, że miejscem degradacji glukagonu są nerki.

Mechanizm działania glukagonu został opisany przed 10 laty w związku z proponowanym przez Sutherlanda modelem działania hormonu przez aktywację cyklicznej adenilowej. Wykazano bezpośredni wpływ glukagonu na wzrost aktywności cyklicznego AMP w tkankach oraz w komórkach płynów ustrojowych [4]. Ważne jest jednak odróżnienie efektu fizjologicznego od farmakologicznego. Większość badaczy uważa, że w stanach fizjologicznych glukagon oddziałuje głównie na wątrobę. Znane jest także działanie glukagonu na mięsień sercowy, w którym zwiększa on zawartość cyklicznego AMP [21]. Działanie to bywa wykorzystywane w klinice, bowiem powoduje zwiększenie siły skurczu i przyspieszenie czynności serca. Efekt ten następuje po podaniu dużych dawek hormonu i ma on pewne znaczenie w leczeniu niewydolności serca, natomiast jego znaczenie fizjologiczne nie jest w pełni potwierdzone.

Maksymalny efekt biologiczny działania glukagonu na komórkę zachodzi przy wysyceniu zaledwie 10-20% wszystkich receptorów zdolnych do związania hormonu. Prawdopodobnie część receptorów nie znajduje się w bezpośrednim kontakcie z cykliczną adenilową i nie jest zdolna do natychmiastowego oddziaływania. Można je uznać za receptory zapasowe. Druga możliwość tłumaczenia tego faktu, podana przez Rod-

bella, zakłada, że zapasowe receptory mają opóźnioną zdolność aktywacji cykazy adenylowej, co powoduje opóźniony efekt biologiczny. Badania receptorów komórkowych glukagonu prowadzone są na izolowanych hepatocytach metodami podobnymi do stosowanych w badaniach receptorów insuliny. Uzyskano czyste białko receptorowe o masie cząsteczkowej 188 000 i promieniu hydrodynamicznym 4,2 nm. Białko to wiąże swoiście glukagon ze stałą asocjacji $K = 10^{10}M^{-1}$. Swoistość tego białka badana była w układach zawierających insulinę, ACTH, sekretynę oraz wazoaktywny hormon jelitowy (VIP). Okazuje się, że hormony te są w dużym stopniu wiązane przez białko receptorowe glukagonu, jednakże nie mają one właściwości konkurencyjnych w stosunku do glukagonu i ich obecność nie zmniejsza stopnia wiązania tego hormonu przez białko błonowe. Świadczy to o swoistości tego receptora [5].

Znaczenie kliniczne zaburzeń czynności receptorów glukagonu nie jest poznane tak dokładnie jak ma to miejsce w przypadku receptorów insulinowych. Wiąże się to z trudnościami uzyskania materiału do badań, którym są w tym przypadku hepatocyty ludzi chorych. Trudno wyobrazić sobie możliwości nieograniczonego pobierania hepatocytów od chorych. Stąd większość informacji dotyczących zaburzeń receptora glukagonu uzyskuje się na podstawie badań eksperymentalnych u zwierząt.

W cukrzycy dochodzi do nadmiernej sekrecji glukagonu, która jest tym większa, im cięższy jest przebieg choroby i warunkuje szereg powikłań. Badania wykonane na hepatocytach szczurów z doświadczalną cukrzycą wykazały obniżenie zdolności wiązania glukagonu z 14 do 8%. Równolegle do tego zmniejszyła się w tych komórkach odpowiedź cyklicznego AMP na podanie glukagonu. Analiza według Scatcharda wykazała, że zmniejszenie wiązania glukagonu łączy się ze spadkiem ilości miejsc wiążących, a nie zmianami powinowactwa. Podanie zwierzętom insuliny przywraca prawidłową zdolność wiązania glukagonu przez receptor komórkowy. Być może, że mniejsze wiązanie glukagonu u zwierząt z cukrzycą ma znaczenie w ograniczeniu ujemnych metabolicznych następstw wzrostu poziomu glukagonu we krwi [13].

Soman i Felig oraz Gorden [13, 30] wykazali zwiększenie wiązania glukagonu przez błony komórkowe hepatocytów szczurów, u których doświadczalnie spowodowano niewydolność nerek. Przenosząc wyniki tych badań do medycyny klinicznej można przypuszczać, że zmiana wiązania glukagonu przez receptor może być jedną z przyczyn nieprawidłowej tolerancji glukozy w mocznicy. Fouchereau-Peron i wsp. [10] obserwowali spadek wiązania glukagonu przez hepatocyty u zwierząt głodzonych; spadek ten miał miejsce mimo podwyższonego poziomu glukagonu w surowicy.

Podsumowując należy stwierdzić, że informacje dotyczące recepto-

rów są w tej chwili najszerze w medycynie klinicznej w odniesieniu do receptorów insulinowych. Wiedza na temat roli receptora glukagonowego w medycynie klinicznej jest znacznie mniejsza. Zakres badań w patologii klinicznej jest obecnie ograniczony głównie do badań czynności błony komórkowej. W następnych latach oczekiwany jest rozwój badań pozwalających na śledzenie mechanizmu zaburzeń transkrypcji i translacji wiążących się z mechanizmami tzw. uszkodzeń poreceptorowych.

LITERATURA

- [1] ARCHER J. A., GORDEN P., ROTH J., Defect in insulin binding to receptors in obese man. Amelioration with caloric restriction, *J. Clin. Invest.*, **55**: 166, 1975.
- [2] BAR R. S., GORDEN P., ROTH J., KAHN C. R., De MEYTS P., Fluctuation in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients, *J. Clin. Invest.*, **58**: 1123, 1976.
- [3] BAJAJ J. S., *Insulin and metabolism*, Elsevier, North Holland, Excerpta Medica Amsterdam, London, New York 1977.
- [4] BATAILLE D., FREYCHET P., ROSSELIN G., Internations of glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes: binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase, *Endocrinology*, **95**: 713, 1974.
- [5] BLECHER M., GOLDSTEIN S., Solubilization of liver plasma membrane glucagon receptors, [w:] *Hormone receptor interactions*. red. G. S. Levey, Marcel Deccker Inc. New York, Basel 1976.
- [6] CARPENTIER J. L., GORDEN P., AMHERDT M., Van OBERGHEN E., KHAN A., ORCI L., ¹²⁵J-Insulin binding to cultured human lymphocytes: initial localisation and fate of hormone determined by quantitative electron microscopic autoradiography, *J. Clin. Invest.*, **61**: 1057, 1978.
- [7] CUATRECASAS P., *Membrane receptors*, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**: 169, 1974.
- [8] FRAKER P. J., SPECK I. C., Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide [1, 3, 4, 6] tetrachloro-3a, 6a-diphenyl-glyco-uryl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**: 43, 1978.
- [9] FREYCHET P., KAHN R., ROTH J., NEVILLE Jr. D. M., Insulin interactions with plasma membranes in dependence of binding of the hormone and its degradation, *J. Biol. Chem.*, **247**: 3953, 1972.
- [10] FOUCHERAU-PERON M. F., RANCO F., FREYCHET P., ROSSELIN G., Effect of feeding and fasting on the early steps of glucagon action in isolated liver cells, *Endocrinology*, **98**: 755, 1976.
- [11] GAMBHIR K., ARCHER J. A., BRADLEY C. J., Characteristics of human erythrocyte insulin receptors, *Diabetes*, **27**: 701, 1978.
- [12] GORDEN P., CARPENTIER J. L., FREYCHET P., Le CAM A., ORCI L., ¹²⁵-Insulin direct demonstration of binding internalization and lysosomal association in isolated rat hepatocytes, *Diabetes*, **27**: Suppl 1, 450, 1978.
- [13] GORDEN P., *Hormone receptor interactions*, *Diabetes*, **28** Suppl. **1**: 8, 1979.
- [14] JACOBS S., CUATRECASAS P., *The insulin receptor interactions*. red. Cr. S. Levey, Marcel Deccker Inc. New York, Basel 1976.

- [15] JARRETT L., SMITH R. M., Electron microscopic demonstration of insulin receptors on adipocytes plasma membrane utilizing ferritine — insulin conjugate, *J. Biol. Chem.*, **249**: 7024, 1974.
- [16] JARRET L., SMITH R. M., Effect of cytochalasin B and D on groups of insulin receptors and on insulin action in rat adipocytes. Possible evidence for a structural relationship of the insulin receptor to the glucose transport system, *J. Clin. Invest.*, **63**: 571, 1979.
- [17] JASPAN J. B., RUBINSTEIN A. H., Circulating glucagon. Plasma profiles in health and disease, *Diabetes*, **26**: 887, 1977.
- [18] KAHN C. R., MAGESI K., BAR R. S., EASTMAN R. C., FLIER J. S., Receptors for peptide hormones. New inside into the patophysiology of disease states in man, *Ann. Intern. Med.*, **86**: 205, 1977.
- [19] KAHN C. R., ROTH J., Insulin receptors in disease states w Hormone-receptor interactions, red. C. S. Levey, Marcel Deccker Inc. New York, Basel 1976.
- [20] KAHN C. R., GOLDFINE I. D., NEVILLE D. M., De MEYTES P., Alterations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone, *Endocrinology*, **103**: 1054, 1978.
- [21] KLEIN J., LEVEY G. S., The cardiac glucagon receptor, [w:] Hormone-receptor interactions red. C. S. Levey 41, Marcel Deccker Inc. New York, Basel 1976.
- [22] KONO T., BARHAM F. W., The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. Studies with intact and trypsin treated fat cells, *J. Biol. Chem.*, **249**: 825, 1974.
- [23] De MEYTS P., BIANCO A. R., ROTH J., Site-site interactions among insulin receptors, *J. Biol. Chem.*, **257**: 1877, 1976.
- [24] OLEFSKY J. M., The insulin receptor: its role in insulin resistance of obesity and diabetes, *Diabetes*, **25**: 1154, 1976.
- [25] OLEFSKY J. M., Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects, *J. Clin. Invest.*, **57**: 1165, 1976.
- [26] OLEFSKY J. M., Mechanism of decreased insulin responsiveness of large adipocytes, *Endocrinology*, **100**: 1169, 1977.
- [27] RODBELL M., The role of hormone receptors and GTP regulating proteins in membrane transduction, *Nature*, **284**: 17, 1980.
- [28] SCHWARTZ R. H., BIANCO A. R., HANDWERGER B. S., KAHN C. R., Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leucocyte preparations: implications for studies of insulin-resistant states in man, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**: 474, 1975.
- [29] SILBERRING J., GOLDA W., SZYBIŃSKI Z., Insulin receptors in human leucocytes. *Endokrynol. Pol.* — w druku.
- [30] SOMAN V., FELIG P., Glucagon receptor: down regulation by physiological hyperglucagonemia, *Clin. Res.*, **25**: 665, 1977.
- [31] WACHSLICHT-RODBARD H., GROSS A., RODBARD H. A., EBERT D., ROTH M. H., Increased insulin binding to erythrocytes in anorexia nervosa, *New Engl. J. Med.*, **19**: 882, 1979.

Otrzymano: 5 lutego 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autora: ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

RECEPTORY HORMONÓW KONTROLUJĄCYCH ROZWÓJ I METAMORFOZĘ OWADÓW *

RECEPTORS OF HORMONES CONTROLLING INSECT DEVELOPMENT AND METAMORPHOSIS

Bronisław CYMBOROWSKI

Zakład Fizjologii Bezkręgowców, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie. W artykule opisano aktualne wiadomości na temat receptorów dla hormonów kontrolujących rozwój i metamorfozę u owadów.

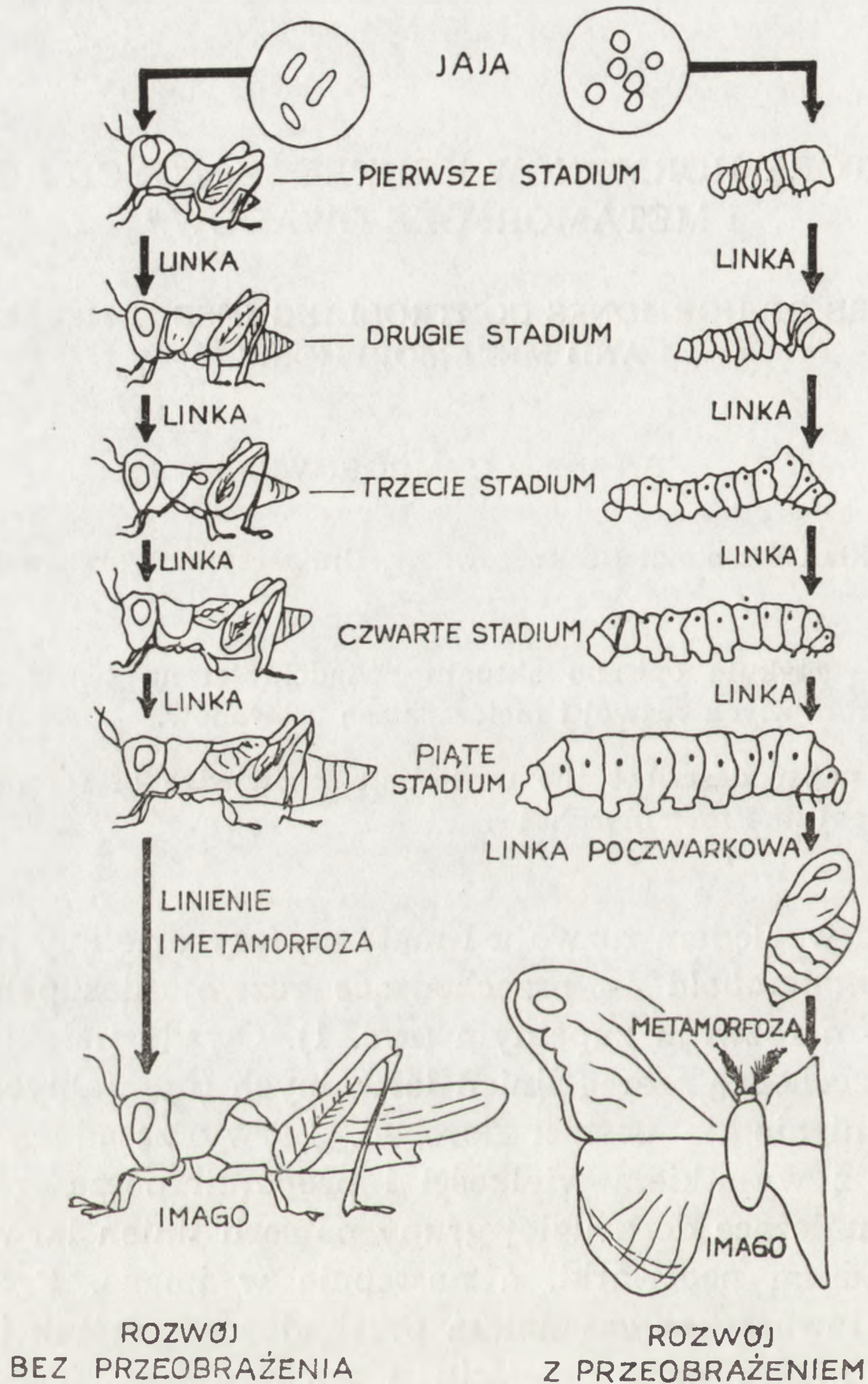
Summary. The paper describes the up-to-date knowledge of receptors controlling insect development and metamorphosis.

Owady pod względem rozwoju i metamorfozy dzielimy na dwa główne typy: *Hemimetabola* — przechodzące rozwój niezupełny oraz *Holometabola* — o rozwoju zupełnym (ryc. 1). Owady należące do pierwszej grupy przechodzą szereg linień larwalnych (nymfalnych), z których ostatnie to linienie do postaci dorosłej. Larwy zasadniczo nie różnią się od imago z wyjątkiem wielkości i proporcji poszczególnych części ciała. Owady należące do drugiej grupy po serii linień larwalnych przechodzą w stadium poczwarki, a następnie w imago. Przejściu larwy w poczwarkę towarzyszy zasadnicza przebudowa komórek i tkanek. Podobnie jest również przy przejściu z poczwarki w postać dorosłą.

Owady należące do *Holometabola* były i są obiektem badań wielu autorów. Pierwszym, który zwrócił uwagę na możliwość hormonalnej regulacji rozwoju owadów o metamorfozie zupełnej, był Polak Stefan Kopeć. Już w 1917 r. stwierdził, że mózg larw brudnicy nieparki (*Li-*

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r., zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie.

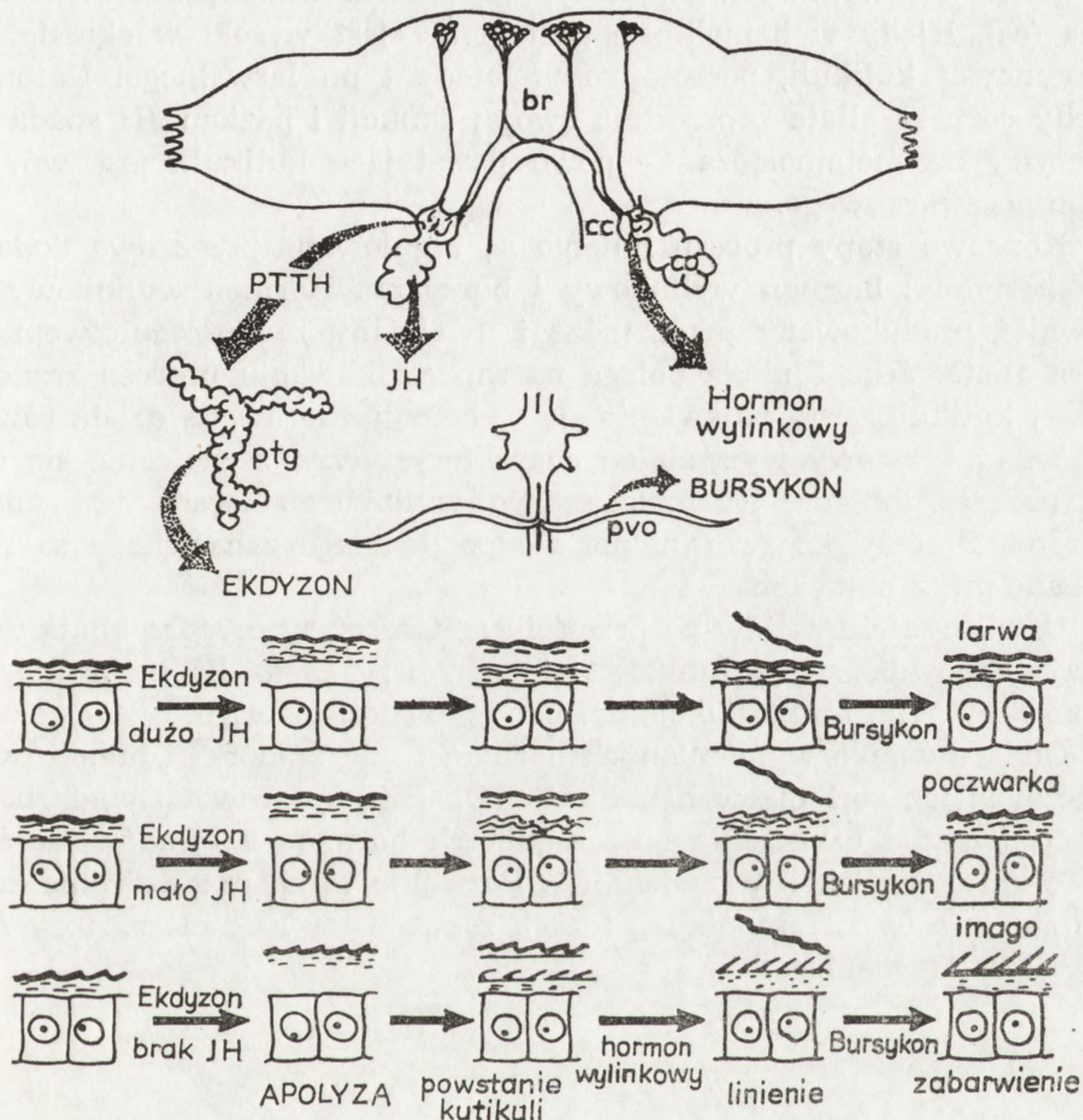
mantria dispar) uwalnia do hemolimfy substancję regulującą rozwój i metamorfozę tego gatunku. Dalsze badania Wiggleswortha, Fukudy i Williamsa przyczyniły się w znacznym stopniu do rozwoju nowej gałęzi biologii — endokrynologii owadów.



Ryc. 1. Porównanie rozwoju niepełnego (lewa strona) i zupełnego (prawa strona) owadów

Wiemy stosunkowo dużo na temat neurohormonalnej regulacji różnych stadiów rozwojowych owadów. Badania nad mechanizmami działania hormonów owadzych komplikuje jednak fakt, że ich postacie larwalne są tworcami mozaikowymi. W ich skład, obok komórek i tkanek typowo larwalnych, które giną wraz z przejściem owada w stadium poczwarki [2], wchodzi również komórki i tkanki, które przechodzą

metamorfozę (zmieniają się w struktury poczwarkowe) oraz komórki i tkanki, które nie ulegają zmianie przez cały rozwój larwalny (są to tzw. dyski imaginalne). Ponieważ podczas każdego przejścia z jednego stadium rozwojowego owada do drugiego następuje zrzućenie (apo-



Ryc. 2. Układ endokrynalny owadów (u góry) i wpływ jego hormonów na rozwój i metamorfozę tkanek (u dołu); br — mózg, cc — corpora cardiaca, ca — corpora allata, ptg — gruczoły protorakalne, pvo — narząd perywisceralny, PTTH — hormon protorakotropowy, JH — hormon juwenilny (wg [12])

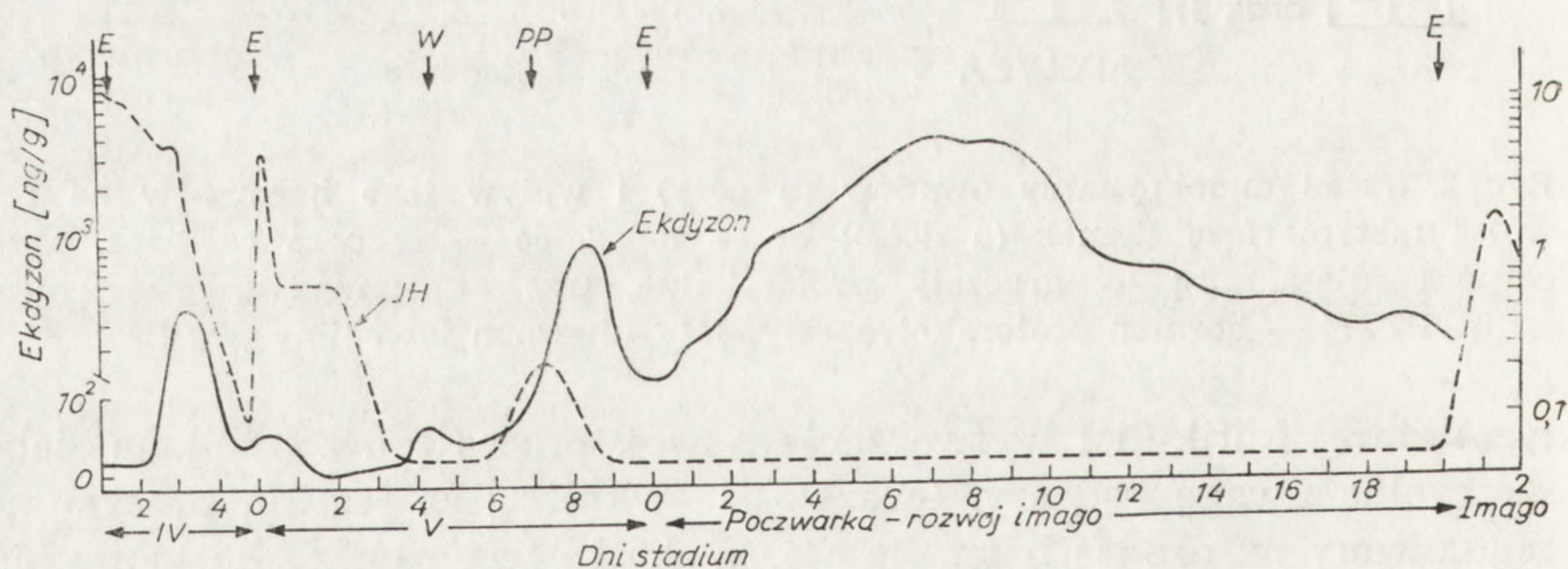
lyza) starej kutikuli i wytworzenie nowej, proces ten zwrócił na siebie szczególną uwagę badaczy. Okazało się wkrótce, że jest on precyzyjnie regulowany na drodze hormonalnej. Wykryto trzy główne hormony biorące udział w procesie linienia i metamorfozy owadów (ryc. 2): (1) hormon mózgowy (PTTH), który produkowany jest przez komórki neurosekrecyjne mózgu i uwalniany do hemolimfy za pośrednictwem corpora

cardiaca. PTH wywiera stymulujące działanie na gruczoły protorakalne, które produkują (2) ekdyzon, mieszaninę hormonów sterydowych. Ten z kolei działa na komórki epidermy inicjując produkcję nowej kutikuli. Charakter nowej kutikuli (larwalna czy poczwarkowa) określa (3) hormon juwenilny (JH), który jest produkowany przez corpora allata (ca). Kiedy w hemolimfie poziom JH jest wysoki w okresie syntezy nowej kutikuli, pozostaje ona wtedy typu larwalnego. Natomiast kiedy corpora allata zaprzestają swojej funkcji i poziom JH spada rozpoczyna się metamorfoza — nowo powstająca kutikula jest wówczas typu poczwarkowego.

Końcowe etapy procesu linienia są regulowane przez dwa dodatkowe hormony: hormon wylinkowy i bursykon. Hormon wylinkowy jest również produkowany przez mózg i uwalniany za pośrednictwem corpora allata. Jego funkcja polega na zapoczątkowaniu procesu zrzucania starej kutikuli. Jego pojawienie się w hemolimfie owada działa również na układ nerwowy wyzwalając charakterystyczne zachowanie się owada podczas linienia. Kutikula świeżo wyliniałego owada jest miękka i jasna. Procesy jej twardnienia i odpowiedniego zabarwienia są regulowane przez bursykon.

U większości owadów po przejściu metamorfozy corpora allata wznowiają ponownie swoją funkcję u imago, przy czym JH przez nie produkowany pełni teraz funkcję hormonu gonadotropowego.

Oddziaływanie wymienionych hormonów na komórki i tkanki owada zależy od ich stężenia w hemolimfie. Obecnie opracowano wiele bardzo czułych metod oznaczania poszczególnych hormonów owadów, zarówno w całym ciele, jak i w hemolimfie. Pozwoliło to na prześledzenie zmian ich stężenia w poszczególnych fazach rozwoju larw i metamorfozy *Manduca sexta* (ryc. 3).



Ryc. 3. Zmiany poziomu hormonu juwenilnego (JH) i ekdyzonu podczas rozwoju i metamorfozy larw *Manduca sexta* (wg [13])

Poziom ekdysteronu u tego gatunku wyraźnie wzrasta na około dwa dni zarówno przed każdym linieniem larwalnym, jak i przed przepoczwarczeniem. Przejście poczwarki w postać dorosłą wymaga znacznego podwyższenia poziomu ekdysteronu w hemolimfie, co zwykle obserwuje się mniej więcej w połowie okresu powstawania imago. Niewielki wzrost poziomu tego hormonu występujący trzeciego dnia ostatniego stadium larwalnego powoduje zmianę zachowania się owada. Niektórzy badacze uważają, że powstaje on w odpowiedzi na całkowite zniknięcie w tym czasie hormonu juwenilnego. Sytuacja taka zachodzi po raz pierwszy w życiu owada i przypada na ostatnie stadium rozwoju larwalnego (rys. 3). Tym między innymi różni się to stadium od stadiów poprzednich.

Po pierwszym, niewielkim wyrzucie ekdysteronu obserwuje się następny, tym razem znacznie większy od poprzedniego. Uwolniona ilość ekdysteronu jest wystarczająca do przemiany struktur larwalnych w poczwarkowe. W momencie drugiego uwalniania ekdysteronu pojawia się ponownie w hemolimfie owada niewielka ilość hormonu juwenilnego. Wydaje się, że pełni on w tym czasie podwójną rolę [15]. Z jednej strony stymuluje gruczoły protorakalne do produkcji i uwalniania ekdyzonu, z drugiej zaś zapobiega przedwczesnej metamorfozie niektórych tkanek owada (ryc. 4). Jeżeli bowiem usunie się corpora allata po okresie uwolnienia pierwszej porcji ekdyzonu (3 dzień ostatniego stadium), to następuje znaczne opóźnienie przepoczwarczenia (obniżony poziom ekdyzonu) oraz powstają formy przejściowe między larwą a poczwarką.

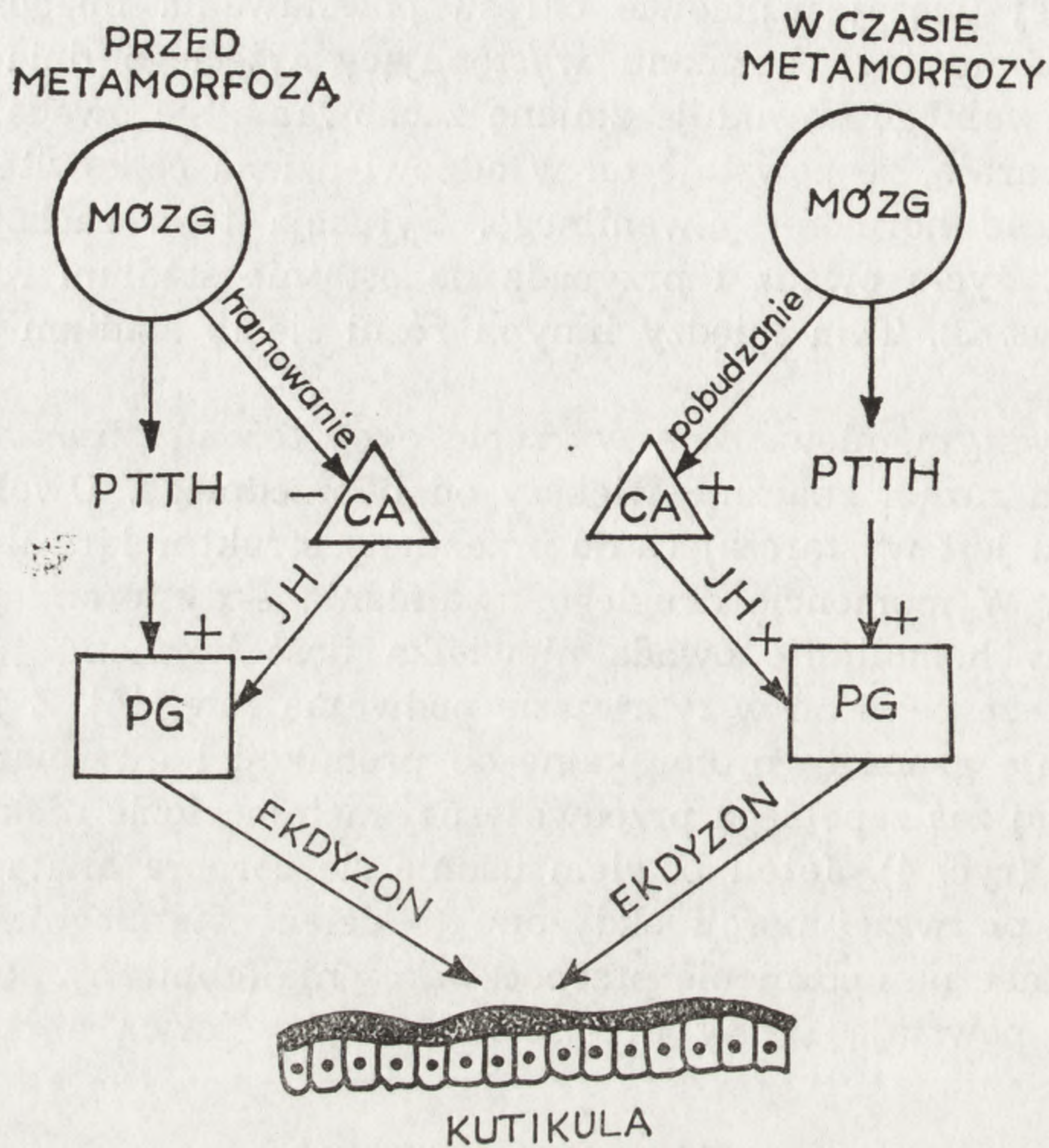
HORMON MÓZGOWY

Mimo że o występowaniu hormonu mózgowego było wiadomo począwszy od pierwszych prac Kopcia [7], do chwili obecnej wiemy niewiele o jego budowie chemicznej. W wielu pracowniach, szczególnie w Japonii, NRD i RFN próbowano wyizolować i oczyścić ten czynnik. Prace te doprowadziły do stwierdzenia, że jest to substancja typu białkowego o ciężarze cząsteczkowym około 5000. Nie wiemy też dokładnie, które z licznych grup komórek neurosekrecyjnych mózgu produkują tę substancję. Gibbs i Riddiford [4] przedstawili sugestię, że PTH jest produkowany przez komórki lateralne mózgu (ryc. 2).

Mimo że hormon ten nie został jeszcze całkowicie wyizolowany, pojawiły się już prace na temat przypuszczalnego mechanizmu jego działania. Tkanką docelową są gruczoły protorakalne. Niestety, nie znane są jeszcze receptory tego hormonu, ale nie wykluczona jest możliwość ich wnikania do komórek tego narządu. Obecnie wiemy już, że tak wielkie cząsteczki jak insulina, prolaktyna czy hormon wzrostowy kręgow-

ców przedostają się do komórek [6]. Znalaziono receptory wielu hormonów na błonach aparatu Golgiego.

Niewątpliwie przyszłe badania rozstrzygną czy PTTH również wnika do komórek gruczołów protorakalnych czy działa tylko na ich recepto-



Ryc. 4. Mechanizmy regulujące uwalnianie ekdyzonu przez gruczoły protorakalne (PG) w czasie trwania ostatniego stadium larwalnego. W pierwszej połowie tego stadium mózg hamuje na drodze nerwowej aktywność corpora allata i poziom JH zaczyna spadać. Mózg w tym czasie ma zdolność pobudzania PG do wydzielania ekdyzonu jednakże nie zachodzi to do czasu całkowitego zniknięcia JH z hemolimfy ponieważ hormon ten działa hamująco na aktywność PG. Po zniknięciu z hemolimfy JH uwalnia się niewielka ilość ekdyzonu, która powoduje zmianę zachowania się owada, a jednocześnie mózg zaczyna produkować substancję allatotropową. Teraz powstający znowu JH działa stymulująco na aktywność PG podobnie jak to czyni PTTH. W wyniku tej podwójnej stymulacji wytwarza się duża ilość ekdyzonu niezbędna do przepoczwarczenia się owada (wg Cymborowskiego i Williamsa, nieopublikowane)

ry powierzchniowe. Jak stwierdzili Vedeckis i inni [19] pierwszym sygnałem działania tego hormonu jest wzrost poziomu cyklicznego AMP. Jeżeli mianowicie hoduje się gruczoły protorakalne *in vitro* w obecności inhibitorów fosfodwuesterazy (enzymu rozkładającego cAMP), to następuje wzrost syntezy i uwalniania ekdyzonu w odpowiedzi na działanie PTTH. Niezbędne są dalsze badania w tym zakresie.

EKDYZON

W 1954 r. Butenandt i Karlson [1] wyizolowali z poczwerek jedwabnika (*Bombyx mori*) ekdyzon i ustalili jego strukturę chemiczną. Rycina 5 przedstawia cztery formy ekdyzonu występujące u owadów. Trzy inne zostały wyizolowane ze skorupiaków, a jeszcze inne, o działaniu podobnym do ekdyzonu, wyizolowano z różnych roślin, np. z paproci. Obecnie znamy również wiele bioanalogów ekdyzonu, często o większej aktywności biologicznej niż jego forma naturalna. Brak takich właśnie analogów był między innymi główną przyczyną niemożności prowadzenia na szeroką skalę badań nad receptorami ekdyzonu. Mniej więcej przed dwoma laty takie możliwości otworzyły się po otrzymaniu trytowanego analogu ekdyzonu — ponasteronu A. Okazuje się, że związek ten jest co najmniej 100 razy aktywniejszy od ekdysteronu i co najważniejsze, udało się otrzymać radioaktywny ponasteron A o bardzo wysokiej aktywności specyficznej.

W 1978 r. pojawiły się jednocześnie aż dwie prace donoszące o wykryciu receptorów ekdysteronu. W jednym przypadku [8] badania prowadzono *in vitro* na komórkach *Drosophila melanogaster* (komórki Kc). Inkubacja tych komórek w obecności H^3 ponasteronu A prowadzi do specyficznego jego wiązania się zarówno z frakcją cytozolu, jak i z frakcją jądrową. Wydaje się więc, że ekdysteron początkowo wnika do komórki, gdzie łączy się z receptorem białkowym cytoplazmy, a następnie w formie kompleksu receptor—hormon jest transportowany do jądra. Wyniki tego doświadczenia przedstawia tab. 1. Zamieszczone w niej dane byłyby niezmiernie interesujące, gdyby nie fakt, że badana linia komórkowa nie jest jednorodna i mogło się zdarzyć, że część komórek posiadała tylko receptory cytoplazmatyczne, a część tylko jądrowe. Zatem trudno jest na podstawie tych badań wyciągnąć jednoznaczne wnioski.

Ze względu na bardzo małą ilość receptorów cytoplazmatycznych i jądrowych (80–500) nie udało się ich bliżej scharakteryzować. Ustalono tylko, że współczynnik powinowactwa wynosi 3×10^{-9} M ponasteronu A zarówno dla frakcji cytozolu, jak i dla frakcji jądrowej, przy czym dla frakcji jądrowej dodatkowy współczynnik powinowactwa do ponasteronu A wynosi 7×10^{-10} M.

W pracy [22] również zastosowano ponasteron A do badań receptorów ekdysteronu w dyskach imaginalnych *Drosophila melanogaster*. Do badań użyto 10–20 tysięcy dysków/ml płynu inkubacyjnego. Inkubację prowadzono przez 90 min. Odmiennie niż w pracy poprzedniej nie stwierdzono tutaj różnicy w wiązaniu ponasteronu A przez frakcję cytozolu i frakcję jądrową. W obu przypadkach współczynnik powinow-

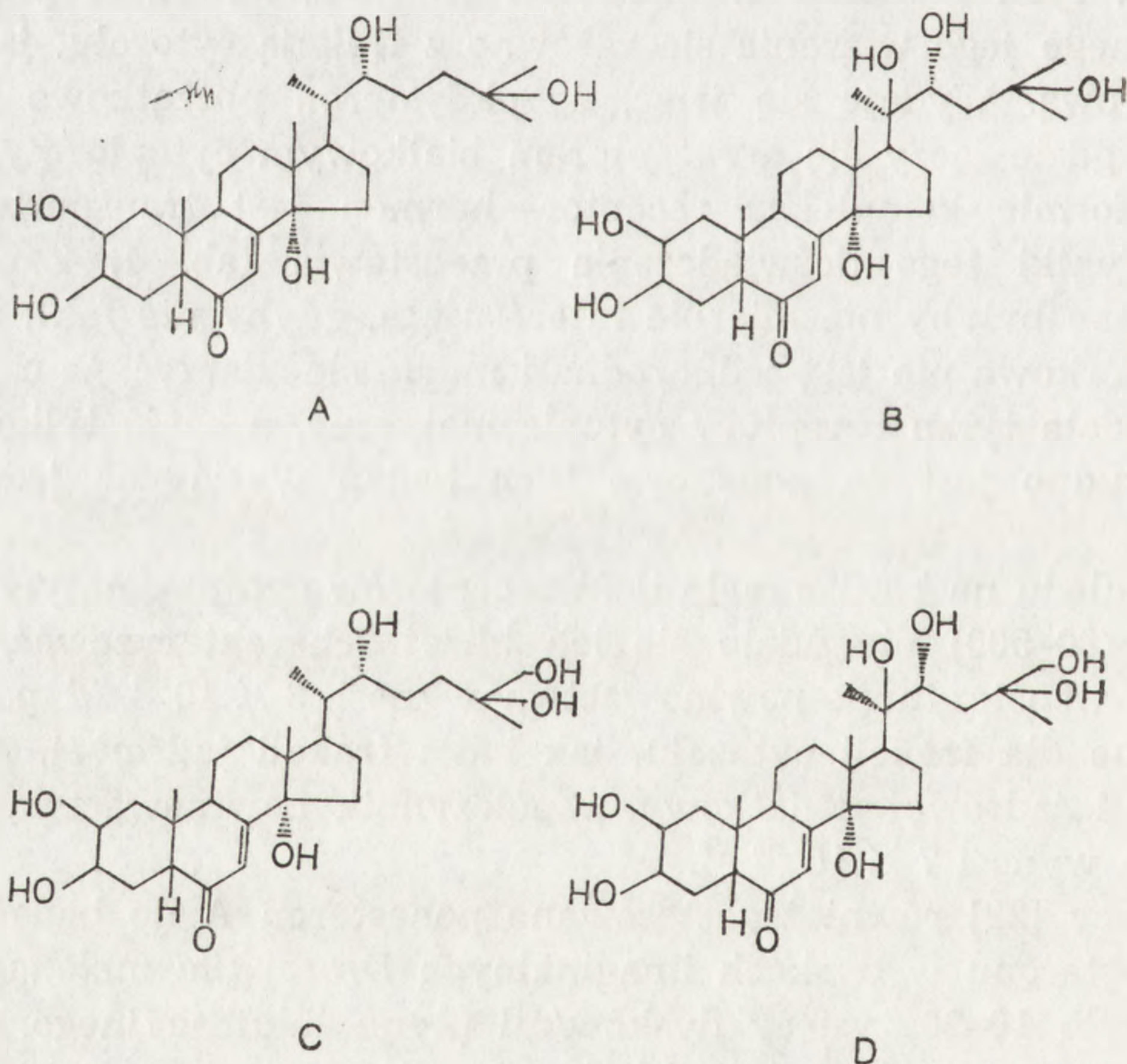
TABELA 1

Rozmieszczenie H^3 -ponasteronu A w różnych frakcjach komórkowych. Komórki *Drosophila* linii Kc były inkubowane w 0,3 M H^3 -ponasteronu A. Otrzymane jądra komórkowe przemywano i ekstrahowano KCl. Wyniki przedstawiono w procentach włączonej radioaktywności [8]

Inkubacja w min	Supernatant	Inkorporacja w %			Σ %
		frakcja jądrowa	frakcja rozpuszczalna w 0,4 M KCl	osad	
5	54,8	6,3	22,6	3,0	86,7
30	26,6	4,8	47,0	17,2	95,6

wactwa wynosił $3-4 \times 10^{-9}$ M ponasteronu A, co jest zgodne z wynikami badań nad morfogenetycznym działaniem tego hormonu. Stwierdzono bowiem, że minimalne stężenie ponasteronu A wywołujące zmiany morfologiczne dysków *in vitro* wynosi $4,2 \times 10^{-9}$ M.

I w tym przypadku ze względu na trudności techniczne w uzyskaniu dostatecznej ilości materiału wyjściowego do izolacji receptorów nie udało się ich bliżej scharakteryzować. Stwierdzono, że ciężar cząstecz-



Ryc. 5. Cztery formy ekdyzonu, które zostały wyizolowane z owadów. A — α-ekdyzon, B — β-ekdyzon, C — 26-hydroksyekdyzon, D — 20,26-dwuhydroksyekdyzon

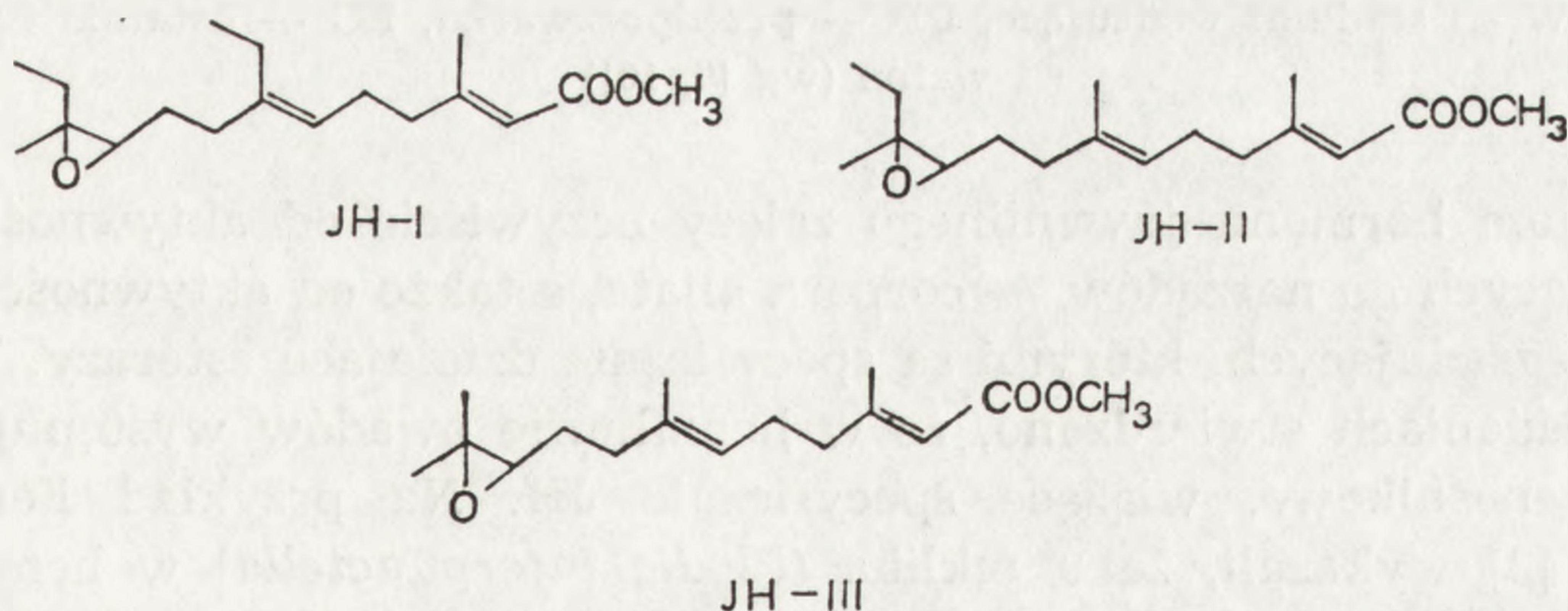
kowy tego białka waha się między 250 000 a 480 000. W badaniach tych nie stwierdzono różnicy w efektywności wiązania hormonu przez całe dyski i uzyskane z nich frakcje cytoplazmatyczną i jądrową komórki, co pozwala przypuszczać, że receptory cytoplazmatyczne i jądrowe są takie same.

Na podstawie przedstawionych wyników trudno jeszcze ustalić pełny obraz mechanizmu działania ekdyzonu. Dostępne dane są zbyt fragmentaryczne i często kontrowersyjne by można z nich wyciągać pewne wnioski.

HORMON JUWENILNY

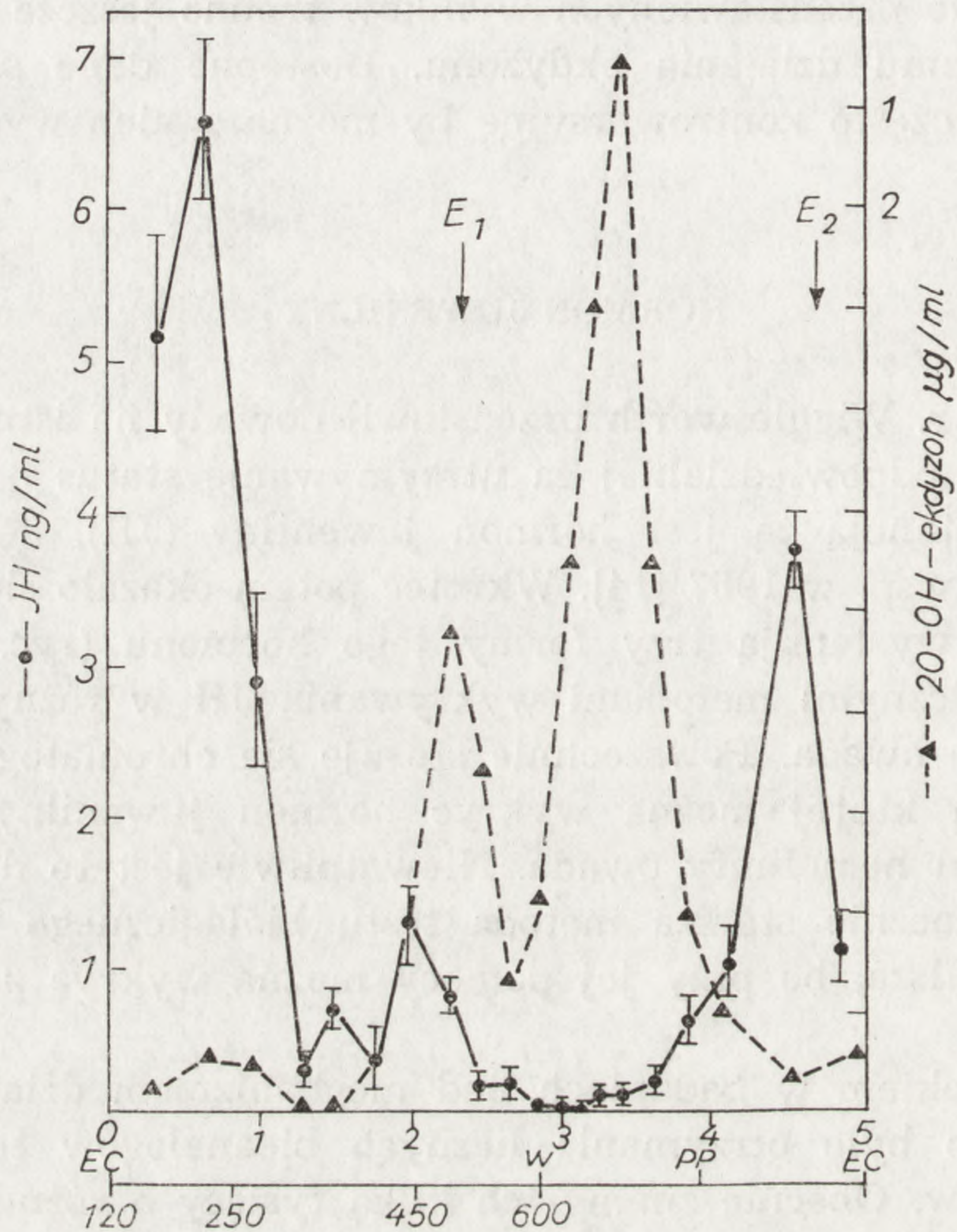
Już w 1934 r. Wigglesworth przedstawił dowody na istnienie u owadów substancji odpowiedzialnej za utrzymywanie status quo w ich organizmie. Substancją tą jest hormon juwenilny (JH). Jego strukturę ustalił Röller i wsp. w 1967 [14]. Wkrótce potem okazało się, że w organizmie owada występują trzy formy tego hormonu (ryc. 6). Obecnie dysponujemy licznymi metodami wykrywania JH w różnych tkankach i w hemolimfie owada. Powszechnie stosuje się chromatografię gazową [9], za pomocą której można wykryć hormon juwenilny w stężeniu około 100 pg/ml hemolimfy owada. Niewątpliwie jest to duże osiągnięcie, chociaż znacznie starsza metoda testu biologicznego *Galleria* [20] jest jeszcze czulsza, bo przy jej pomocy można wykryć JH o stężeniu 5 pg/ml.

Dalszym krokiem w badaniach nad mechanizmem działania hormonu juwenilnego było otrzymanie licznych bioanalogów tego hormonu tzw. juwenoidów. Obecnie znamy ich kilka tysięcy o różnej aktywności biologicznej. Łatwość otrzymania dużej ilości aktywnego biologicznie hormonu umożliwiła przeprowadzenie wszechstronnych badań z zakresu jego wpływu na różne stadia rozwojowe owada. Już pierwsze wyniki



Ryc. 6. Budowa chemiczna trzech hormonów juwenilnych wyizolowanych z owadów

badania wykazały, że efektywność działania JH zależy przede wszystkim od tego, w jakiej proporcji w danym momencie występują w hemolimfie JH i ekdyzon. Stosunek tych dwóch hormonów ulega znacznym zmianom, szczególnie w ostatnim stadium larwalnym (ryc. 7).



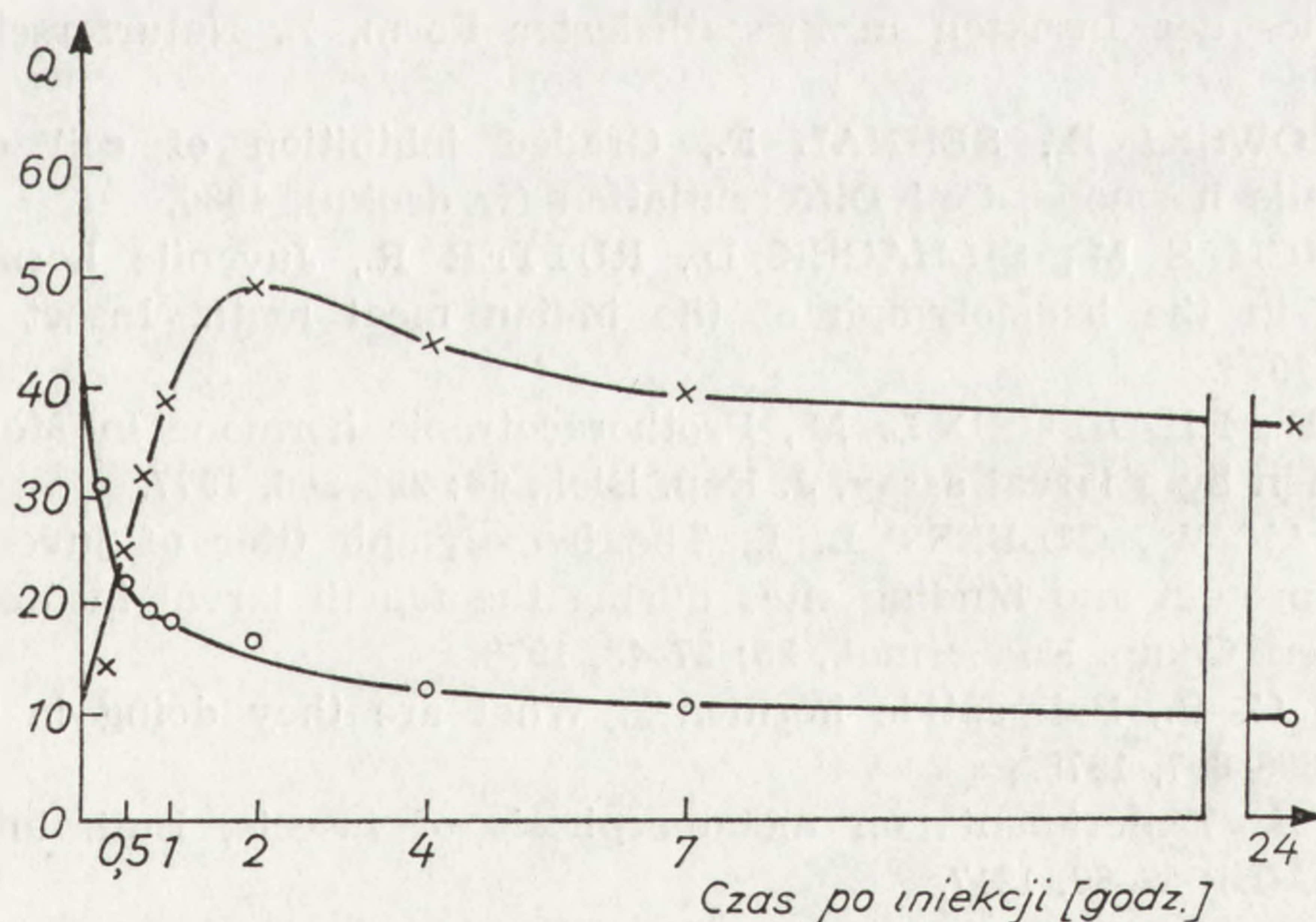
Ryc. 7. Zmiany poziomu JH i 20-hydroksyekdyzonu w czasie trwania ostatniego stadium larwalnego bielinka kapustnika (*Pieris brassicae*). E_1 i E_2 oznaczają maksymalną aktywność specyficznej esterazy JH. Najniższa skala określa ciężar owada. W — stadium wędrujące, PP — przedpoczwarzka, EC — ostatnia linka larwalna (wg [9, 10])

Poziom hormonu juvenilnego zależy oczywiście od aktywności syntetyzujących go narządów — corpora allata, a także od aktywności enzymów degradujących, którymi są specyficznymi działające esterazy. W licznych badaniach stwierdzono, że w hemolimfie owadów występują białka przenośnikowe, wiążące specyficznie JH. Na przykład Ferkovich i wsp. [3] wykazali, że u mklia (*Plodia interpunctella*) w hemolimfie występuje białko o ciężarze cząsteczkowym $2,5 \times 10^4$ selektywnie wiążące się z JH. Podobne badania były przeprowadzane na *Manduca*

sexta [5, 11]. Główną funkcją tych białek, jak się wydaje, jest ochrona JH przed działaniem niespecyficznego esteraż występującego w hemolimfie owada.

Inną, nie mniej ważną, funkcją białek przenośnikowych jest prawdopodobnie ułatwienie wiązania się JH z receptorami komórek i tkanek docelowych. Ponieważ głównym miejscem działania hormonu juwenilnego jest kutikula owadów, tam przede wszystkim poszukiwano jego receptorów. Schmielek [16] wyizolował z epidermy kutikuli poczwarkowej mącznika (*Tenebrio molitor*) białko wiążące się specyficznym z jednym z bioanalogów hormonu juwenilnego. Do doświadczeń użył trytowanego hormonu o specyficznej aktywności 28 Ci/mM. Hormon ten wprowadzony do hemolimfy poczwarek był bardzo aktywnie wychwytywany przez komórki epidermalne kutikuli (ryc. 8). Badania właściwości fizykochemicznych wykazały, że jest to receptor rybonukleinowo-białkowy o ciężarze cząsteczkowym 360 000 o punkcie izoelektrycznym 4,4. Kompleks ten posiada wysoki współczynnik powinowactwa do badanego analogu JH wynoszący $4,4 \times 10^{10}/M$. Dalszą charakterystykę uniemożliwiło bardzo niskie stężenie tego receptora wynoszące $1,7 \times 10^{-10}/M$. Stwierdzono tylko, że kompleks ten jest wrażliwy na działanie rybonukleazy i trypsyny.

U tego samego gatunku owada stwierdzono występowanie receptorów hormonu juwenilnego w jajnikach [17]. W tym przypadku wyizolowano białko o ciężarze cząsteczkowym 8×10^5 o punkcie izoelektrycznym 5,4. W warunkach doświadczalnych białko to było termostabilne



Ryc. 8. Zmiany w rozmieszczeniu analogu hormonu juwenilnego w epidermie (x) i w pozostałych częściach ciała (o-o) poczwarek *Tenebrio mollitor*. Do poczwarek wstrzykiwano jednorazowo 1 μ l znakowanego hormonu w stężeniu 10^{-8} M. Q — stosunek nierozłożonego hormonu do ogólnej radioaktywności (w %). Wg [16]

i ulegało precypitacji po działaniu 5% kwasu trójchlorooctowego, hydrolyzie zaś ulegało po działaniu 1 N HCl. Wiązanie z JH było specyficzne, nie można go było rozerwać przez działanie różnych substancji o tej samej polarności.

Właściwie jest to wszystko co dotychczas wiadomo na temat receptorów hormonu juvenilnego. Nie prowadzono dokładnych badań na temat lokalizacji tych receptorów w komórce. Nie wiadomo też czy występują one głównie w cytoplazmie czy w jądrze komórki. Przypuszcza się, że JH działa bezpośrednio na genom komórki jako korepresor [21].

Jak dotychczas nie przeprowadzono jeszcze badań nad receptorami dwóch innych wspomnianych poprzednio hormonów: wylinkowego i bursykonu. Hormon wylinkowy dopiero niedawno wyizolowano i określono jego ciężar cząsteczkowy na 9000. Stwierdzono również, że działa on głównie na ośrodkowy układ nerwowy owada [18] i tam prawdopodobnie poszukiwać należy jego receptorów. Wyizolowano również bursykon i ustalono, że jest to białko o ciężarze cząsteczkowym 40 000. Stwierdzono również, że działa on głównie na hemocyty owadów zmieniając przepuszczalność ich błon w stosunku do tyrozyny. Sugeruje się [12], że hormon ten działa za pośrednictwem cyklicznego AMP.

LITERATURA

- [1] BUTENANDT A., KARLSON P., Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormones der Insekten in kristallisierter Form, Z. Naturforsch., **9 b**: 389–391, 1954.
- [2] CYMBOROWSKI B., SEHNAL F., Graded inhibition of cell disintegration by juvenile hormone, Cell Differentiation (w druku), 1980.
- [3] FERKOVICH S. M., SILHACEK D., RUTTER R., Juvenile hormone binding proteins in the haemolymph of the indian meal moth, Insect Biochem., **5**: 141–150, 1975.
- [4] GIBBS D., RIDDIFORD L. M., Prothoracotropic hormone in *Manduca sexta*: localization by a larval assay, J. Exp. Biol., **66**: 255–266, 1977.
- [5] GOODMAN W., GILBERT L. I., The hemolymph titer of juvenile hormone binding protein and binding sites during the fourth larval instar of *Manduca sexta*, Gen. Comp. Endocrinol., **35**: 27–43, 1978.
- [6] KOLATA G. B., Polipeptide hormones: What are they doing in cells? Science, **201**: 895–897, 1978.
- [7] KOPEĆ S., Experiments on metamorphosis of insects, Bull. int. Acad. Sci. Cracovie, (B): 57–60, 1917.
- [8] MAROY P., DENNIS R., BECKERIS C., SAGE B. A., O'CONNOR J. D., Demonstration of an ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**: 6035–6038, 1978.
- [9] MAUCHAMP B., LAFONT R., HARDY M., JOURDAIN D., Analysis of insect juvenile hormone by gas chromatography mass spectrometry: Problems

- of simple preparation and choice of detection procedure, *Biomedical Mass Spectrometry*, **6**: 276–281, 1979.
- [10] MAUCHAMP B., LAFONT R., JOURDAIN D., Mass fragmentographic analysis of juvenile hormone 1 levels during the last larval instar of *Pieris brassicae*, *J. Insect Physiol.*, **25**: 545–550, 1979.
- [11] PETERSON R. C., REICH M. F., DUNN P. E., LAW J. H., KATZENELLENBOGEN A., Binding specificity of the juvenile hormone carrier protein from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson (*Lepidoptera: Sphingidae*), *Biochem.*, **16**: 2305–2311, 1977.
- [12] RIDDIFORD L. M., TRUMAN J. W., *Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators*, [w:] *Biochemistry of Insects*, Academic Press, New York, San Francisco, London. pp: 307–357, 1978.
- [13] RIDDIFORD L. M., Interaction of ecdysteroids and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm, [w:] *Progress in Ecdysone Research*, Ed. J. A. Hoffmann (w druku), 1980.
- [14] RÖLLER H., DAHM K. H., SWEELEY C. C., TROST B. M., The structure of the juvenile hormone, *Angew. Chem.*, **79**: 190–191, 1967.
- [15] SAFRANEK L., CYMBOROWSKI B., WILLIAMS C. M., Effect of juvenile hormone on ecdysone-dependent development in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, *Biol. Bull.* (w druku), 1980.
- [16] SCHMIALEK P., Ribonucleoprotein particles in epidermis cells as the receptor for juvenile hormone, *Nature*, **245**: 267–268, 1973.
- [17] SCHMIALEK P., GEYER A., MIOSGA V., NÜNDEL M., ZAPF B., Juvenil-hormonbindende Substanzen mit allosterischen Eigenschaften in den Ovarien von *Tenebrio molitor* L., *Z. Naturforsch.*, **30 c**: 730–733, 1975.
- [18] TRUMAN J. W., RIDDIFORD L. M., *Invertebrate systems for the study of hormonal effects on behavior*, *Vitamins and Hormones*, **35**: 283–315,, 1977. Academic Press New York, San Francisco, London.
- [19] VEDECKIS W. V., BOLLENBACHER W. E., GILBERT L. I., Insect prothoracic glands: A role for cyclic AMP in the stimulation of α -ecdysone secretion, *Molecular and Cellular Endocrin.*, **5**: 81–88, 1976.
- [20] De WILDE J., STAAL G. B., de KORT C. A. D., de LOOF A., BAARD G., Juvenile hormone titers in the hemolymph as function of photoperiodic treatment in the adult Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say, *Proc. K. Ned. Akad. Wet. (C)*, **71**: 321–326, 1968.
- [21] WILLIAMS C. M., KAFATOS F. C., Theoretical aspects of the action of juvenile hormone, *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, **44**: 151–162, 1971.
- [22] YUND M. A., KING D. S., FRISTROM J. W., Ecdysteroid receptors in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 6039–6043, 1978.

Otrzymano: 4 lutego 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autora: ul. Żwirki i Wigury 93, 02–089 Warszawa.

KOMUNIKAT

Komitet Cytobiologii Polskiej Akademii Nauk oraz Uniwersytet Jagielloński organizują we wrześniu (22–23 IX) 1983 r. w Krakowie dwudniową Pierwszą Ogólnopolską Konferencję Biologii Komórki.

Przewidziane są obrady w następujących sekcjach:

1. Sekcja Struktury i Funkcji Błon Biologicznych,
2. Sekcja Strukturalnych Regulacji Metabolizmu Komórki,
3. Sekcja Ruchów Komórek,
4. Sekcja Regulacji Wzrostu i Podziału Komórek.

W sekcjach przewiduje się referat plenarny, doniesienia plakatowe i dyskusję okrągłego stołu.

Osoby zainteresowane proszone są o zgłoszenie swojego udziału w obradach wymienionych sekcji pod adresem:

Wincenty Kilarski
Uniwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii
ul. M. Karasia, 30-060 Kraków

w terminie do 31 grudnia 1982 r.

Wincenty Kilarski

RECEPTORY HORMONÓW ROŚLINNYCH *

PLANTS HORMONE RECEPTORS

Halina KONONOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie. Opisano miejsca działania auksyn w komórkach roślinnych: akceptory auksyn na błonach komórkowych, w siateczce śródplazmatycznej i tonoplaście oraz receptory w cytoplazmie. Aktywność miejsc receptorowych wiążących auksyny może ulegać modyfikacji pod wpływem naturalnie występującego czynnika. Opisano również wiązanie tych hormonów w jądrze oraz wykazano w nim istnienie czynnika transkrypcyjnego kontrolowanego przez auksyny. Przedyskutowano oddziaływanie giberelin oraz cytokinin z chromatyną.

Summary. The site of action of auxins in plant cells acceptors of auxins in cell membranes, in endoplasmic reticulum and tonoplast as well as receptors in the cytoplasm are described. The activity of receptor sites binding auxin may be modified under the influence of the naturally present factor. Binding of these hormones in the nucleus is described and the existence in it is demonstrated of a transcription factor controlled by auxins. The interaction of gibberellins and cytokinins with chromatin is discussed.

Mimo nagromadzenia ogromnej literatury, liczba faktów świadczących o wpływie fitohormonów na podstawowe procesy życiowe roślin, molekularne podstawy działania tych związków są nadal nie wyjaśnione. Jest prawdopodobne, że rozpoczęcie procesów prowadzących do fizjologicznej odpowiedzi rośliny na hormon polega na połączeniu hormonu ze znajdującymi się w komórkach specyficznymi miejscami wiązań. W wielu pracowniach od szeregu lat prowadzone są badania dążące do identyfikacji i scharakteryzowania miejsc wiążących hormony.

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r., zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie.

Szybki i wielostronny rozwój badań nad hormonami zwierzęcymi spowodował, że mechanizm ich działania jest znacznie lepiej poznany niż w przypadku hormonów roślinnych. Scharakteryzowano np. wiele specyficznych białek wiążących te hormony i opisano kompleksy hormon—receptor. W endokrynologii zwierzęcej takie białka określane są mianem „receptorów hormonów”. Między innymi interakcja hormon—receptor była badana w przypadku estrogenu przez iniekcję radioaktywnych hormonów i określenie radioaktywności w różnych narządach zwierząt. Wykazano w ten sposób, że gromadzenie hormonu następuje tylko w tkankach, które wykazują fizjologiczną odpowiedź na hormon, czyli w tzw. tkankach docelowych.

Przez analogię oczekuje się, że także u roślin miejsca receptorowe hormonów występują tylko w tkankach docelowych. Jednak w świecie roślin istnieją tylko nieliczne hormony, które kontrolują ściśle określone procesy fizjologiczne, natomiast większość z nich reguluje wiele odrębnych funkcji komórki. Rodzaj występujących odpowiedzi na hormon uzależniony jest od tkanki, do której został on podany lub w której występuje endogennie [35]. Auksyny np. stymulują wzrost wydłużeniowy łodygi i podziały komórkowe w tkance merystematycznej. Ponieważ jest prawdopodobne, że auksyny oddziałują na większość tkanek roślinnych, można oczekiwać występowania receptorów tych hormonów w większości, a nawet we wszystkich tkankach.

Receptor hormonu powinien wykazywać określone właściwości, a mianowicie: wysokie powinowactwo wobec hormonu, znaczną specyficzność wiązania, niską pojemność. Ponadto kompleks hormon—receptor musi stanowić aktywną strukturę zdolną do zainicjowania pierwotnego działania hormonu.

Do hormonów roślinnych, które wywierają decydujący wpływ na procesy wzrostu i rozwoju rośliny zalicza się aktualnie: auksyny, gibbereliny, cytokininy, kwas abscyzynowy i etylen (tab. 1).

Podstawową metodą badania właściwości kompleksu hormon—receptor jest określenie stałej dysocjacji K_D tego kompleksu. Jeżeli wartość stałej dysocjacji jest bardzo niska, kompleks hormon—receptor może być izolowany przez wirowanie lub filtrację żelową. Natomiast jeżeli występuje szybka dysocjacja kompleksu, wiązanie to może być wykazane jedynie przy zachowaniu równowagi między związanymi i wolnymi hormonami [35]. W tak zwanym wykresie Scatcharda wyznacza się stosunek stężenia związanych do wolnych hormonów (rzędna) jako funkcję związanych hormonów (odcięta). Jeżeli tak wytyczone punkty układają się w linię prostą, świadczy to o występowaniu pojedynczego typu miejsc wiązań. W przypadku kiedy punkty tworzą wklęsłą krzywą można oczekiwać wielu typów miejsc wiążących. Wiązanie o wy-

TABELA 1

Związki znane jako hormony roślinne

Nazwa hormonu	Charakter chemiczny	Stosowane skróty	Podstawowe działanie fizjologiczne
auksyny ¹	kwasy 3-indolilo-octowe i pochodne	IAA	pobudzanie wzrostu wydłużeniowego komórki
gibereliny	związek cykliczny o charakterze kwasu, zawierający 4-atomowy rdzeń gibanu	GA _n	stymulacja wzrostu wydłużeniowego pędu
cytokininy ²	pochodne adeniny (podstawione w pozycji —6) np. zoatyna: 6-(4-hydrokso-3-metylobutylo-2-enylo)-aminopuryna		stymulacja podziałów komórkowych
kwasy abscyzynowe	kwasy abscyzynowe (seskwiterpeny)	ABA	hamowanie wzrostu komórek
etylen	etylen	—	współdziałanie w procesach wzrostu i rozwoju z innymi hormonami

¹ Do grupy tej zalicza się też auksyny syntetyczne nie produkowane przez rośliny jak: kwas 2,4-dwuchlorofeniloctowy — 2,4-D; kwas naftaleno octowy — NAA; kwas indolilomasłowy — IBA; kwas 2,4,5-trójchlorofenoksoctowy-2,4,5-T; Ważną grupę stanowią także antyauksyny, związki o właściwościach przeciwnych niż auksyny jak: kwas trójjodobenzoesowy — TIBA; kwas naftalenopropionowy — NPA.

² Znane są też cytokininy, jak: 6-benzyloaminopuryna — BAP.

Inne stosowane skróty.

IPA — kwas indolilopirogronowy; BA — benzyloadenina — cytokinina; PPA — syntetyczna auksyna; BAP — benzyloaminopuryna — syntetyczna cytokinina.

sokim powinowactwie jest reprezentowane przez stromą część krzywej, natomiast miejsca wiązania o niskim powinowactwie są widoczne w odcinku, gdzie nachylenie krzywej jest mniej strome. Złożona krzywa ilustrująca wiązanie hormonu o wysokim i niskim powinowactwie może być rozdzielona na dwie części, które określają wartość K_D .

Drugą podstawową właściwością miejsc receptorowych jest wysoka specyficzność do danego hormonu. Wiadomo, że każdy hormon roślinny posiada wiele analogów o różnej biologicznej aktywności. Wydaje się mało prawdopodobne, aby nieaktywne analogi wiązały się z receptorami i tworzyły produkty o pośredniej aktywności biologicznej. Kende i Gardner [35] sugerują, że dwa różne hormony, powodujące taką samą odpowiedź, nie działają w tych samych miejscach. Jednak z drugiej strony pewne nieaktywne analogi hormonów mogą być inhibitorami aktywnych hormonów (na zasadzie konkurencyjności) w przypadku, kiedy oba wiążą się do tych samych miejsc. Ponadto, specyficzne wiązanie hormonu do receptora może być ograniczone przez wiązanie enzy-

mów biorących udział w przemianach metabolicznych tego hormonu. Możliwe jest również występowanie niespecyficycznych miejsc wiązań hormonów. Jeżeli takie miejsca wskazujące powinowactwo do hormonów są obecne w dużych ilościach, wówczas wykrycie niewielkiej ilości specyficznych miejsc wiązań jest znacznie utrudnione. Z tego względu dla rozróżnienia typu miejsc wiążących hormon konieczne jest przeprowadzenie badań kinetycznych kompleksów hormon—receptor.

1. MIEJSCA DZIAŁANIA AUKSYN

Ponieważ auksyny były przez długi czas najszerzej badaną grupą hormonów roślinnych, jest zrozumiałe, że liczba prac dotyczących działania tych właśnie hormonów jest największa. Wiele z tych prac dostarczyło informacji o wiązaniu auksyn do specyficznych frakcji subkomórkowych.

Istnieją obecnie dwie główne koncepcje dotyczące miejsc działania auksyn. W myśl pierwszej z nich miejscem wiązania tych hormonów są błony komórkowe, druga natomiast zakłada istnienie zależności między działaniem auksyn a metabolizmem kwasów nukleinowych.

Próby zlokalizowania miejsc wiązania auksyn za pomocą metod autoradiograficznych były nieliczne i większość z nich dotyczyła lokalizacji na poziomie tkankowym. Natomiast badania lokalizacji subkomórkowej dały rozbieżne wyniki. W wierzchołkach korzeni traktowanych uprzednio ^{14}C -IAA lub ^{14}C -2, 4-D poziom radioaktywności obniża się z upływem czasu — w komórkach utrwalanych w 120 godz. po usunięciu radioaktywnego hormonu ze środowiska znakowanie było niewykrywalne metodą autoradiograficzną [38]. W analogicznych badaniach przy zastosowaniu ^{14}C -NAA lub ^3H -IAA radioaktywność początkowo była zlokalizowana w cytoplazmie, po 3-24 godz. inkubacji z hormonem radioaktywne były ściany komórkowe [57, 74].

1.1. AKCEPTORY AUKSYN NA BŁONACH KOMÓRKOWYCH

Ponieważ jednym z najwcześniejszych fizjologicznych efektów działania auksyn na wzrost wydłużeniowy komórek jest oddziaływanie na ścianę komórkową, wiele hipotez sugeruje, że pierwotne miejsca działania tych hormonów muszą być zlokalizowane na powierzchni komórki. Badania frakcji subkomórkowych poddanych inkubacji z radioaktywnymi auksynami sugerują wiązanie ich z różnymi błonami, przede wszystkim z plazmolemą. Wyniki dalszych badań wskazują na istnienie receptorów auksyn na siateczce śródplazmatycznej i na tonoplaście.

Najwcześniejsze doniesienia wykazały, że auksyny mogą oddziaływać *in vitro* z lipidami zawartymi w błonie komórkowej. Weigl [79, 80, 81] stwierdził, że ^{14}C -IAA i ^{14}C -2, 4-D zdolne są do fizycznej asocjacji

z lecytynami rozpuszczonymi w CCl_4 . Wiązanie to wydaje się być specyficzne, ponieważ asocjacja kefalin i fosfatydyloseryny z auksynami okazała się znacznie słabsza, natomiast inne lipidy nie wykazywały takiego powinowactwa. Nieradioaktywny IAA zmniejszał ilość ^{14}C -IAA zawartego we frakcji lecytynowej, nie obniżał natomiast ilości ^{14}C -2,4-D, co wskazywało na występowanie specyficznego współzawodnictwa. Jednak Veen [74] sugeruje, że obserwowana interakcja IAA z lecytynami nie jest związana z biologiczną aktywnością auksyn.

Ważnych dowodów świadczących o lokalizacji akceptorów auksyn na błonach komórkowych dostarczyły badania Ray'a i wsp. [53]. Posłużono się metodą porównywania specyficzności wiązania ze specyficznością hormonalnej odpowiedzi w stosunku do serii analogów. W tym celu określano specyficzność głównych miejsc wiążących ^{14}C -NAA zlokalizowanych na błonach homogenatów siewek kukurydzy w stosunku do NAA, IAA oraz 48 analogów drogą pomiaru zdolności analogów do współzawodnictwa o miejsce wiązania NAA. Eksperymenty te potwierdziły przypuszczenia, że miejsca wiążące auksyny są ich receptorami.

1.1.1. Akceptory auksyn na plazmolemie. Badania Lembi i Morre [37] nad inhibitorami transportu auksyn, a także praca Tanady [65] wykazująca, że auksyny wywierają wpływ na potencjał powierzchniowy komórki, nasunęły przypuszczenie, że miejsca działania tych hormonów znajdują się na plazmolemie. Jednak główne dowody świadczące o występowaniu interakcji auksyn z plazmolemą pochodzą z pracy Hertel'a i wsp. [27]. Okazało się bowiem, że frakcja plazmoemy otrzymana z hypokotyli kukurydzy, pozbawiona zanieczyszczeń pochodzących z mitochondriów i jąder, posiadała zdolność wiązania ^{14}C -IAA i ^{14}C -NAA. Wiązanie to badane w szerokim zakresie stężeń wykazywało stosunkowo niski poziom nasycenia.

Rola plazmoemy jako akceptora auksyn została potwierdzona w doświadczeniach polegających na indukowaniu syntezy polisacharydów ściany komórkowej w systemie *in vitro*, zawierającym fragmenty wyizolowanej plazmoemy oraz 2,4-D [73]. W takim układzie eksperymentalnym obecność plazmoemy była wystarczającym warunkiem dla pojawienia się jednego z końcowych efektów działania auksyn, tj. przyspieszenia wzrostu ściany komórkowej.

Wyizolowana frakcja plazmoemy (zidentyfikowana w mikroskopie elektronowym) posiadała także zdolność wiązania ^3H -NPA [14]. Specyficzność miejsc wiązania była badana dla wielu różnych hormonów, takich jak: IAA, GA_3 ; ABA oraz auksyn syntetycznych (2,4-D, L-NAA), a także TIBA; okazało się, że związki te nie współzawodniczą z ^3H -NPA o miejsca wiązania na plazmolemie. Jeżeli jednak związany materiał był poddawany sedymentacji w sacharozie nie zawierającej ^3H -NPA,

ilość związanej radioaktywności znacznie się obniżała, co świadczy o odwracalnym i prawdopodobnie niekowalentnym typie wiązania. Również morfaktyny, które są inhibitorami transportu auksyn, mogą w wysokich stężeniach współzawodniczyć o miejsce wiązania z $^3\text{H-NPA}$.

Odkrycia Hertel'a i wsp. [27] zostały potwierdzone w innych laboratoriach. Venis i Batt [35] zastosowali różnicowe wirowanie do badania wiązania $^{14}\text{C-NAA}$ do homogenatów siewek kukurydzy. Dwufazowy wykres Scatcharda wskazywał na dwa miejsca wiązania: pierwsze o $K_D = 1,5 \times 10^{-7}\text{M}$ i drugie o $K_D = 1,6 \times 10^{-6}\text{M}$. Stwierdzono ponadto, że IAA, 2,4,5-T i kwas benzoesowy były konkurencyjnymi inhibitorami pierwszego miejsca, natomiast jedynie aktywne auksyny współzawodniczyły o drugie miejsce wiązania.

Dalsze badania prowadzone w tym laboratorium [4] doprowadziły do odkrycia i częściowej charakteryzacji dwóch odrębnych klas miejsc wiązań. Preparaty plazmolemy wyizolowanej z koleoptyli kukurydzy badane były w przedziale stężeń ustalonym przez Hertel'a i wsp. [27], tj. 10^{-6} – 10^{-7}M . Analiza wykresu Scatcharda wykazała występowanie co najmniej dwóch grup miejsc o wysokim powinowactwie dla NAA ze stałą dysocjacji $1,8 \times 10^{-7}\text{M}$ (miejsce I) i $14,5 \times 10^{-7}\text{M}$ (miejsce II). Zastosowanie $^{14}\text{C-NAA}$ doprowadziło do wniosku, że miejsca wiązania grupy II wykazują wysoką specyficzność, zgodną z właściwościami oczekiwanymi dla receptorów. Jedynie aktywne auksyny, inhibitory transportu auksyn oraz antyauksyny mogły współzawodniczyć z NAA o te same miejsca wiązania. Natomiast grupa I wykazywała mniejszą specyficzność, ponieważ wiązała wszystkie badane związki, włącznie z nieaktywnymi analogami auksyn. Jednak wnioski wyciągnięte przez autorów na podstawie analizy wykresu Scatcharda spotkały się z zarzutem, że nie została uwzględniona nasycalność wiązania i możliwość występowania niespecyficznego miejsca wiązania, wobec czego dwufazowy wykres mógł być otrzymany nawet w sytuacji, kiedy badana była pojedyncza klasa miejsc wiążących. Następne doniesienia potwierdziły jednak obecność dwóch odrębnych klas wiązania auksyn [3].

Badania enzymatyczne, chemiczne, a także analiza w mikroskopie elektronowym, dostarczyły dowodów, że miejsca wiązania grupy II, tj. miejsca specyficznego wiązania auksyn, znajdują się we frakcji zawierającej plazmolemę. Natomiast miejsca grupy I zostały zlokalizowane na błonach Golgiego i siateczki śródplazmatycznej.

Badania prowadzone przez Ray'a i wsp. [52] skupiły się głównie na określeniu właściwości miejsc wiążących auksyny. Wykazano, że większość miejsc wiążących NAA znajduje się na błonach i należą one do jednej klasy o $K_D = 5\text{--}7 \times 10^{-7}\text{M}$. Wiązanie to okazało się odporne na wysokie stężenia soli jednowartościowych, co wskazywało na jonowy charakter interakcji. Badane wiązanie okazało się labilne w wyso-

kich temperaturach, a także ulegało niszczeniu pod wpływem czynników, które działają na białka i lipidy. Obserwowano także odwracalną interakcję wiązania pod wpływem dwuerytrytu (dithioerythriol). Zjawisko to było prawdopodobnie następstwem redukcji grup dwusiarczkowych ($-S-S-$), które mogą być obecne w miejscach wiązania i regulować jego funkcję.

1.1.2. Akceptory auksyn na siateczce śródplazmatycznej i tonoplaście. Lokalizacja miejsc wiązań grupy I na błonach Golgiego i grupy II na plazmolemie [3, 4] nie została potwierdzona przez Ray'a [54]. Eksperymenty z homogenatami koleoptyli kukurydzy wykazały, że miejsca odwracalnie wiążące NAA są głównie zlokalizowane na błonach, które ze względu na ich właściwości enzymatyczne zostały uznane za błony siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Możliwość lokalizacji tych miejsc na rybosomach została wykluczona, ponieważ po usunięciu tych struktur miejsca akceptorowe były nadal obecne na błonach. Natomiast miejsca wiązania NPA — inhibitora transportu auksyn — miały być rozmieszczone w odrębnych regionach, prawdopodobnie na plazmolemie. Jest więc prawdopodobne, że miejsca wiązania znajdujące się na siateczce śródplazmatycznej spełniają rolę fizjologicznych receptorów auksyn [54]. Taka asocjacja mogłaby indukować transport jonów ^+H z cytoplazmy do cystern siateczki śródplazmatycznej i wydzielania zawartych w nich białek na zewnątrz, poprzez system Golgiego. Możliwość wydzielania jonów wodoru indukowanego przez auksyny sugerowana była wcześniej [9, 10].

Wyniki uzyskane przez Dorhmana i wsp. potwierdziły wcześniejsze doniesienia [12, 54] wskazujące, że wiązanie ^{14}C -NAA następuje głównie w obszarze siateczki śródplazmatycznej; miejsca te — jako najlepiej poznane — nazwano miejscami grupy I. Autorzy ci ponadto określili subkomórkową lokalizację nowego typu wiązania, który charakteryzował się niskim powinowactwem do kwasu fenylooctowego. Ten typ miejsc wiązań został zakwalifikowany do grupy II. Fragmenty noszące miejsca grupy II nie były związane ani z siateczką śródplazmatyczną, ani z mitochondriami, jądrami lub plastydami. Gęstość, szybkość sedymentacji, a także zawartość kwaśnej fosfatazy, wskazywały na ich lokalizację na tonoplaście. Te dwie grupy receptorów były łatwe do odróżnienia, ponieważ jedynie miejsca grupy I były wrażliwe na dwuerytryt oraz czynnik SF („supernatant factor”). Autorzy zaznaczają, że specyficzność miejsc grupy II w stosunku do auksyn i ich analogów była podobna do specyficzności, jaką wykazywały miejsca grupy I badane w obecności czynnika SF.

Trzecią klasę miejsc wiążących auksyny zidentyfikowano we frakcji

wzbogaconej w plazmolemę. Miejsca te stanowiły receptory wiążące ^{14}C -2, 4-D, natomiast nie posiadały one zdolności wiązania NAA.

Badania oparte na różnicowym wirowaniu homogenatów hypokotyli dyni wykazały [29], że IAA nie posiadało zdolności wiązania się z błonami siateczki śródplazmatycznej. Natomiast przyjmując kwaśną fosfatazę jako enzymatyczny wyznacznik wakuol stwierdzono, że IAA nie wchodził także w interakcję z tonoplastem, zaś wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy wykazywało wiązanie tego hormonu z plazmolemą.

Lokalizacja miejsc wiążących IAA na plazmolemie, wykazana w homogenatach hypokotyli dyni, wykluczała możliwość ich identyczności z miejscami grupy I i II opisanymi w koleptylach kukurydzy. Z tego też względu określono je jako III grupę miejsc wiążących auksyny. Rozmieszczenie na plazmolemie, jak i specyficzny wpływ wywierany przez inhibitory transportu auksyn oraz NPA, sugerowały udział tych miejsc w polarnym transporcie auksyn. Przedstawiona hipoteza zakłada, że miejsca zlokalizowane na błonach siateczki śródplazmatycznej (I) i na tonoplaście (II) pośredniczą w procesie wydzielania jonów ^+H i warunkują odpowiedź wzrostową na działanie auksyn, natomiast miejsca grupy III pośredniczą w aktywnym transporcie auksyn i prawdopodobnie dają inną odpowiedź na hormon.

1.1.3. ATP-aza jako receptor auksyn. Wiele dowodów wskazywało, że auksyny mogą działać poprzez aktywację pompy ATP-azowo-protonej. Dla sprawdzenia tej hipotezy należało zbadać, czy auksyny wiążą się do plazmolemy zawierającej ATP-azę. Rzeczywiście stwierdzono [33], że tylko frakcje subkomórkowe zawierające plazmolemę wiążą ^{14}C -IAA (przy czym właściwość ta ulegała ograniczeniu przy wysokich stężeniach nieradioaktywnego IAA). O wysokim powinowactwie IAA do plazmolemy świadczy niezdolność wiązania przez nią analogów IAA (IPA, IBA). Obserwowane wiązanie IAA obniżało się ze zwiększeniem kwasowości od pH 8,0 do pH 5,0. Inne frakcje subkomórkowe wykazywały brak specyficzności wiązania ^{14}C -IAA. Stwierdzono ponadto, że frakcje wzbogacone w plazmolemę charakteryzowały się również aktywnością ATP-azy zależnej od Mg^{++} . Ponieważ aktywność tej ATP-azy wykryta została we frakcji plazmolemy specyficznie wiążącej ^{14}C -IAA, sugerowano, że miejscami wiązania hormonu mogą być cząsteczki enzymu. Możliwość taką wskazywały także wcześniejsze doniesienia Kasomo [32], który stwierdził, że uwolniona z plazmolemy działaniem deoksyholanu ATP-aza zależna od Mg^{++} może być aktywowana *in vitro* przez IAA. Stwierdzono ponadto [33], że frakcja plazmolemy otrzymana z hypokotyli traktowanych uprzednio IAA wiązała dwukrotnie więcej ^{14}C -IAA niż frakcja izolowana z tkanek kontrolnych. To zwiększenie zdolności wiązania ^{14}C -IAA tłumaczono konformacyjnymi

zmianami w cząsteczce enzymu w wyniku preinkubacji z nieradioaktywnym IAA.

Dla rozstrzygnięcia problemu, czy receptory auksyn związane są z cząsteczkami ATP-azy, Cross i wsp. [11, 12] zastosowali metodę pozwalającą na rozdzielenie miejsc wiązania auksyn od aktywności ATP-azy. Miejsca wiązania auksyn zlokalizowane na błonach komórkowych koleoptyli kukurydzy zostały całkowicie solubilizowane przez Triton X-100. Po takim traktowaniu pozostało w osadzie 70% aktywności ATP-azy zależnej od K^+ . Wykazano, że receptory solubilizowane pod wpływem Tritonu X-100 posiadają właściwości białka o masie cząsteczkowej 90 000, które jednak nie wykazywało aktywności ATP-azy. Natomiast aktywność tego enzymu związana była bądź z cząsteczkami bardzo dużymi, bądź znacznie mniejszymi od tych, które charakteryzowały się zdolnością wiązania auksyn. Na podstawie tych faktów autorzy wyklucają możliwość, aby receptorami auksyn mogły być cząsteczki ATP-azy.

Z przytoczonych danych wynika, że problem ATP-azy jako receptora auksyn należy obecnie uznać za nie rozstrzygnięty.

1.1.4. Izolowanie miejsc receptorowych. Dalsze badania miejsc wiązania auksyn były uwarunkowane otrzymaniem ich w stanie czystym, tj. wyizolowaniem z błon i oczyszczeniem preparatu.

Ekstrakcję miejsc receptorowych po raz pierwszy przeprowadzili Dorhman i Ray [16], wykorzystując niejonowy detergent Triton X-100. Następnie Venis [76] wyekstrahował je buforem z mikrosomów strąconych acetonem i oczyszczony ekstrakt frakcjonował na DEAE-Bio-żelu. Okazało się, że materiał wiążący auksyny był termolabilny, nie poddawał się dializie, wytrącał się 70% siarczanem amonu oraz wykazywał dodatnią reakcję Lowry'ego. Dane te pozwoliły sądzić, że miejsca wiążące auksyny mają charakter białkowy. Dokonano ponadto wstępnego rozdzielania białek będących receptorami zaliczanymi do grupy I i II.

Cross i Briggs [11] do solubilizacji białek wiążących auksyny zastosowali obie wspomniane metody. Miejsca receptorowe oceniali na podstawie chromatografii żelowej w obecności ^{14}C -NAA. Stwierdzili oni, że masa cząsteczkowa receptorów białkowych wynosiła 80 000 w pH 7,6, natomiast stała dysocjacji kompleksu NAA—białko równa była $4,6 \times 10^{-8}M$. Aktywność wiązania ulegała zahamowaniu pod wpływem trypsyny, pronazy i kwasu *para*-rtęciowobenzoesowego, a tylko nieznacznej redukcji w wyniku działania fosfolipazy C, DNA-azy i dwuerytrytu, co potwierdziło wcześniejsze sugestie, że wyizolowane cząsteczki były białkami. Fakt, że nasycony roztwór NAA ochraniał badane białko przed działaniem kwasu *para*-chlorortęciowobenzoesowego wskazywał, że po-

siada ono grupy siarkowodorowe w miejscach wiązania z hormonem. Wydaje się więc, że grupy —SH warunkują tworzenie tego wiązania. Aktywność miejsc receptorowych — jak wykazały wcześniejsze badania tych autorów [11, 12] — była tylko częściowo wrażliwa na pronazę, ulegała jednak całkowitej inaktywacji, kiedy działanie pronazy poprzedzone było preinkubacją z fosfolipazą C. Natomiast aktywność preparatów ekstrahowanych acetonem okazała się wrażliwa na trypsynę bez konieczności preinkubacji z fosfolipazą C [12]. Połączenie tych wyników pozwalało sądzić, że po usunięciu fosfolipidów odsłonięte zostają nowe miejsca dostępne dla trawienia enzymatycznego.

Wyekstrahowane białka o masie cząsteczkowej 80 000 [12] wykazały wysokie powinowactwo wobec NAA, natomiast powinowactwo wobec innych auksyn zbliżone było do wartości wcześniej określonej przez Ray'a [54] dla miejsc grupy I. Ponieważ procedura ekstrakcji powodowała równoczesną redukcję liczby miejsc wiążących auksyny, które w większości należały do grupy I, sugerowano, że rozpuszczone białka stanowiły aktywne cząsteczki grupy I.

Dokładniejszych informacji o pierwotnej lokalizacji wyizolowanych białek dostarczyły ostatnie badania tych autorów [13]. Zastosowanie wirowania w gradiencie gęstości sacharozy pozwoliło stwierdzić, że białka o wysokim powinowactwie do auksyn ekstrahowane z mikrosomów koleoptyli i pierwszych liści kukurydzy, były prawdopodobnie związane z błonami siateczki śródplazmatycznej. Lokalizacja taka została przyjęta na podstawie obecności w preparacie enzymatycznych wyznaczników tych struktur. Potwierdziło to wcześniejsze sugestie [12], że wyekstrahowane białka należą do I grupy miejsc receptorowych auksyn.

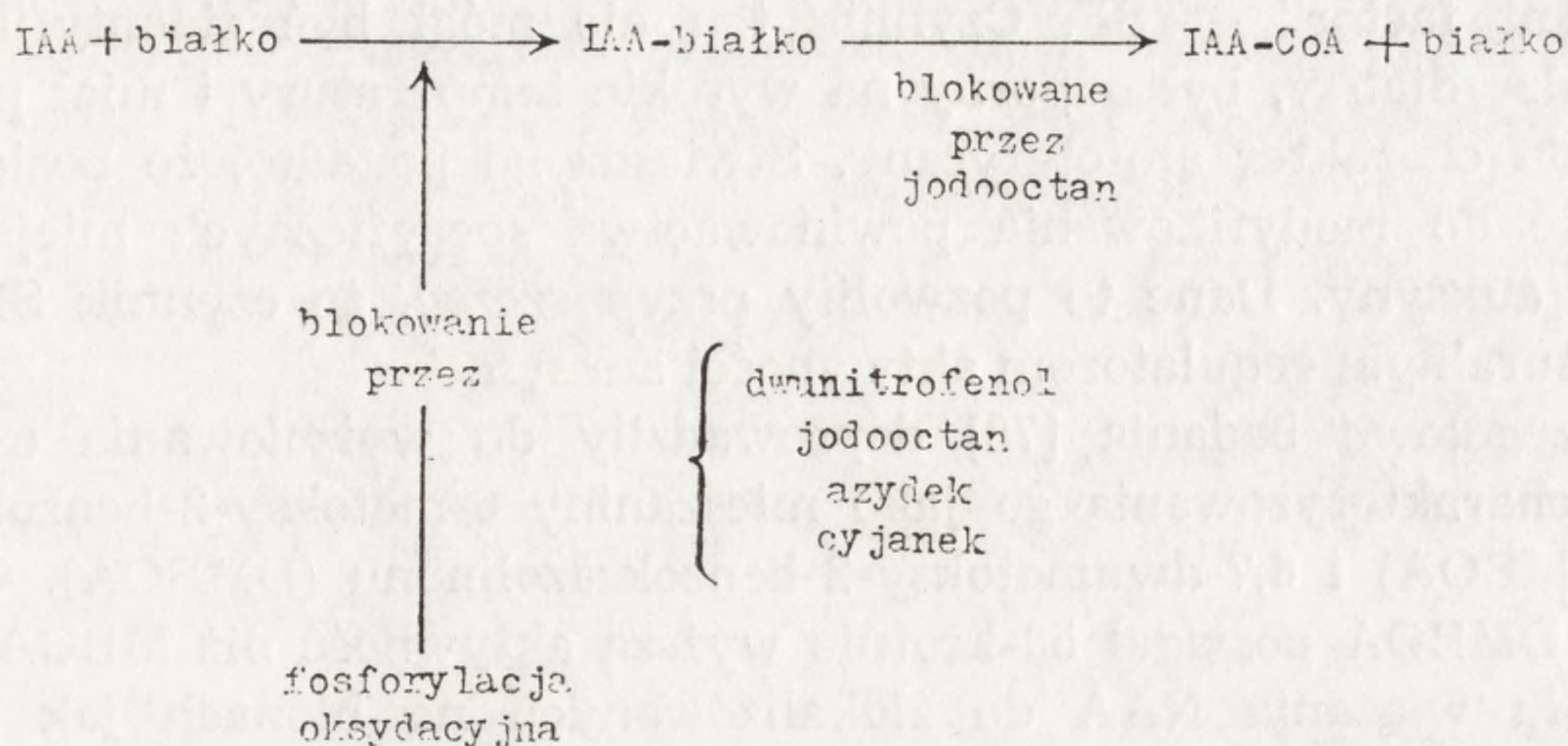
1.2. CYTOPLAZMATYCZNE RECEPTORY AUKSYN

Badania prowadzone nad receptorami auksyn przyniosły także szereg informacji o występowaniu „rozpuszczalnych” miejsc wiążących auksyny, tj. nie związanych z żadnymi strukturami komórkowymi.

W 1953 r. Siegel i Galston [58] opisali cytoplazmatyczne białka, które miały zdolność wiązania IAA. Tworzenie kompleksu hormon—białko było procesem endoergicznym, zachodzącym w obecności ATP. Autorzy zaproponowali następujący mechanizm tworzenia i rozpadu kompleksu IAA—białko (ryc. 1).

Wiązanie auksyn z receptorami znajdującymi się na plazmolemie wydaje się stanowić pierwszy etap ich transportu do komórki. Doświadczenia Hardina i wsp. [26] oraz Lichołata i wsp. [39, 40] wskazują, że receptory wraz z cząsteczkami auksyn mogą być uwalniane z plazmolemy do cytoplazmy. Nie jest dotąd dostatecznie wyjaśnione, czy receptory znajdujące się w rozpuszczalnej frakcji cytoplazmy pochodzą z plazmolemy, czy też są strukturami odrębnymi [1, 82].

Obecność miejsc wiążących auksyny nie związanych z błonami wykazano także we frakcji cytoplazmy komórek tytoniu [50]. Receptory te posiadały wysoką stałą asocjacji ($10^8 M^{-1}$), wobec czego przypuszczano, że ich wiązanie z IAA może charakteryzować się wysoką specyficz-



Ryc. 1. Mechanizm tworzenia i rozpadu kompleksu IAA—białko (Siegel i Galston) [58]

nością. Wykazano ponadto, że receptory o takiej samej stałej asocjacji występowały w cytoplazmie komórek tytoniu w hodowli *in vitro* w środowisku zawierającym IAA. Autorzy sugerowali, że takie nie związane z błonami receptory mogły uchodzić uwagi badaczy głównie z tych powodów, że nie zawsze badana była kinetyka nasycenia, a ponadto stosowane zwykle stężenia auksyn (10^{-7}) stanowiły koncentrację, przy której receptory były prawdopodobnie już całkowicie wysyczone i z tego względu mogły być uznane za niespecyficzne.

„Rozpuszczalne” białka wiążące IAA występujące w cytoplazmie komórek liścieni soi zostały wyizolowane i scharakteryzowane przez Ihl [28]. Traktowanie enzymami proteolitycznymi potwierdziło wcześniejsze sugestie co do białkowej natury tego związku, którego masa cząsteczkowa była rzędu 50 000. Wysoka temperatura powodowała obniżenie ilości wiązanego hormonu, co wskazywało, że wiążący go czynnik był termolabilny. Związki o zbliżonej budowie chemicznej i różnej aktywności auksynowej, jak: IAA, NAA, IBA i PAA współzawodniczyły o miejsca wiązania. Na tej podstawie autorka zakłada, że ten cytoplazmatyczny receptor posiada szeroki zakres specyficzności w stosunku do cząsteczek o zbliżonej budowie chemicznej.

Sugerowana lokalizacja „rozpuszczalnych” receptorów w cytoplazmie wykluczałaby raczej ich udział w szybkiej odpowiedzi na działanie hormonu, ale może wskazywać na ich pośrednictwo w przenoszeniu hormonu z cytoplazmy do jądra (por. 1.5.3, str. 82).

1.3. CZYNNIK MODYFIKUJĄCY AKTYWNOŚĆ RECEPTORÓW AUKSYN

Aktywność miejsc receptorowych wiążących auksyny może ulegać modyfikacji pod wpływem naturalnie występującego czynnika. Ray i wsp. [52] znaleźli we frakcji płynu nadosadowego otrzymanego z koleoptyli kukurydzy czynnik organiczny, nazwany przez autorów „supernatant factor” — SF. Czynnik ten nie mógł być zidentyfikowany na drodze dializy, był odporny na wysokie temperatury i miał prawdopodobnie charakter amfoteryczny. Stwierdzono ponadto, że posiadał on zdolność do modyfikowania powinowactwa specyficznych miejsc wiążących auksyny. Dane te pozwoliły przypuszczać, że czynnik SF może być naturalnym regulatorem aktywności auksyn.

Szczegółowe badania [78] doprowadziły do wyizolowania czynnika SF i scharakteryzowania go jako mieszaniny 6-metoksy-2-benzoksazolinonu (MBOA) i 6,7-dwumetoksy-2-benzoksazolinonu (DMBOA). Okazało się, że DMBOA posiadał 50-krotnie wyższą aktywność niż MBOA w hamowaniu wiązania NAA do zlokalizowanych na błonach jak i „rozpuszczalnych” receptorów. Aktywność tych związków w hamowaniu wiązania auksyn była skorelowana z ich zdolnością do hamowania wzrostu indukowanego przez auksyny. Autorzy uważają, że czynnik SF nie może odgrywać przypisywanej mu przez Ray'a i wsp. [52] roli regulatora aktywności auksyn, ponieważ występowanie prekursorów benzoksazolinonu ograniczone jest tylko do nielicznych gatunków roślin.

Dalszych informacji o strukturze i sposobie działania czynnika SF dostarczyły ostatnie badania [13] wykazujące, że czynnik SF hamuje wiązanie NAA zarówno do miejsc wiązań zlokalizowanych na błonach, jak i do „rozpuszczalnych” miejsc receptorowych. Autorzy sugerowali, że miejsca, których aktywność wiązania NAA obniża się pod wpływem czynnika zawartego w płynie nadosadowym, należy zaliczyć do I grupy miejsc wiązań. Inhibitorowe działanie tego czynnika polega prawdopodobnie na konkurencyjnym wiązaniu do miejsc grupy I.

Ponieważ czynnik SF działał w największym stopniu na wiązanie syntetycznych analogów auksyn i tylko nieznacznie wpływał na wiązanie IAA, nasuwają się wątpliwości, czy czynnik ten może spełniać przypisywaną mu rolę regulatora aktywności auksyn.

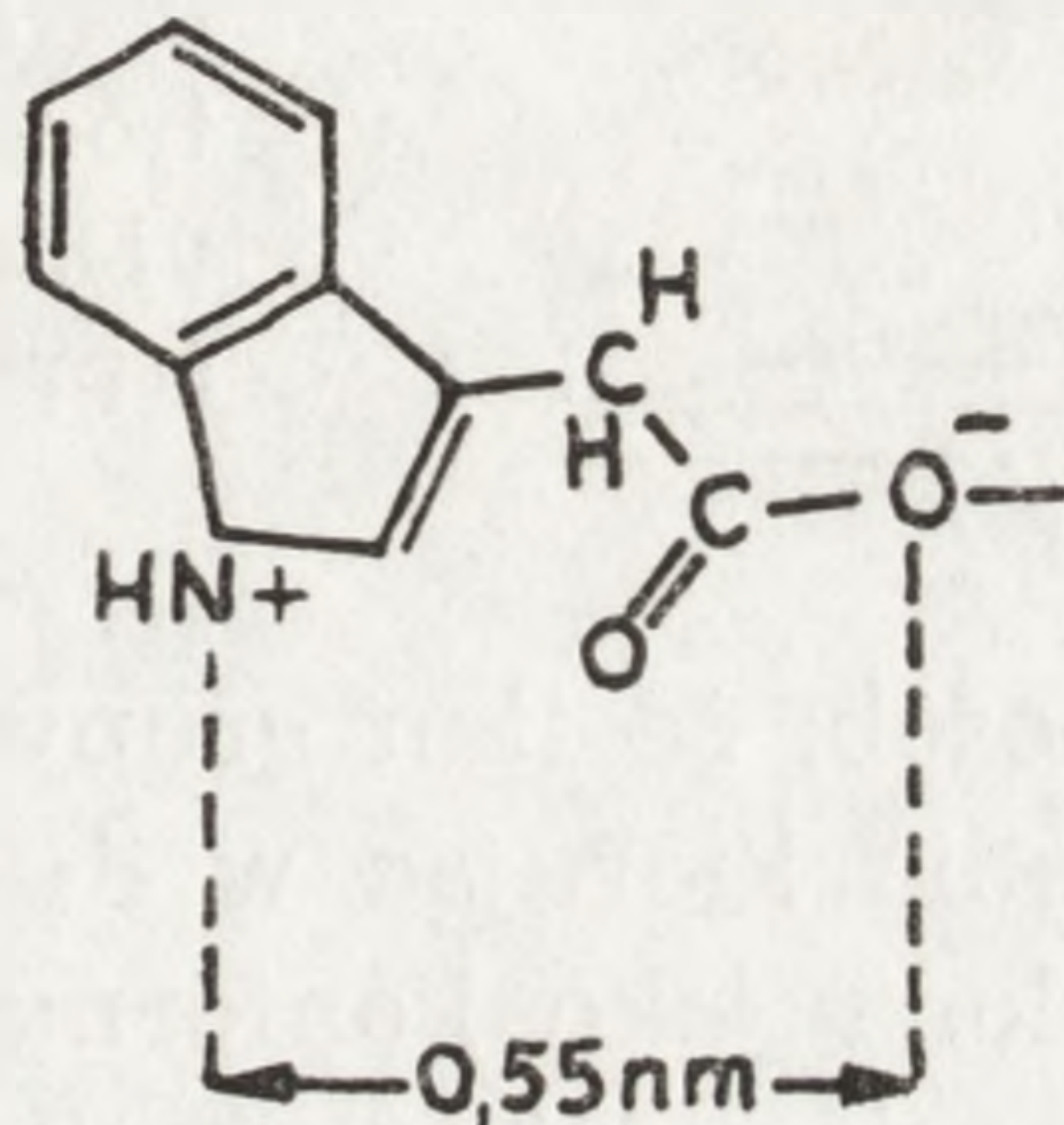
Czynnik SF hamujący wiązanie NAA jest szczególnie aktywny w tkankach kukurydzy. Obecność jego stwierdzono również u wszystkich zbadanych pod tym względem gatunków [13].

1.4. STRUKTURALNE WŁAŚCIWOŚCI MIEJSC RECEPTOROWYCH AUKSYN

Współczesne koncepcje zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu działania auksyn uwzględniają następujące właściwości cząsteczek hormonu: chemiczne zdolności do tworzenia wiązania z miejscami recepto-

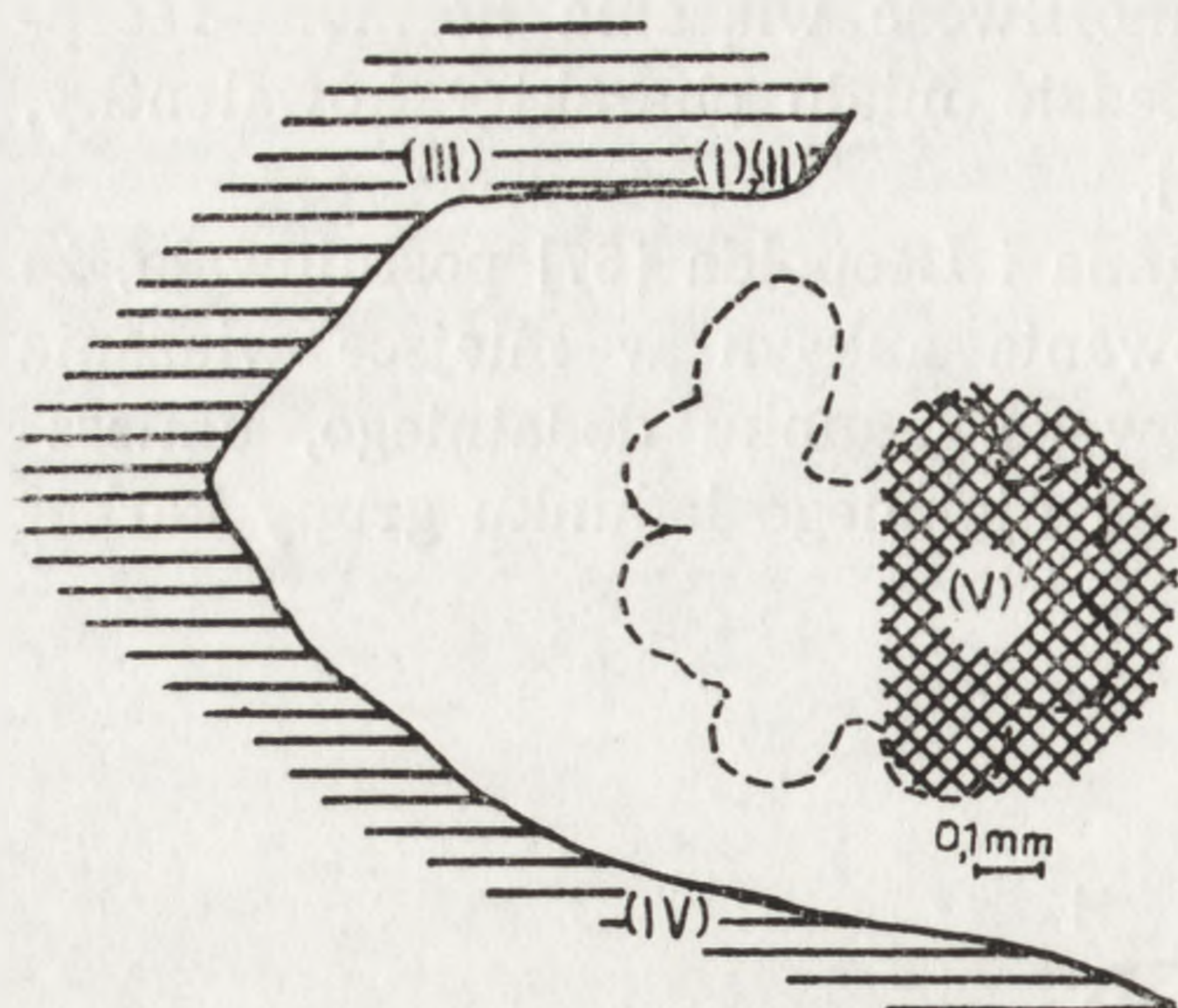
rowymi, właściwości warunkujące możliwość wiązania hormon—receptor i decydujące czy wiązanie to będzie miało charakter kowalentny, oraz właściwości stereochemiczne [77].

Teoria separacji ładunków Thimanna i Leopolda [67] postulowała, że warunkiem koniecznym dla wbudowania auksyn w miejsce wiązania jest obecność w pierścieniu cząstkowego ładunku dodatniego, umieszczonego w odległości około 0,55 nm od ujemnego ładunku grupy karboksylowej (ryc. 2).



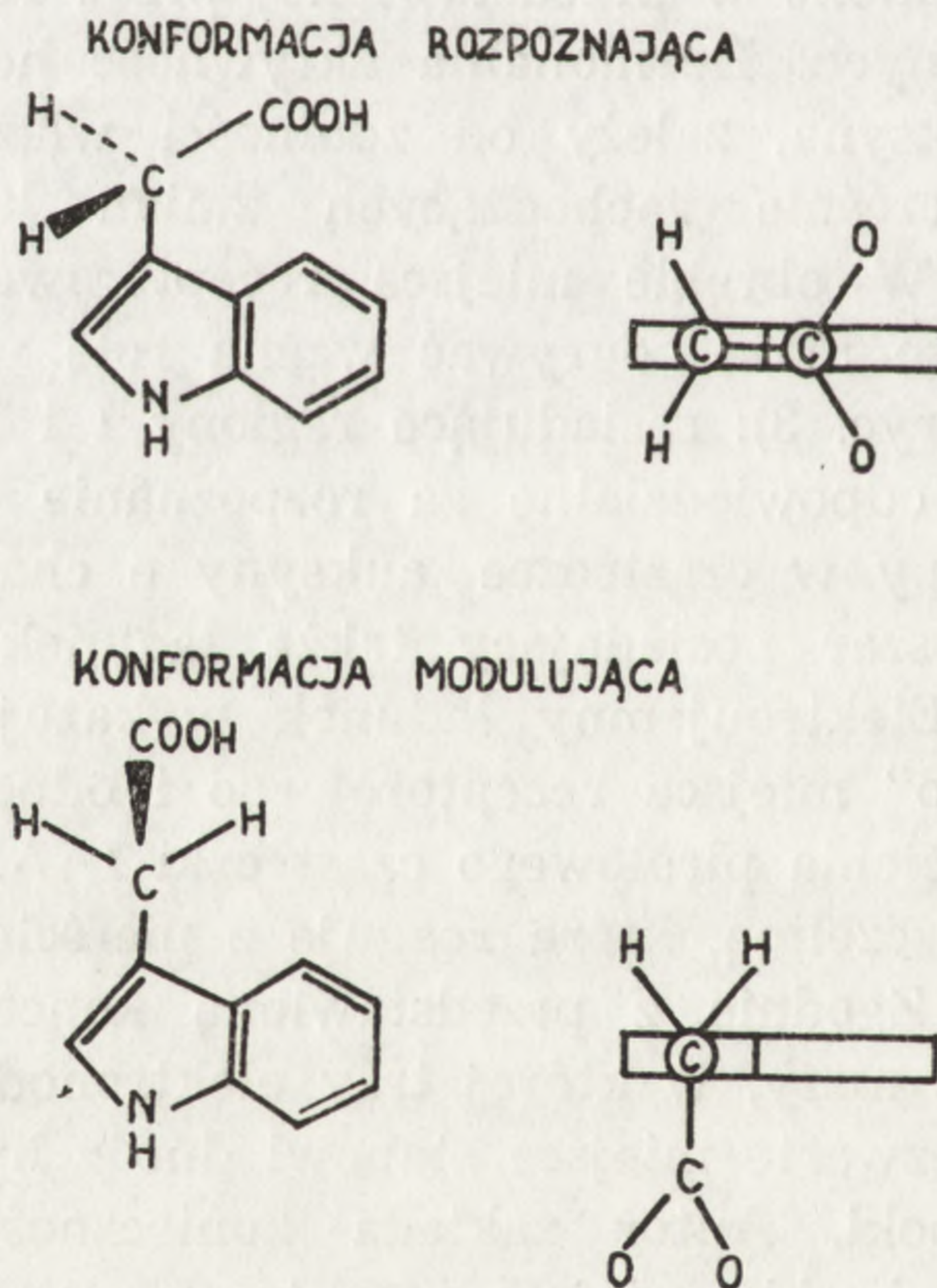
Ryc. 2. Rozmieszczenie ładunków w cząsteczce IAA (Thimann i Leopold [67])

Zależności między strukturą cząsteczki i jej hormonalną aktywnością zostały uwzględnione w przedstawionej przez Kaethnera [31] teorii zmian konformacyjnych. Hormonalna aktywność heterogennego związku, jakim jest auksyna, zależy od zdolności wiązania ligandów pod warunkiem równocześnie zachodzących zmian konformacyjnych w miejscu wiązania. W obrębie miejsca receptorowego autor wyróżnił pięć regionów, które mają odgrywać ważną rolę w procesie wiązania cząsteczki auksyn (ryc. 3): sąsiadujące regiony I i II stanowią obszary elektronododatnie, odpowiedzialne za rozpoznanie grupy karboksylowej lub innej grupy w cząsteczce auksyny o charakterze kwaśnym. Nieco oddalony obszar posiadający także ładunek dodatni określono jako miejsce III. Elektroujemny ładunek wykazuje natomiast region IV stanowiący „dno” miejsca receptorowego i odpowiedzialny za wiązanie wodoru pierścienia pirolowego cząsteczki IAA. Miejsce V, z kolei jest hydrofobową szczeliną, która reaguje z pierścieniem benzoowym indolowego jądra. Zgodnie z przedstawioną koncepcją miejsce receptorowe ma kształt niszy, w której trzy elektronododatnie grupy tworzą rodzaj okapu, czwarte miejsce stanowi dno z hydrofobowym regionem tworzącym boki. Autor zakłada konieczność konformacyjnych zmian zarówno w obrębie miejsca receptorowego, jak i oddziaływającej z nim cząsteczki hormonu. Połączenie elektrododatnich regionów z bocznym łańcuchem cząsteczki IAA zachodzi — zgodnie z przedsta-



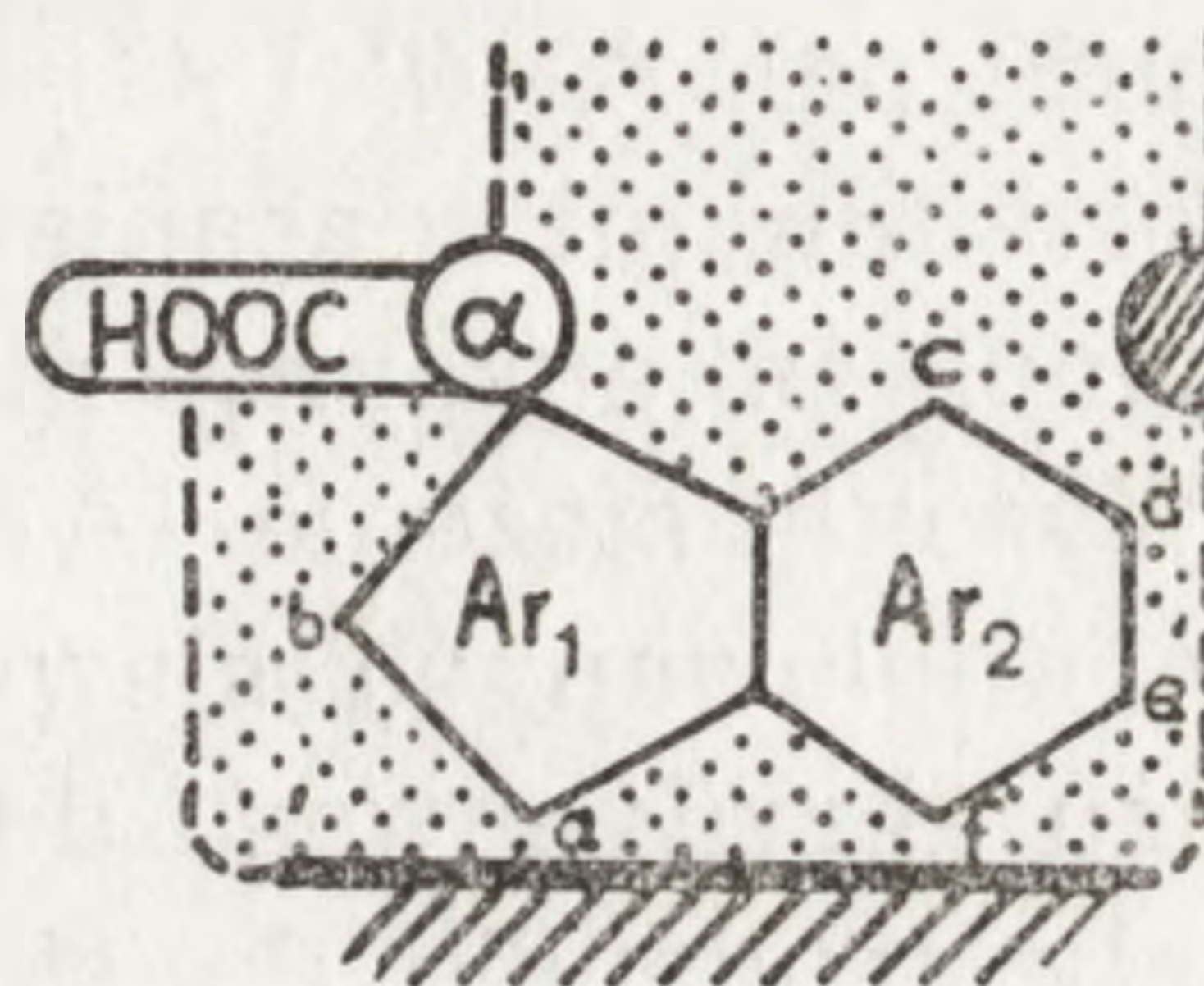
Ryc. 3. Poprzeczny przekrój przez proponowane miejsce receptorowe dla IAA. I, II, III — regiony elektrododatnie, IV — region elektroujemny. Zakreskowany region V reprezentuje przestrzeń hydrofobową (Kaethner [31])

wioną teorią — w taki sposób, że tlen grupy karboksylowej leży w poprzek płaszczyzny pierścienia kierując w drugą stronę wodór węgla 4. Taka forma została określona jako konformacja rozpoznająca (recognition conformation). Następnie zachodzą równoczesne zmiany konformacji w cząsteczce receptora i związanej z nim cząsteczce hormonu. W wyniku tych zmian grupa karboksylowa i boczny łańcuch IAA przyjmują pozycję prostopadłą do płaszczyzny pierścienia indolowego

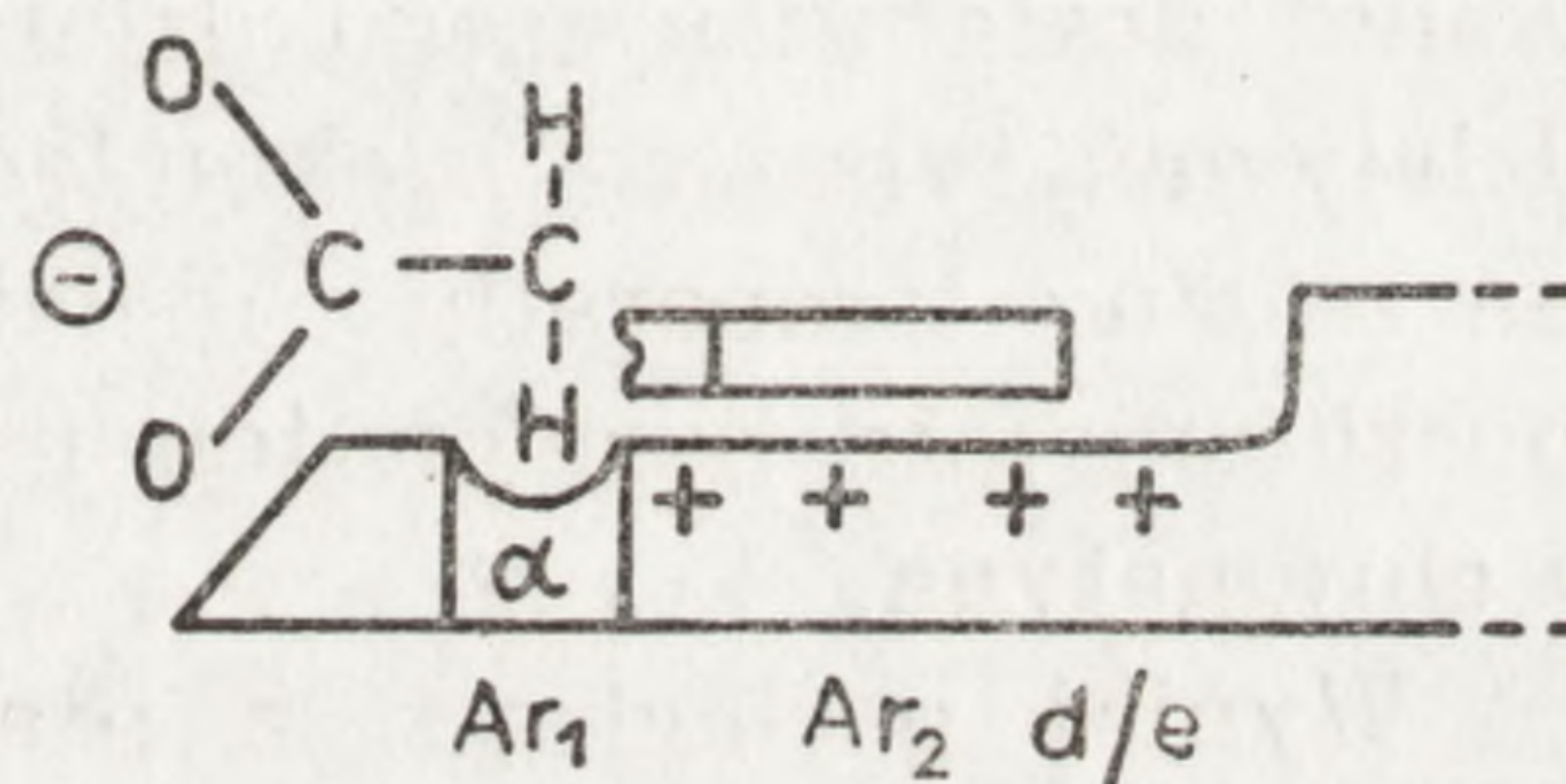


Ryc. 4. Konformacja „rozpoznająca” i „modulująca” w cząsteczce IAA sugerowana w teorii zmian konformacyjnych (Kaethner [31])

w taki sposób, że atomy tlenu grupy karboksylowej ustawiają się w tej samej płaszczyźnie. Taka forma została nazwana konformacją modulującą (modulation conformation). Proponowane rozpoznająca i modulująca konformacje są przedstawione na ryc. 4. Autor sugeruje, że zdolność do wymienionych zmian konformacyjnych warunkuje aktywność hormonalną rozpoznawaną przez miejsce receptorowe.



Ryc. 5. Miejsce receptorowe auksyn. Ar₁ — obszar odpowiadający części pirolowej, Ar₂ — obszar odpowiadający części benzoesowej, c-d — przestrzeń odpowiadająca grupie metylowej, a-f — przestrzeń sąsiadująca (Katekar [34])



MIEJSCE RECEPTOROWE AUKSYN

Strukturalne wymagania w stosunku do miejsc receptorowych auksyn rozważane były także przez Katekara [34]. Miejsce receptorowe o charakterystycznej konformacji i warunkach stereochemicznych muszą być komplementarne do najbardziej aktywnej formy cząsteczki kwasu indoliloctowego. Autor proponuje model miejsca receptorowego, w którym przestrzeń wiążąca pierścień indolowy wykazuje elektrofilny charakter i obejmuje obszar znacznie wykraczający poza pierścień indolowy (ryc. 5). Przestrzeń ta jest rozdzielona na odcinek odpowiadający części pirolowej, który oznaczony jest jako Ar₁ oraz odpowiadający części benzoesowej — oznaczony jako Ar₂. Przestrzeń sąsiadująca oznaczona jest a—f. Fragment cząsteczki IAA odpowiadający grupie węgla grupy metylowej wchodzi w interakcję z przestrzenią α , natomiast pozostała część określona jest jako akceptor karboksylowy.

1.5. JĄDROWE RECEPTORY AUKSYN

Wpływ hormonów roślinnych na metabolizm kwasów nukleinowych został po raz pierwszy wykazany przez Silberga i Skooga [59]. Następne lata przyniosły ogromną liczbę faktów świadczących o wpływie auksyn zarówno na rodzaj, jak i ilość syntetyzowanego RNA. Badania tego rodzaju spowodowały powszechne przyjęcie poglądu o działaniu auksyn na poziomie aparatu genetycznego.

1.5.1. Interakcje auksyn z DNA. Prace Fellenberga [18–22] sugerowały, że auksyny mogą wchodzić w bezpośrednią interakcję z DNA; wyniki te jednak zostały zakwestionowane przez innych autorów.

Wiązanie syntetycznych auksyn 2,4-D i NAA do nukleoprotein izolowanych z epikotyli grochu powodowało obniżenie temperatury denaturacji nukleoprotein [18]. Obserwowano także specyficzny wpływ IAA na stabilność par A—T i G—C. W pH powyżej 7 IAA połączone było z DNA niestabilnymi wiązaniami wodorowymi.

Wykazano, że auksyny mogą zmieniać niektóre właściwości chromatyny. Wysokie stężenia IAA powodowały dysocjację chromatyny izolowanej z etiolowanych siewek grochu oraz zwiększenie ilości wiązanego oranżu akrydynowego do DNA [21]. Natomiast niskie stężenia hormonu miały tendencję do stabilizacji wiązania DNA—białko w chromatynie. Nigdy nie obserwowano w regionach chromatyny skondensowanej destabilizującego działania IAA, co sugeruje, że IAA może oddziaływać tylko ze zdecondensowaną frakcją chromatyny. Obserwowane zmiany temperatury denaturacji pod wpływem IAA nasunęły przypuszczenie, że hormon ten ma więcej niż jedno miejsce oddziaływania z chromatyną.

Wyniki pochodzące z pracowni Fellenberga potwierdzone zostały przez Bambergera [35], że auksyny powodowały obniżenie temperatury denaturacji DNA grochu i grasicy.

Wpływ otoczki jądrowej na interakcję IAA z izolowaną chromatyną stanowił przedmiot następnych badań tego autora [22]. Chromatyna pozbawiona pozostałości błon jądrowych wykazywała zmienione właściwości wobec IAA. Znaczna decondensacja chromatyny pod wpływem IAA była całkowicie hamowana w obecności fragmentów otoczki jądrowej. Dane te pozwoliły sądzić, że otoczka jądrowa stanowi barierę hamującą działanie IAA na chromatynę.

Inne badania jednakże wykazały, że obniżenie temperatury denaturacji nukleoprotein w obecności auksyn mogło być spowodowane bądź przez dysocjację histonów od DNA w 1 M NaCl, bądź przez zmianę pH roztworu [60].

1.5.2. Interakcje auksyn z RNA. Badania lat 60-tych przyniosły dane wskazujące, że auksyny wywierają działanie poprzez asocjację z RNA [35]. Późniejsze badania wskazują na brak dowodów, które by bezspornie świadczyły o istnieniu bezpośredniej interakcji auksyn z kwasami rybonukleinowymi [15, 83].

1.5.3. Wiązanie auksyn z izolowanymi jądrami. Działanie auksyn na metabolizm kwasów nukleinowych wskazywało na zaangażowanie jądra w odpowiedzi hormonalnej. Spowodowało to podjęcie wielu udanych

prób dla wykazania wiązania auksyn z jądrami izolowanymi [35]. Kiedy jądra grochu poddano inkubacji z różnymi stężeniami ^{14}C -IAA i w różnym czasie, okazało się, że przemieszczanie się ^{14}C -IAA do jąder następuje bardzo szybko i osiąga maksymalny poziom po 60 s inkubacji [66].

Zdolność wiązania ^{14}C -IAA przez frakcję jąder izolowanych była badana także w naszej pracowni. Jądra izolowane z merystemów korzeniowych, a także całe siewki sosny, poddano 2-godzinnej inkubacji z ^{14}C -IAA. W autoradiogramach ze skrawków półciemnych porównywano radioaktywność zlokalizowaną nad jądrami izolowanymi i jądrami *in situ* i wykazano, że jądra izolowane wiążą znacznie mniej ^{14}C -IAA. Pozwala to sądzić, że migracja IAA do jądra komórkowego uwarunkowana jest obecnością związków zawartych w cytoplazmie, które utraczone zostają podczas procesu izolacji. Nie obserwowano nagromadzenia radioaktywności nad błoną jądrową (ryc. 6).

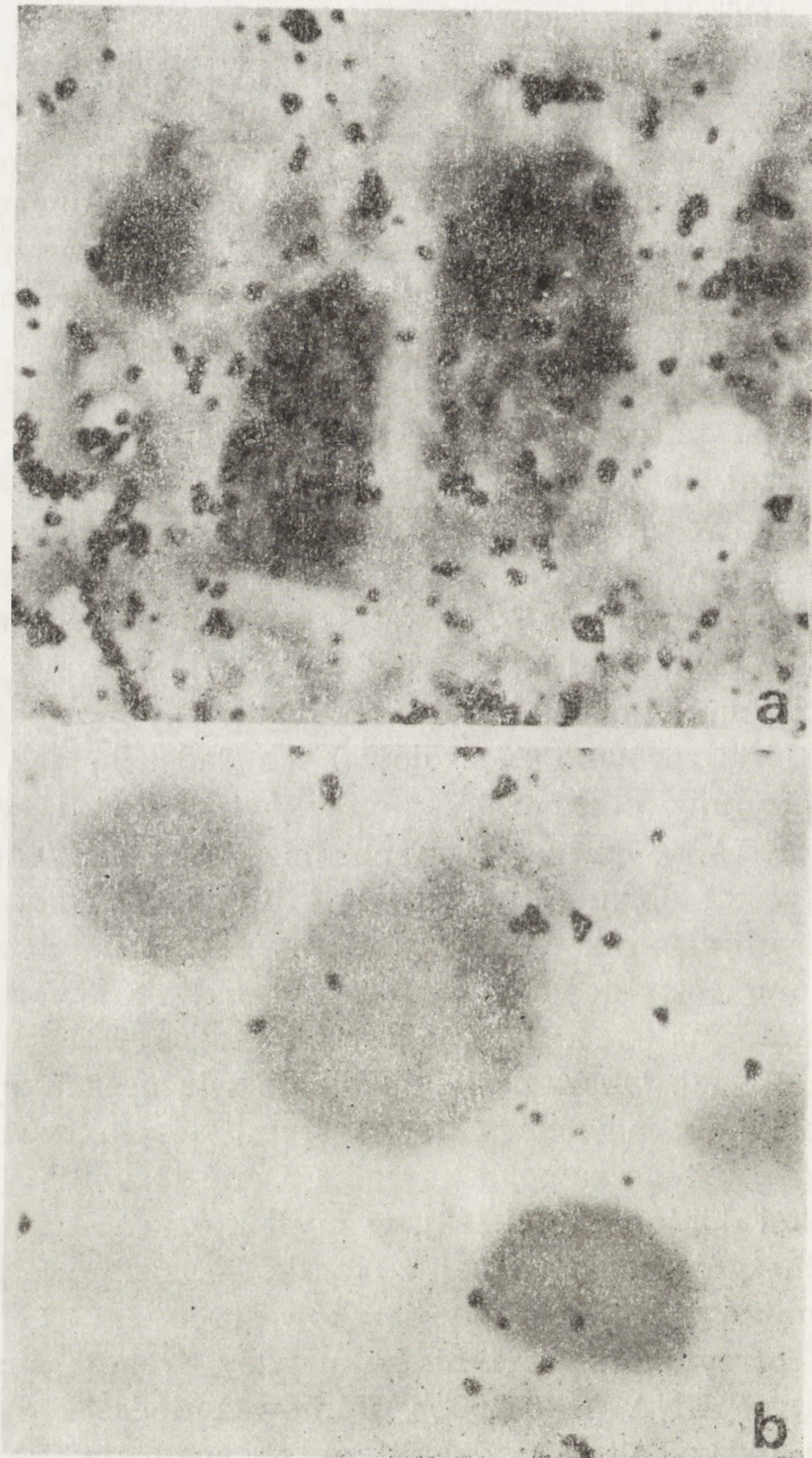
Wiele prób podjęto także dla zbadania, czy izolowane jądra zdolne są do zwiększania syntezy RNA w odpowiedzi na podanie auksyn. Matthysse [41] wykazał, że zwiększanie syntezy RNA następowało pod wpływem auksyn tylko w przypadku, jeżeli jądra izolowane były w obecności hormonu. Autor ten sugeruje, że brak hormonu podczas otrzymywania frakcji jądrowej powoduje utratę substancji pośredniczącej w jego działaniu. Dalsze badania [42] dowiodły, że tym czynnikiem pośredniczącym jest białko, w obecności którego auksyny powodują zwiększenie syntezy RNA, zarówno w izolowanych jądrami, jak i izolowanej chromatynie. Czynniki pochodzący z pączków grochu i tytoniu stymulowały syntezę RNA w preparatach chromatyny izolowanej z pączków grochu, jeżeli został dodany IAA, 2,4-D lub 2,4,5-T. Natomiast w obecności antyauksyn czynnik białkowy był nieaktywny. Żadnego efektu nie obserwowano też, kiedy jako wzorzec był stosowany DNA.

Kompleks auksyna—receptor białkowy został wyizolowany z pączków i korzeni grochu [43]. Okazało się, że białko wiążące auksynę było specyficzne dla narządu: powodowało ono stymulację aktywności chromatyny pochodzącej z tego samego narządu. Dane te wydają się sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami [42], w myśl których stymulacja syntezy RNA w chromatynie pochodzącej z pączków grochu jest wyższa pod wpływem czynnika pochodzącego z pączków grochu.

Venis [75] otrzymał z korzeni kukurydzy frakcję białkową, która wzmacniała syntezę RNA o 40-200%. Ponieważ dodatek auksyn nie był konieczny dla aktywacji tej frakcji, autor sugeruje, że metoda preparatywna (przejście białek przez kolumnę związaną z 2,4-D) może być wystarczającym warunkiem dla zmiany czynnika na formę aktywną, która nie wymaga dalszego kontaktu z auksynami. Próby wykrycia wią-

zania auksyn do tych frakcji przez równoważną dializę nie przyniosły jednak rezultatów.

Hardin i wsp. [25] wyizolowali z liścieni soi czynniki, które wzmacniały syntezę RNA w chromatynie. Jeden z nich, o wysokim ciężarze cząsteczkowym, stymulował endogenną polimerazę RNA, podczas gdy drugi, o niskiej masie cząsteczkowej, działał stymulująco na polime-



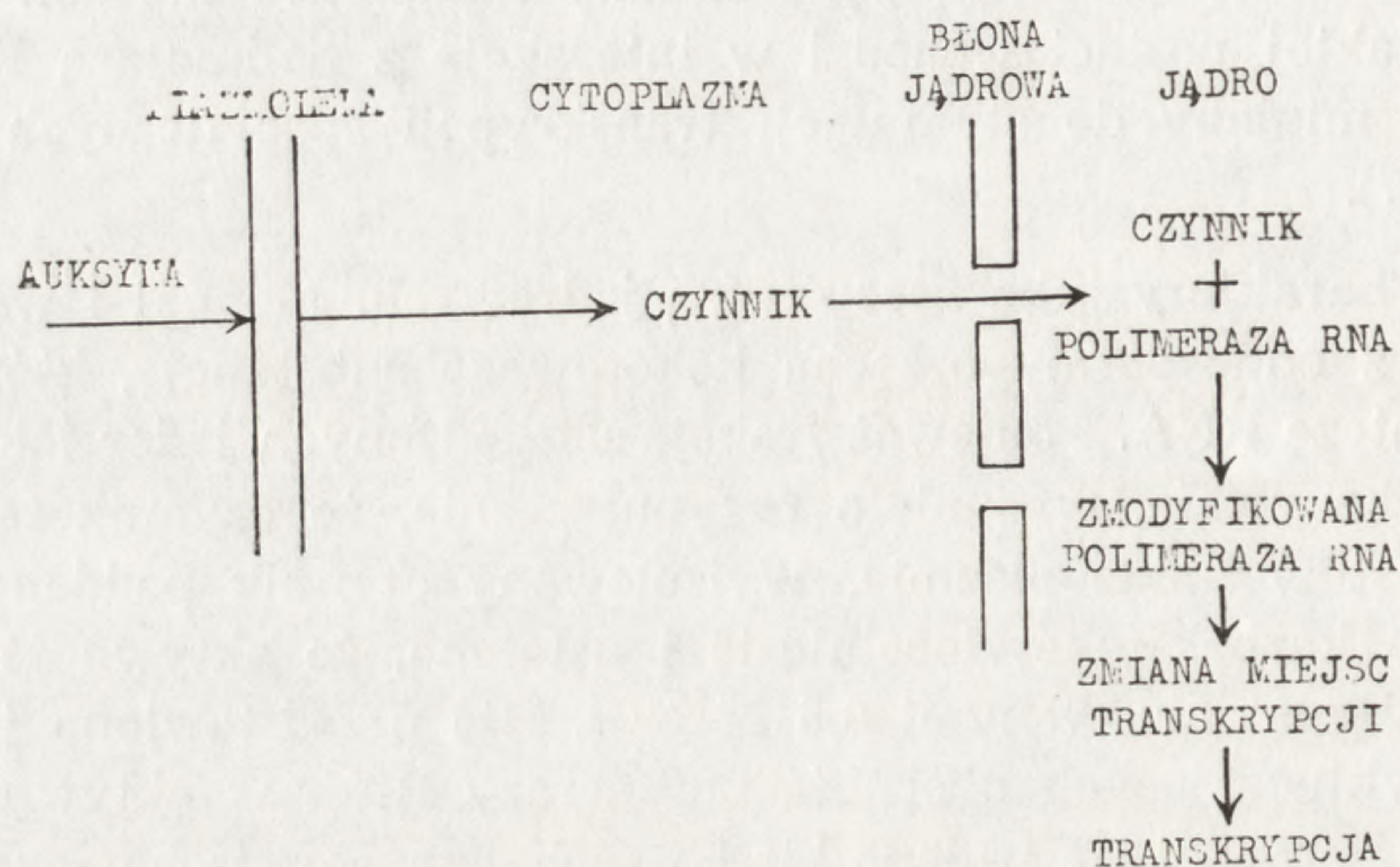
Ryc. 6. ^{14}C -IAA w jądrach korzenia *Pinus silvestris*, preparaty półcienkie, pow. 2000 \times ; a — jądra korzeni inkubowanych z ^{14}C -IAA *in vivo*, b — izolowane jądra korzeni inkubowane z ^{14}C -IAA *in vitro*

razę *E. coli*. Autorzy przypuszczają, że frakcja o niskiej masie cząsteczkowej jest odpowiednikiem hormonalnego pośrednika opisanego przez Matthyse i Philipa [42]. Zaproponowano hipotezę (Hardin i wsp. [25]) zgodnie z którą auksyny oddziaływając z cząsteczką receptora mogą być przenoszone z cytoplazmy do jądra. Przenikanie przez otoczkę jądrową może powodować konformacyjne zmiany kompleksu hormon—receptor, który w takiej postaci wchodzi w interakcję z polimerazą RNA. Prowadzić to miałyby do stymulacji transkrypcji specyficznych grup genów (ryc. 7).

1.5.4. Charakterystyka receptorów jądrowych. Mondal i wsp. [45-48] otrzymali z endospermy orzecha kokosowego substancję, która stymulowała syntezę RNA. Ponieważ frakcja uszkodzonych jąder takiego efektu nie wykazywała, wysunięto przypuszczenie, że czynnik ten zlokalizowany jest w nukleoplazmie. Wyizolowany czynnik poddano chromatografii na karboksymetylocelulozie i ustalono, że aktywność związana była z białkami eluowanymi 0,5 M KCl. Nie przedstawiono jednak dowodów wykluczających obecność polimerazy RNA w aktywnej frakcji. Autorzy sugerowali, że badane białko zachowywało się homogennie podczas elektroforezy na żelu poliakrylamidowym, natomiast na przedstawionej przez nich fotografii żelu można dostrzec co najmniej trzy pasma. Eksperymenty wykazujące specyficzność wiązania auksyn z czynnikiem białkowym nie zostały przeprowadzone. Obserwowane zwiększenie syntezy RNA mogło być wynikiem intensywniejszej transkrypcji zachodzącej w obecności kompleksu IAA—białko akceptorowe lub tworzenia nowego rodzaju RNA. Analiza produktów transkrypcji na żelu poliakrylamidowym wykazała, że w obecności tego kompleksu pojawiają się dwa nowe pasma. Hybrydyzacja RNA-DNA potwierdziła, że kompleks IAA—akceptor białkowy indukuje syntezę nowego rodzaju RNA.

Badania prowadzone przez Biswasa i wsp. potwierdziły występowanie w endospermie orzecha kokosowego białek receptorowych dla IAA, które opisano jako „nukleoplazmatyczny receptor białkowy IAA” — n-IRP. W homogennym układzie zawierającym DNA orzecha kokosowego, nukleoplazmatyczną polimerazę RNA i czynnik białkowy, synteza RNA była podwajana przez n-IRP pod warunkiem, że obecny był 1 μ M IAA. Stwierdzono, że to zwiększenie syntezy wynikało ze zwiększonej częstotliwości inicjacji łańcucha RNA. Hybrydyzacja i elektroforeza na żelu poliakrylamidowym produktów reakcji dowiodły, że w procesie stymulowanym przez n-IRP syntetyzowany był nowy rodzaj RNA. Wykazano, że nukleoplazmatyczny receptor białkowy jest prawdopodobnie pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej 94 000. Zastosowanie równoważnej dializy pozwoliło stwierdzić, że ba-

dany receptor wiązał się z IAA i 2,4-D, natomiast nie wchodził w interakcję z nieaktywnymi analogami jak kwas benzoesowy. Stała dysocjacji kompleksu IAA—receptor nukleoplazmatyczny wynosiła $7,5 \times 10^{-6}$. Szczegółowe badania liczby miejsc wiązań wykazały 0,5 miejsca na mol białka, co sugerowało konieczność wiązania dwóch cząsteczek



Ryc. 7. Schemat obrazujący mechanizm działania auksyn (Hardin [25])

n-IRP z jedną cząsteczką IAA. Jest także prawdopodobne, że obserwowana liczba miejsc receptorowych w cząsteczkach n-IRP nie odzwierciedla rzeczywistego obrazu, ponieważ pewna ich część mogła ulec inaktywacji podczas procesu oczyszczania.

Dalsze badania prowadzone w tym laboratorium [56] dostarczyły charakterystyki następnego receptora białkowego IAA, który został nazwany „chromosomowym receptorem białkowym IAA” — c-IRP. Związek ten, podobnie jak poprzednio opisany n-IRP, został wyizolowany z endospermy orzecha kokosowego. Analiza Scatcharda wykazała, że to niehistonowe białko posiada dwa typy miejsc wiążących IAA. Miejsca te charakteryzowały się różną zdolnością do nasycania. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym pozwoliła określić masę cząsteczkową chromosomowego receptora białkowego, która wynosiła dla pojedynczej podjednostki 70 000.

Izolowany kompleks ^{14}C -IAA-nukleoplazmatyczny receptor białkowy posiadał zdolność wiązania się z chromatyną izolowaną z endospermy orzecha kokosowego. Interakcja taka powodowała dwukrotny wzrost transkrypcji 9-12 S RNA. Zjawisko takie nie następowało w przypadku, kiedy chromatyna pochodziła z erytrocytów kurzych.

W podsumowaniu swych badań autorzy zaproponowali następujący schemat działania obu receptorów: miejsca receptorowe o wysokim po-

winowactwie do auksyn — chromosomowe receptory białkowe — zlokalizowane są w chromatynie i umożliwiają połączenie kompleksów IAA—nukleoplazmatyczny receptor białkowy z chromatyną.

1.5.5. Czynniki transkrypcyjny kontrolowany przez auksynę. Duże znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu działania auksyn na poziomie molekularnym miały prace Teissere i wsp. [24, 51, 55, 68, 69].

Kiedy tkanka roślinna była traktowana auksynami, obserwowano dwa rodzaje efektów w zależności od czasu działania hormonu [68]. Krótkie działanie auksyn powodowało zwiększenie aktywności transkrypcji w izolowanej chromatynie, nie wpływając na zmianę aktywności jądrowej polimerazy RNA. Jest prawdopodobne, że obserwowany wzrost syntezy RNA związany był z hormonalną kontrolą dostępności chromatyny. Głębsze wniknięcie w ten problem umożliwiła analiza działania enzymów proteolitycznych na chromatynę izolowaną z korzeni soczewicy. W tym celu chromatynę kontrolną oraz z korzeni traktowanych auksynami poddano inkubacji z trypsyną. Enzym ten przez trawienie histonów powoduje częściową derepresję chromatyny. Okazało się, że stymulujące działanie trypsyny na badany proces było znacznie wyraźniejsze w chromatynie kontrolnej niż pochodzącej z tkanek traktowanych auksynami. Ponadto eksperymenty z innymi enzymami proteolitycznymi dowiodły, że stymulacja transkrypcji następowała tylko w przypadku, kiedy rozrywaniu ulegało wiązanie między arginina i lizyną. Dane te pozwoliły przypuszczać, że chromatyna pochodząca z tkanek traktowanych auksynami była już w stanie częściowej derepresji.

Ponieważ w komórkach roślinnych traktowanych auksynami w krótkim czasie następowało zwiększenie aktywności transkrypcyjnej, interesujące było określenie rodzaju RNA syntetyzowanego w tych warunkach [55]. Kiedy RNA znakowany ^{32}P poddano rozdzielaniu na kolumnie MAK, okazało się, że rezultatem hormonalnej aktywacji jest produkcja heterogennego, jądrowego RNA (HnRNA).

Chociaż krótkie traktowanie auksynami nie zmieniało aktywności nukleoplazmatycznej polimerazy RNA, to jednak długie działanie (ponad 14 godz.) podwajało aktywność tego enzymu [68]. Wzrost aktywności jądrowej polimerazy RNA był prawdopodobnie związany z drastycznymi zmianami molekularnych właściwości cząsteczek enzymu. To przypuszczenie zostało potwierdzone przez Guilfoyle i Hansona [24] pracujących z syntetyczną auksyną 2,4-D. Wyniki te wydawały się wskazywać, że obserwowane zmiany aktywności polimerazy jądrowej są konsekwencją asocjacji enzymu z czynnikiem, który zmieniał molekularne właściwości polimerazy i którego synteza pozostawałaby pod kontrolą hormonu.

Eksperymentalnych dowodów świadczących o występowaniu takiego czynnika dostarczyły kolejne badania tych samych autorów [69]. Kiedy niehistonowe chromosomowe białka otrzymane z kontrolnych i traktowanych auksynami tkanek były rozdzielane na kolumnie Sephadex-G-25, otrzymano cztery stymulujące frakcje: α , β , γ i δ . Poziom frakcji α , β i δ był taki sam w kontroli i w tkankach traktowanych auksynami, natomiast zawartość frakcji γ zwiększała się dwukrotnie pod wpływem działania hormonu. Aktywność polimerazy RNA wzrastała o 700% w obecności czynnika γ , natomiast pozostałe frakcje zwiększały tę aktywność o 90%. Szczegółowe badania jakim poddano frakcje γ i δ dowiodły, że oba te czynniki są białkami, ponieważ ich stymulująca aktywność obniżała się znacznie w wyniku działania enzymów proteolitycznych. Wykluczono możliwość, aby stymulacja ta była wynikiem zmian wzorca spowodowanych działaniem DNA-azy.

Aktywna frakcja γ była termostabilna; przetrzymywanie jej przez 5 minut w temp. 90°C powodowało utratę jedynie 10% stymulującej aktywności. Natomiast frakcja δ okazała się wrażliwa na wysokie temperatury i w tych warunkach traciła całą aktywność.

Transkrypcyjny czynnik δ wykazywał stymulujące działanie w stosunku do polimerazy Ib RNA i w tym samym stopniu aktywował polimerazę nukleoplazmatyczną. Natomiast czynnik γ okazał się specyficzny tylko wobec polimerazy jąderkowej.

Stymulujące działanie wymienionych frakcji na aktywność polimerazy Ib RNA było badane z zastosowaniem natywnego i zdenaturowanego DNA jako wzorca. Okazało się, że aktywacja była niższa ze zdenaturowanym wzorcem. Na tej podstawie autorzy przypuszczają, że badane czynniki odgrywają rolę w rozpoznawaniu w helisie DNA odpowiednich regionów.

Wiele eksperymentów przeprowadzono także dla wyjaśnienia sposobu działania czynników transkrypcyjnych [51, 69, 70]. Wykazano mianowicie, że okres lag poprzedzający inkorporację UMP do RNA syntetyzowanego *in vitro* był całkowicie znoszony w obecności czynnika δ i γ , co sugerowało, że związki te stymulują inicjację transkrypcji. Również analiza inkorporacji $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, ^{32}P -GTP i ^3H -UMP do RNA syntetyzowanego w obecności frakcji γ i δ wskazywała na zwiększoną częstość inicjacji transkrypcji i skrócenie średniej długości transkryptu. Wobec tego ważnym elementem było wyjaśnienie czy czynniki te działają głównie na moment inicjacji, czy też powodują przedwczesne zakończenie syntezy łańcucha RNA. Badania prowadzone były w obecności spermidyny. Działanie tego poliamidu polega na stymulacji syntezy RNA poprzez indukcję dysocjacji kompleksu DNA—polimeraza RNA-RNA, co prowadzi do szybkiego ponownego zaangażowania czą-

steczek enzymu w procesie transkrypcji. Jeżeli działanie czynnika γ i δ byłoby analogiczne do działania spermidyny, to ich stymulujące działanie byłoby zniesione w obecności poliamidu. Okazało się, że działanie spermidyny było znacznie silniejsze w obecności frakcji γ i δ . Na tej podstawie autorzy uważali, że związki te działają głównie na proces inicjacji, nie powodując przedwczesnej dysocjacji kompleksu DNA—polimeraza RNA-RNA. Natomiast obserwowane skrócenie długości transkryptu badacze ci tłumaczą „zatłoczeniem” wzorca, jakie może być spowodowane zwiększoną częstotliwością inicjacji transkrypcji.

Sugestie powyższe zostały potwierdzone w następnych badaniach [70], w których zastosowano aktynomycynę D (AMD) i rifamycynę AF/013. AMD— jak wiadomo, wiąże się z parami G—C helisy DNA i w ten sposób blokuje dostęp polimerazy RNA do wzorca, nie hamując jednak całkowicie inicjacji transkrypcji. Jeżeli frakcje γ i δ działałyby na proces wydłużania transkryptu, należałoby oczekiwać obniżenia stymulującego działania tych czynników na syntezę RNA. Okazało się jednak, że działanie badanych frakcji nie ulegało zmianie w obecności AMD, co sugeruje, że nie wpływają one na wydłużanie transkryptu.

Wprowadzenie rifamycyny AF/013 do układu syntetyzującego RNA dostarczyło dalszych szczegółów o działaniu czynnika γ i δ . Rifamycyna AF/013 hamuje inicjację transkrypcji, nie wpływa natomiast na wydłużanie łańcucha RNA. Jeżeli polimeraza Ib RNA była preinkubowana przez 15 min w 0°C z DNA przed dodaniem inhibitora i trójfosforanów nukleozydów, miała miejsce synteza RNA odporna na rifamycynę, co sugeruje, że enzym raz związany z DNA jest odporny na działanie tego związku. Kiedy czynniki γ i δ były dodawane do środowiska zawierającego enzym i DNA, synteza RNA odpornego na rifamycynę znacznie zwiększyła się. Jest prawdopodobne, że jąderkowy enzym Ib rozpoznaje ograniczoną liczbę miejsc na DNA, z którymi łącząc się tworzy kompleksy odporne na rifamycynę. Działanie czynników γ i δ sprowadza się, zdaniem autorów, do indukcji inicjacji transkrypcji w dodatkowych, specyficznych miejscach na DNA, co w konsekwencji powoduje zwiększenie liczby kompleksów DNA—enzym—RNA odpornych na rifamycynę.

1.6. ZRÓŻNICOWANIE W CZASIE ODPOWIEDZI KOMÓRKI NA DZIAŁANIE AUKSYN

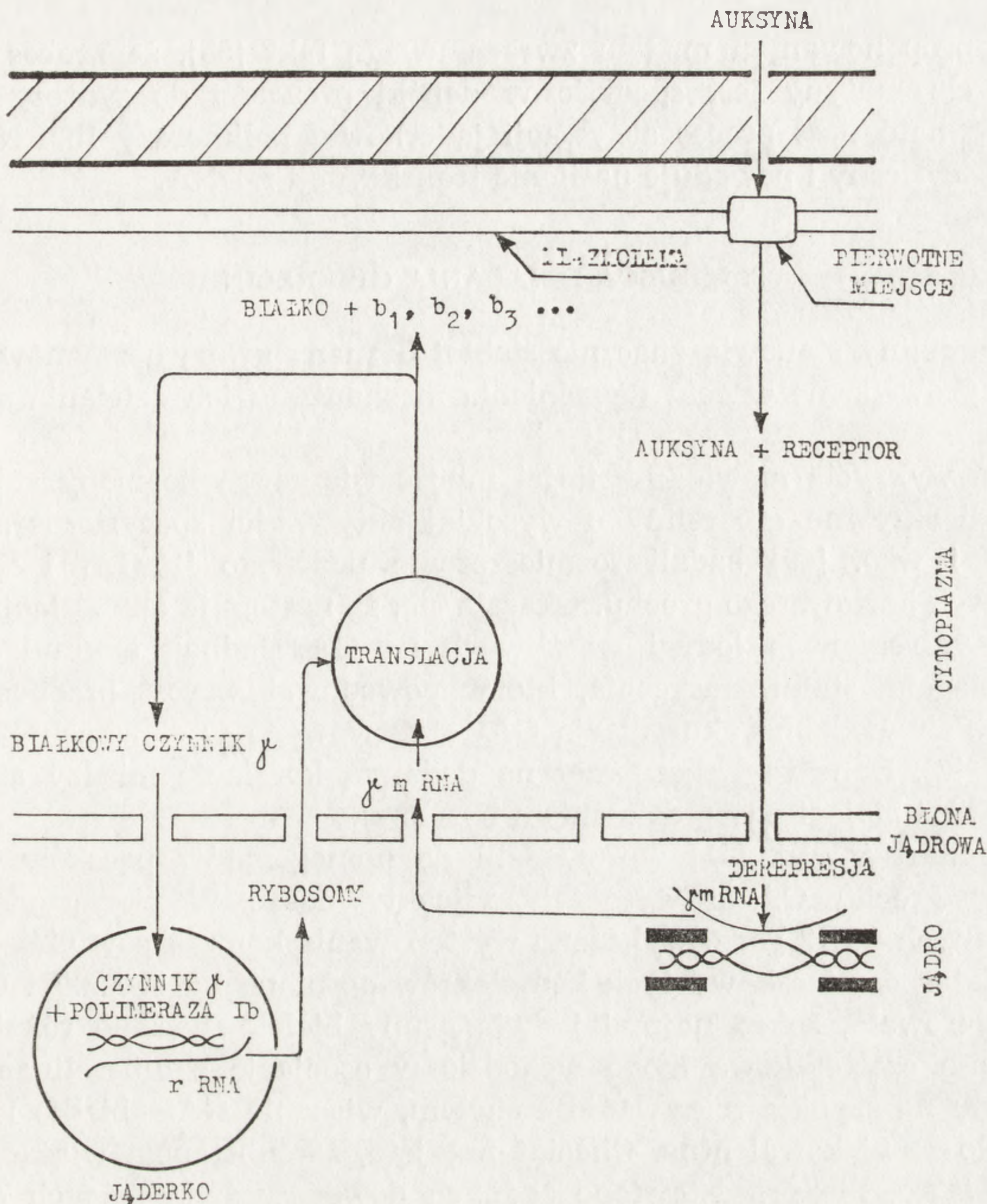
Szybka odpowiedź komórek na działanie auksyn jest często cytowana jako dowód świadczący przeciwko zaangażowaniu jądra we wzroście wydłużeniowym indukowanym przez hormony. Wielu badaczy wskazuje raczej na plazmolemę, jako miejsce pierwotnego działania auksyn.

Hardin i wsp. [26] przedstawili dane, które wydają się godzić oba

punkty widzenia. Stwierdzono bowiem występowanie we frakcji plazmolemy czynnika, uwalnianego pod wpływem 2,4-D, który działał stymulująco na proces transkrypcji zachodzący *in vitro*. Autorzy sugerują, że sygnał powstający w wyniku interakcji auksyn z plazmolemą może być przenoszony do jądra przez uwolnienie receptora, który z kolei może oddziaływać z polimerazą RNA. Rezultatem tych procesów byłaby zmiana przepisywanych miejsc.

Istotne znaczenie w wyjaśnieniu mechanizmu działania auksyn mają prace przedstawione przez Vanderhoefa i wsp. [71, 72], którzy sugerują dwie oddzielne odpowiedzi komórki na działanie auksyn. Kiedy brana była pod uwagę szybkość wzrostu — a nie, jak zwykle praktykowano — całkowity wzrost odcinków hypokotyli, obserwowano dwufazową odpowiedź na traktowanie auksynami. Pierwsza, która rozpoczynała się w 12 min po podaniu hormonu, nie ulegała namowianiu przez cytokininy, natomiast druga — rozpoczynająca się w 30 min od traktowania auksynami, była całkowicie hamowana przez cytokininy. Jest prawdopodobne, że ta dwufazowa odpowiedź stanowi dwie zachodzące na siebie odpowiedzi. Autorzy wykazali, że pierwsza krótkotrwała faza wydłużania komórek indukowanego przez auksyny jest podobna do wywołanego niespecyficznym przez kwaśne środowisko. Natomiast czas trwania drugiej odpowiedzi jest zgodny z wymaganiami dla syntezy makrocząsteczek. Synchronizacja pierwszej odpowiedzi z szybkimi zmianami w strukturze plazmolemy sugeruje interakcję auksyn z receptorami związanymi z błonami. Natomiast druga odpowiedź wzrostowa ujawniająca się po dłuższym czasie działania może odzwierciedlać zmiany na poziomie transkrypcji. Analogie z hormonami sterydowymi, pozwalają przypuszczać, że druga odpowiedź jądrowa może wymagać udziału jądrowo-cytoplazmatycznych, „rozpuszczalnych” receptorów hormonów. Wyniki dotyczące mechanizmu działania auksyn pochodziły z różnych pracowni i zwykle dyskutowane były oddzielnie. Ricard i wsp. [55] zebrali te dane i w połączeniu z własnymi wynikami zaproponowali model wyjaśniający molekularny mechanizm działania auksyn (ryc. 8).

Wczesne działanie auksyn na transkrypcję, które może być ujawnione w czasie krótszym niż 1 godz., pociąga za sobą wzrost dostępności wzorca w chromatynie. Wymaga to prawdopodobnie utworzenia w cytoplazmie kompleksu auksyna—receptor, który wnika do jądra cytokininy, natomiast druga — rozpoczynająca się w 30 min od traktowania — oddziałuje z DNA. Taka interakcja powoduje derepresję chromatyny, w wyniku której zachodzi synteza heterogennego, jądrowego (HnRNA) i krótkotrwałego m-RNA. Taki m-RNA podlega następnie translacji w cytoplazmie, co prowadzi do syntezy specyficznych białek. Jednym z tych białek ma być czynnik γ , który może wnikać do



Ryc. 8. Schemat przedstawiający mechanizm działania auksyn wg Ricarda i wsp. [55] — zmodyfikowany

jądra, gdzie wchodzi w asocjację z jąderkową polimerazą Ib RNA. W następstwie takiej asocjacji dokonuje się zmiana aktywności cząsteczek enzymu, który uzyskuje zdolność rozpoznawania nowych, promotorowych miejsc na DNA. Ostateczną konsekwencją tych procesów będzie wzmożenie syntezy białek.

Niektóre etapy w proponowanym modelu — jak zaznaczają autorzy — są jeszcze wysoce spekulatywne. Natura sygnału przenoszonego z plazmolemy do jądra i mechanizm derepresji genów przez auksyny pozostają nie wyjaśnione. Natomiast czynnik γ , którego synteza pozostaje pod kontrolą hormonu i który odgrywa ważną rolę w rozważanych procesach, został wyizolowany i stosunkowo dobrze poznany.

W proponowanym modelu zwraca uwagę fakt [55], że proces aktywacji chromatyny jest specyficzny dopóki prowadzi do syntezy czynnika γ , natomiast proces aktywacji jądrowej polimerazy Ib RNA nie jest specyficzny i powoduje nasilenie transkrypcji r-DNA.

2. MIEJSCA DZIAŁANIA GIBERELIN

Gibereliny stanowią znacznie słabiej poznaną grupę hormonów i badania prowadzone w celu wyjaśnienia mechanizmu ich działania są nieliczne.

Dla wykrycia niewielkiej ilości miejsc wiążących hormony stosowano radioaktywne gibereliny o wysokiej aktywności specyficznej. Musgrawe i wsp. [49] badali rozmieszczenie podanego $^3\text{H-GA}_1$ i $^3\text{H-GA}_5$ w pędach karłowatego grochu. Okazało się, że następuje akumulacja hormonu w regionach łodygi wrażliwych na GA. Jednak akumulacja ta nie osiągała stanu nasycenia, który powodował wzrost przepuszczalności błon. Podobną akumulację GA_3 obserwowano w siewkach *Pharbitis nil* [2]. Dane te wskazywały na dodatnią korelację między akumulacją GA i biologicznym działaniem hormonu.

Stoddart i wsp. [61] wprowadzili do homogenatów pączków karłowatego grochu GA o wysokiej radioaktywności. W eksperymentach uzyskanych po 12 godz. wykazano występowanie kompleksów GA_1 —białko. Ciężar cząsteczkowy tych kompleksów oceniano na 500 000 i 60 000, co sugerowało, że co najmniej dwie grupy białek znacznie różniących się masą cząsteczkową mogą wchodzić w asocjację z giberelinami. Ze względu na szybkie rozrywanie etanolem, wiązanie GA_1 —białko uważane było za niekowalentne. Chociaż przyjęto, że substancją wiążącą GA_1 było białko, nie przedstawiono żadnych dowodów świadczących o jego wrażliwości na enzymy proteolityczne czy temperaturę. Brak jest również danych informujących o stałej dysocjacji kompleksu i specyficzności wiązania.

Możliwość tworzenia kompleksów giberelina—białko została potwierdzona przez Konjević i wsp. [36], którzy wykazali wiązanie GA_3 do białek cytoplazmatycznych siewek grochu. Interakcja ta uległa ograniczeniu pod wpływem GA_{4+7} i GA_{13} , co wskazywało, że związki te współzawodniczą z GA_3 o te same miejsca wiązania. Jednak szczegółowe badania tych kompleksów również nie zostały przeprowadzone.

Pewnych informacji dotyczących asocjacji giberelin z frakcjami subkomórkowymi dostarczyły badania prowadzone przez Stoddarta [62]. Homogenat hypokotyli sałaty traktowanych radioaktywną gibereliną poddano wirowaniu przy 2000 g. Okazało się, że otrzymana w ten sposób frakcja oznaczona 2KP, zawierała od 2 do 5% całkowitej tkankowej radioaktywności. Frakcja ta nie była całkowicie homogenna, ale

badania w mikroskopie elektronowym i wirowanie w gradiencie gęstości sacharozy wykazały, że głównym jej składnikiem były elementy ścian komórkowych. Wyznakowanie tej frakcji zwiększało się z czasem działania i koncentracją GA_1 i było częściowo usuwane po 40-godzinnym traktowaniu nieradioaktywnym GA_1 .

Kolejna praca tego autora określała właściwości kompleksu utworzonego w rezultacie asocjacji frakcji 2KP z $^3H-GA_1$, jaki wyizolowano z hypokotyli sałaty. Kompleks ten wykazywał stabilność w 0,1 M buforze w pH 3 i pH 9, a także w 1 M soli i organicznych rozpuszczalnikach. Nie ulegał on także niszczeniu pod wpływem enzymów proteolitycznych i celulazy. Natomiast KOH powodowało uwolnienie 80% włączonej radioaktywności.

Autor sugeruje, że pierwotne działanie giberelin może być związane z ich włączaniem do ściany komórkowej. Przypuszczenie to popierają wcześniejsze doniesienia [64], które wykazały, że kontrola wydłużania przez GA zachodzi głównie poprzez zwiększanie plastyczności ściany komórkowej.

2.1. ODDZIAŁYWANIE GIBERELIN Z CHROMATYNĄ

Wiadomości na temat jądrowych miejsc wiązań innych hormonów roślinnych niż auksyny są bardzo skąpe, co powoduje, że mechanizm działania tych hormonów jest daleko mniej poznany.

Badania interakcji giberelin z frakcją jądrową prowadzone były przez Johri i Varnera [30]. Jądra izolowane z karłowatego grochu traktowane GA włączały 80% więcej znakowanych nukleotydów niż jądra kontrolne, pod warunkiem, że proces izolacji frakcji jądrowej przebiegał w obecności hormonu. Chromatografia na kolumnie MAK wykazała, że GA_3 zwiększa syntezę RNA. Brak takiej odpowiedzi w jądrach izolowanych w nieobecności GA_3 był prawdopodobnie spowodowany utratą podczas izolacji pewnych czynników odpowiedzialnych za działanie kwasu giberelowego.

Fellenberg [19] wykazał, że gibereliny mają zdolność znoszenia termicznej stabilności rekonstruowanych nukleoprotein, przy czym efekt ten był zależny od stężenia hormonu. Okazało się ponadto, że GA zmniejsza zdolność wiązania histonów do DNA, a także wywiera wpływ na stabilność par G—C i A—T [20]. W pH powyżej 7 hormony te wykazywały zdolność łączenia się z DNA poprzez wiązania wodorowe.

3. MIEJSCA DZIAŁANIA CYTOKININ

Badania nad rozmieszczeniem radioaktywnej BA w splotku *Funaria hydrometrica* przedstawione zostały przez Brandesa i Kende [7]. Główna ilość ^{14}C -BA związana była z nowo utworzonymi pączkami. Jednak

krótkie płukanie usuwało tę radioaktywność i powodowało odróżnicowanie pączków. Fakt ten sugerował, że obserwowane nagromadzenie cytokininy (^{14}C -BA) następowało w docelowych tkankach i może być związane z pierwotnym działaniem cytokinin.

Stosunek między cytokininami kowalentnie związanymi z pewnymi rodzajami t-RNA i wolnymi cytokininami wywierającymi hormonalną kontrolę w roślinach był przedmiotem szczegółowej dyskusji [35]. Wykazano, że nie jest możliwe, aby cytokininy mogły wywierać wpływ poprzez samą obecność w t-RNA. W konsekwencji zaprzestano poszukiwań miejsc działania cytokinin w t-RNA i zwrócono uwagę na inne składniki komórek, z którymi hormony te mogły być związane.

Interakcja cytokinin z frakcją rybosomów była badana przez Berridge'a i wsp. [5]. Stosując równoważną dializę i chromatografię na Sephadex G200 zrównoważonym radioaktywną cytokininą wykazano istnienie odwracalnego wiązania cytokinin z rybosomami 80 S. Wiązanie to było jednak nienasycone w stężeniach ograniczonych rozpuszczalnością cytokinin i nie przedstawiono danych dotyczących kinetyki wiązania.

Interakcja cytokinin z rybosomami została potwierdzona przez Foxa i Eriona [23], którzy na podstawie wirowania i równoważnej dializy wykazali wiązanie BA do rybosomów kalusa tytoniu i kielków pszenicy. W znacznie mniejszym stopniu BA wiązało się z rybosomami wątroby szczura lub rybosomami *E. coli*. Wykres Scatcharda wskazywał na występowanie dwóch odrębnych miejsc wiązań: (1) miejsce o niskim powinowactwie charakteryzujące się stałą asocjacji $K_A - 9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (2) miejsce o wysokim powinowactwie ze stałą asocjacji $K_A - 1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Wiązania pierwszego typu okazały się wrażliwe na trypsynę i wysokie temperatury, ulegały one rozpuszczeniu pod wpływem płukania rybosomów z 0,5 M KCl. Miejsca te po rozpuszczeniu zachowywały nadal zdolność wiązania cytokinin. Specyficzność wiązania biologicznie aktywnych cytokinin nie została przedstawiona.

Modelem w badaniach prowadzonych przez Chunga i wsp. [8] była rozdzielnopłciowa roślina *Marculialis annua*. Autorzy przypuszczają, że merystem męskich osobników tej rośliny jest specyficznym docelowym organem dla cytokinin. Obserwowano różnice w wiązaniu tych hormonów do rybosomów docelowych tkanek męskich i żeńskich osobników. Ilość BAP wiązanej przez rybosomy form męskich okazała się dwukrotnie większa w porównaniu z ilością wiązaną przez rybosomy form żeńskich. Również liczba miejsc wiążących wyrażona w molach wiazanego BAP wynosiła $3,9 \times 10^{-10} \text{ M}$ w rybosomach osobników męskich i tylko $2 \times 10^{-10} \text{ M}$ u osobników żeńskich. Stosowana koncentracja ^{14}C -BAP była jednak za niska i — jak autorzy zaznaczają — pozwalała jedynie na uwidocznienie miejsc wiązań o najwyższym powinowactwie.

Autorzy sugerowali możliwość strukturalnych odrębności między receptorami u osobników męskich i żeńskich, a więc występowania receptorów specyficznych dla płci.

3.1. ODDZIAŁYWANIE CYTOKININ Z CHROMATYNA

Stymulujący wpływ cytokinin na syntezę RNA także wymagał obecności czynnika białkowego. Mattyse i Abrams [44] wykazali, że zwiększają one syntezę RNA w jądrach izolowanych z tkanek tytoniu, soi i grochu. Natomiast aby hormony te mogły wywierać taki efekt na syntezę RNA w układzie zawierającym izolowaną chromatynę, konieczne było dodanie mediatora, który tracony był podczas procesu izolacji. Kompleks cytokinina—czynnik białkowy powodował także stymulację syntezy RNA przy zastosowaniu jako wzorca czystego DNA.

Hormony te, podobnie jak auksyny i gibereliny, mogą zmieniać termiczną stabilność rekonstruowanych nukleoprotein, oraz posiadają zdolność obniżania wiązania histonów do DNA. W pH powyżej 7 cytokininy wiązały się do DNA poprzez wiązania wodorowe.

UWAGI KOŃCOWE

Z przedstawionego przeglądu literatury wynika, że znaczna część koncepcji dotyczących miejsc receptorowych dla hormonów roślinnych pozostaje w świetle hipotez. Należy zwrócić uwagę, że większość przytoczonych danych została uzyskana w ciągu ostatnich kilku lat. Ze względu na znaczenie tego zagadnienia w wyjaśnieniu mechanizmów hormonalnej regulacji wzrostu roślin można oczekiwać, że najbliższe lata przyniosą rozstrzygające rezultaty.

LITERATURA

- [1] AGAZIO De.M., TOPONI M. A., Study of soluble protein fraction related to IAA-treatment in pea internodes, *Z. Pflanzenphysiol.*, **92**: 241, 1979.
- [2] BARENDSE G. W. M., [w:] *Plant Growth Substances*, 332, Tokyo 1973.
- [3] BATT S., VENIS M. A., Separation and localization of two class of auxin binding sites in corn coleoptile membranes, *Planta*, **100**: 15, 1976.
- [4] BATT S., WILKINS M. B., Auxin binding to corn coleoptile membranes: kinetics and specificity, *Planta*, **130**: 7, 1976.
- [5] BERRIDGE M. W., RALPH R. K., LETHMAN D. S., The binding of kinetin to plants ribosomes, *Biochem. J.*, **119**: 75, 1970.
- [6] BISWAS B. B., GANGULY A., DAS A., ROY P., [w:] Tawlor P. G. (Ed.) *Regulation of growth and differentiated function in eukaryote cells*, 461, Raven Press, New York 1975.
- [7] BRANDES H., KENDE H., Studies on cytokinin-controlled bud formation in moss *Protonemata*, *Plant. Physiol.*, **43**: 827, 1968.

- [8] CHUNG S. R., DURAND B., Differential binding to diocious plant ribosomes, *FEBS Letters*, **102**: 211, 1979.
- [9] CLELAND R. E., Auxin induced hydrogen ion excretion: correlation with growth and control by external pH and wather stress, *Planta*, **127**: 233, 1975.
- [10] CLELAND R. E., Fusicoccin-induced growth and hydrogen ion excretion of *Avena coleoptiles*: relation to auxin responses, *Planta*, **128**: 201, 1976.
- [11] CROSS J. W., BRIGGS W. R., DORHMANN U. C., RAY P. M., Auxin receptors of maize coleoptile membranes do not have ATP-ase activity, *Plant Physiol.*, **61**: 581, 1978.
- [12] CROSS J. W., BRIGGS W. R., Properties of a solubilized microsomal auxin-binding protein from coleoptiles and primary leaves of *Zea mays*, *Plant Physiol.*, **62**: 152, 1978.
- [13] CROSS J. W., BRIGGS W. R., Solubilized auxin-binding protein. Subcellular localization and regulation by a soluble factor from homogenates of corn shoots, *Planta*, **146**: 263, 1979.
- [14] DAVIES J. W., COCKING E. C., Protein synthesis in tomato-fruit locule tissue. Incorporation of amino acides into protein by aseptic cell-free systems, *Biochem. J.*, **104**: 23, 1967.
- [15] DAVIES P. J., GALSTON A. W., Labeled indole-macromolecular conjugates from growing stems supplied with labeled indoleacetic acid, I. Fractionation, *Plant Physiol.*, **47**: 435, 1971.
- [16] DORHMAN U., RAY P. M., An assay for auxin binding to solubilized receptor sites of corn membranes, *Plant Physiol.*, **57**: S-90, 1976.
- [17] DORHMAN U., HERTEL R., KOWALIK H., Properties of auxin binding sites in different subcellular fractions from maize coleoptiles, *Planta*, **140**: 97, 1978.
- [18] FELLEBERG G., Verenderungen des Nucleoproteids von Erbsenepikotylen durch synthetische Auxine bei der Induction der Wurzelneubildung, *Planta*, **84**: 195, 1969.
- [19] FELLEBERG G., Untersuchungen über die Bindung pflanzlicher Wachstoffsstoffe an verschiedene Komponenten des Chromatins in vitro, *Planta*, **190**: 347, 1971 a.
- [20] FELLEBERG G., Untersuchungen über die Bindung pflanzlicher Wachstoffsstoffe an verschiedene Komponenten des Chromatin in vitro, *Z. Naturforsch.*, **26 b**: 607, 1971 b.
- [21] FELLEBERG G., SCHÖMER U., Direct effect of upon isolated chromatin of etolated pea seedlings, *Z. Pflanzenphysiol.*, **75**: 449, 1975.
- [22] FELLEBERG G., VOGES B., Significance of Triton-extractable membranes for IAA-chromatin interaction, *Z. Pflanzenphysiol.*, **76**: 456, 1975.
- [23] FOX J. E., ERION J. L., A cytokinin binding protein higher plant ribosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 694, 1975.
- [24] GUILFOYLE T. J., HANSON J. B., Greater length of ribonucleic acid and synthesized by chromatin-bound polymerase from auxin-treated soybean hypocotyls, *Plant Physiol.*, **53**: 110, 1974.
- [25] HARDIN W. J., O'BRIEN T. J., CHERRY J. H., Stimulation of chromatin-bound RNA-polymerase activity by a soluble factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**: 667, 1970.
- [26] HARDIN J. W., HERRY J. H., MORRE D. J., LEMBI C. A., Enhancement of RNA-polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 3146, 1972.

- [27] HERTEL R., THOMSON K. S., RUSSO V. A. E., In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles, *Planta*, **107**: 352, 1972.
- [28] IHL M. P., Indole-acetic acid binding proteins in soybean cotyledon, *Planta*, **131**: 223, 1976.
- [29] JACOBS M., HERTEL R., Auxin binding to subcellular fraction from cocurbita hypocotyls: in vitro evidence for an auxin transport carrier, *Planta*, **142**: 1, 1978.
- [30] JOHRI M. M., VARNER J. E., Enhancement of RNA synthesis in isolated pea nuclei by gibberelic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**: 269, 1968.
- [31] KAETHNER T. M., Conformational change theory for auxin structure-activity relationship, *Nature*, **267**: 19-23, 1977.
- [32] KASOMO K., Effect of auxin on Mg⁺⁺-dependent ATP-ases in mung bean hypocotyls, *Doc. Thesis. Univ. Tokyo*, 1973.
- [33] KASAMO K., YAMAKI T., In vitro binding of IAA to plasma membrane-rich fractions containing Mg⁺⁺-activated ATP-ase from mung bean hypocotyls, *Plant Cell Physiol.*, **17**: 149, 1976.
- [34] KATEKAR G. K., Auxines: on the nature of the receptor site and molecular requirements for auxin activity, *Phytochem.*, **18**: 223, 1979.
- [35] KENDE H., GARDNER G., Hormone binding in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**: 267, 1976.
- [36] KONJEVIČ P., GRUBISIČ D., MARKOVIČ R., PETROVIČ J., Gibberelic acidbinding proteins from pea stems, *Planta*, **131**: 125, 1976.
- [37] LEMBI C. A., MORRE D. J., N-1-naphthylphthalamic-acid-binding activity of a plasma membrane-rich fraction from maize coleoptiles, *Planta*, **99**: 37, 1971.
- [38] LIAO S., HAMILTON R. H., Intracellular localization of growth hormones in plants, *Science*, **151**: 822, 1966.
- [39] LICHOLAT T. W., POSPIEŁOW T. M., MOROZOWA T. M., SALGANIK R. J., Sposobnosti klijetok kollyeoptyli pszenicy specificzeski swiazywati auksin i wlijanie gormona na matricznuju aktywnosti chromatina prorostkow raznogo wozrosta, *Fizjol. Rastienij*, **21**: 939, 1974.
- [40] LICHOLAT T. W., POSPIEŁOW W. A., Wlijanie gibberelina i B-indoliliksusnoj kisloty na matricznuju aktiwnosti pszenicy raznowo wozrosta, *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **213**: 231, 1973.
- [41] MATTHYSE A. G., The effect of auxin on RNA synthesis, *Plant Physiol. Suppl.*, **43**: S-42, 1968.
- [42] MATTHYSE A. G., PHILLIPS C., A protein intermediary in the interaction of a hormone with the genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **63**: 897, 1969.
- [43] MATTHYSE A. G., Organ specificity of hormone—receptor—chromatin interactions, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 519, 1970.
- [44] MATTHYSE A. G., ABRAMS A., Factor mediating interaction of kinins with the genetic material, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**: 511, 1970.
- [45] MONDAL H., MONDAL R. K., BISWAS B. B., Factors and rifampicin influencing RNA-polymerase isolated from chromatin of eukaryotic cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**: 1194, 1970.
- [46] MONDAL H., MONDAL R. K., BISWAS B. B., RNA stimulated by indole acetic acid. *Nature New Biol.*, **240**: 111, 1972.
- [47] MONDAL H., MONDAL R. K., BISWAS BB., RNA-polymerase from eukaryotic cells. Isolation and purification of enzymes and factors from chromatin of coconut nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **25**: 463, 1972.

- [48] MONDAL H., GANGULY A., DAS A., MANDAL R., BISWAS B., Ribonucleic acid polymerase from eukariotic cells. Effects of factors and rifampicin on the activity of RNA-polymerase from chromatin of coconut nuclei, *Eur. J. Biochem.*, **28**: 143, 1972.
- [49] MUSGRAVE A., KENDE H., Radioactive gibberelin A₃ and its metabolism in dwarf peas, *Plant Physiol.*, **45**: 56, 1970.
- [50] OOSTROM H., Van LOOPIK-DETMERS A. M., LIBBENGA K. R., A high-affinity receptor for indoleacetic acid in cultured tobacco pith explants, *FEBS Letters*, **59**: 194, 1975.
- [51] PENON P., TEISSERE M., AZOU Y., RICARD J., Controle hormonal de la transcription nucleolaire chez les vegetaux superieurs, *Physiol. Veg.*, **13**: 832, 1975.
- [52] RAY P. M., DORHMANN U., HERTEL R., Charakterization of naphthalene — acetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue, *Plant Physiol.*, **59**: 357, 1977 a.
- [53] RAY P. M., DORHMANN U., HERTEL R., Specificity of auxin-binding sites on maize coleoptile membranes as possible receptor sites for auxin action, *Plant Physiol.*, **60**: 585, 1977 b.
- [54] RAY P. M., Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of the endoplasmic reticulum, *Plant Physiol.*, **59**: 594, 1977.
- [55] RICARD J., TEISSERE M., PENON P., AZOU Y., Hormonal control of ribonucleic acid and protein synthesis in plants, *J. Microscopie. Biol. Cell*, **26**: 139, 1976.
- [56] ROY P., BISWAS B. B., A receptor protein for indoleacetic acid from plant chromatin and its role in transcription, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**: 1597, 1977.
- [57] SABNIS D. D., HIRSBERG G., JACOBS W. B., Autoradiographic analysis of the distribution of label from ³H-indoleacetic acid supplied to isolated coleus internodes, *Plant Physiol.*, **44**: 27, 1969.
- [58] SIEGEL S. M., GALSTON A. W., Experimental coupling of indoleacetic acid to pea root protein in vivo and in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **39**: 1111, 1953.
- [59] SILBERG J., SKOOG F., Changes induced by indoleacetic acid in nucleic acid contents and growth of tobacco pith tissue, *Science*, **118**: 443, 1953.
- [60] SPIKER S., CHARKLEY R., Evidence and effect of plant hormones on thermal denaturation of pea nucleoprotein, *Planta*, **102**: 362, 1972.
- [61] STODDART J., BREINDENBACK W., NADEAU R., RAPPAPORT L., Selective binding of ³H-gibberelin A₁ by protein fractions from dwarf pea epicotyls, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 3255, 1974.
- [62] STODDART J. L., Interaction of ³H-gibberelin A₁ with a sub-cellular fraction from lettuce (*Lettuca sativa* L.) hypocotyls. I. Kinetics of labelling, *Planta*, **146**: 353, 1979.
- [63] STODDART J. L., Interaction of ³H-gibberelin A₁ with sub-cellular fraction from lettuce (*Lettuca sativa* L.) hypocotyls. II. Stability and properties of the association, *Planta*, **146**: 363, 1979.
- [64] STUART D. A., JONES R. L., The role of acidification in gibberelic acid and fusicoccin-induced elongation growth of lettuce hypocotyl sections, *Planta*, **142**: 153, 1978.
- [65] TANADA T., Antagonism between indoleacetic acid and abscisic acid on a rapid phytochrome-mediated process, *Nature*, **236**: 460, 1972.

- [66] TAUTVYDAS K. J., GALSTON A. W., [w:] Carr D. (Ed), Plant Growth Substances., 254, Berlin Springer, 1972.
- [67] THIMANN K. V., LEOPOLD A. C., Plant growth hormones, [w:] The hormones, Physiology, Chemistry and Applications, vol. III, red. G. Pincus, K. V. Thimann, Academic Press, New York 1955, 1-56.
- [68] TEISSERE M., PENON P., RICARD J., Hormonal control of chromatin availability and of the activity of purified RNA-polymerases in higher plants, FEBS Letters, **30**: 65, 1973.
- [69] TEISSERE M., PENON P., Van HUUYSTE R. B., AZOU Y., Hormonal control transcription in higher plants, Biochem. Biophys. Acta, **402**: 391, 1975.
- [70] TEISSERE M., PENON P., AZOU Y., RICARD J., On the mode of action of transcription factors in higher plants, Plant Sci. Letters, **6**: 49, 1976.
- [71] VANDERHOEF L. N., STAHL C. A., Separation of two responses to auxin by means of cytokinin inhibition, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., **72**: 1822, 1975.
- [72] VANDERHOEF L. V., STAHL C. A., WILLIAMS C. A., BRINGMANN K. A., GRENFIELD J. C., Additional evidence for separable responses to auxin in soybean hypocotyl, Plant Physiol., **57**: 817, 1976.
- [73] Van der WOUDE W. J., LEMBI C. A., MORRE D. J., Auxin (2, 4-D) stimulation (in vivo and in vitro) of polysaccharide synthesis in plasma membrane fragments isolated from onion stems, Biochem Biophys. Res. Commun., **46**: 254, 1972.
- [74] VEEN H., Specificity of phospholipid binding to indole acetic acid and other auxin, Z. Naturforsch., **29c**: 39, 1974.
- [75] VENIS M. A., Stimulation of RNA transcription from pea and corn DNA by protein retained on Sepharose coupled to 2,4-Dichlorofenoxyacetic acid, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **68**: 1824, 1971.
- [76] VENIS M. A., Solubilisation and partial purification of auxin-binding sites of corn membranes, Nature, **266**: 286, 1977 a.
- [77] VENIS M. A., Affinity labels for auxin binding sites in corn coleoptile membranes, Planta, **134**: 145, 1977 b.
- [78] VENIS M. A., WATSON P. J., Naturally occurring modifiers of auxin-receptor action in corn: Identification as benzoxazolinones, Planta, **142**: 103, 1978.
- [79] WEIGL J., Einbau von Auxin in gequollene Lecithin-Lamellen, Z. Naturforsch. B, **24**: 365, 1969 a.
- [80] WEIGL J., Spezifität der Wechselwirkung zwischen Wuchsstoffen und Lecithin, Z. Naturforsch. B, **24**: 367, 1969 b.
- [81] WEIGL J., Wechselwirkung Pflanzlicher Wachstumshormone mit Membranen. Z. Naturforsch. B, **24**: 1046, 1969 c.
- [82] WOLF F. C., Proteins in relation to growth of Avena coleoptile segments, Z. Pflanzenphysiol., **86**: 159, 1978.
- [83] YAMAKI T., KABAYASHI K., [w:] Plant Growth Substances, 1970, red. D. J. Carr, Springer-Verlag, Heidelberg, New York 1972, 196-206.

Otrzymano: 5 lutego 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autorki: ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

199) T. J. ...
198) ...
197) ...
196) ...
195) ...
194) ...
193) ...
192) ...
191) ...
190) ...
189) ...
188) ...
187) ...
186) ...
185) ...
184) ...
183) ...
182) ...
181) ...
180) ...
179) ...
178) ...
177) ...
176) ...
175) ...
174) ...
173) ...
172) ...
171) ...
170) ...
169) ...
168) ...
167) ...
166) ...
165) ...
164) ...
163) ...
162) ...
161) ...
160) ...
159) ...
158) ...
157) ...
156) ...
155) ...
154) ...
153) ...
152) ...
151) ...
150) ...
149) ...
148) ...
147) ...
146) ...
145) ...
144) ...
143) ...
142) ...
141) ...
140) ...
139) ...
138) ...
137) ...
136) ...
135) ...
134) ...
133) ...
132) ...
131) ...
130) ...
129) ...
128) ...
127) ...
126) ...
125) ...
124) ...
123) ...
122) ...
121) ...
120) ...
119) ...
118) ...
117) ...
116) ...
115) ...
114) ...
113) ...
112) ...
111) ...
110) ...
109) ...
108) ...
107) ...
106) ...
105) ...
104) ...
103) ...
102) ...
101) ...
100) ...
99) ...
98) ...
97) ...
96) ...
95) ...
94) ...
93) ...
92) ...
91) ...
90) ...
89) ...
88) ...
87) ...
86) ...
85) ...
84) ...
83) ...
82) ...
81) ...
80) ...
79) ...
78) ...
77) ...
76) ...
75) ...
74) ...
73) ...
72) ...
71) ...
70) ...
69) ...
68) ...
67) ...
66) ...
65) ...
64) ...
63) ...
62) ...
61) ...
60) ...
59) ...
58) ...
57) ...
56) ...
55) ...
54) ...
53) ...
52) ...
51) ...
50) ...
49) ...
48) ...
47) ...
46) ...
45) ...
44) ...
43) ...
42) ...
41) ...
40) ...
39) ...
38) ...
37) ...
36) ...
35) ...
34) ...
33) ...
32) ...
31) ...
30) ...
29) ...
28) ...
27) ...
26) ...
25) ...
24) ...
23) ...
22) ...
21) ...
20) ...
19) ...
18) ...
17) ...
16) ...
15) ...
14) ...
13) ...
12) ...
11) ...
10) ...
9) ...
8) ...
7) ...
6) ...
5) ...
4) ...
3) ...
2) ...
1) ...

RECEPTORY LIMFOCYTÓW *

LYMPHOCYTE RECEPTORS

Marek JAKÓBISIAK i Maciej KAWALEC

Zakład Transplantologii Instytutu Biostruktury AM w Warszawie i Pracownia Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie

Streszczenie. Na powierzchni limfocytów wykryto dotychczas wiele receptorów rozróżnianych na podstawie ich budowy (receptory immunoglobulinowe) lub powinowactwa do odpowiednich substancji. Receptory, a także inne markery, np. antygeny powierzchniowe, niektóre enzymy czy testy funkcjonalne, pozwalają na bardziej szczegółowe określenie przynależności limfocytów do subpopulacji. Receptory wiążące antygen wydają się najważniejsze dla funkcji limfocytów. W artykule omówiono głównie te właśnie receptory podając jednocześnie hipotezy dotyczące funkcji receptorów w procesie odpowiedzi immunologicznej.

Summary. To date many receptors have been detected on the surface of lymphocytes which are distinguished on the basis of their structure (immunoglobulin receptors) or affinity to certain substances. Receptors as well as other markers, for instance surface antigens, some enzymes or else functional tests allow the recognition in more detail of the appurtenance of lymphocytes to a definite subpopulation. Antigen-binding receptors seem to be most important for the functioning of lymphocytes. The paper discusses mainly the latter receptors, advancing at the same time hypotheses concerning the functions of receptors in the process of immunological response.

Limfocyty są komórkami o dość jednolitym wyglądzie posiadającymi jednak różne własności. Pozwala to na podzielenie limfocytów na różne populacje. Powszechnie wyróżnia się limfocyty B i T. Limfocyty B dojrzewają u ptaków w kaletce Fabrycjusza (Bursa Fabricii), natomiast u ssaków nie rozstrzygnięto dotychczas, który z narządów ma zasadnicze znaczenie dla ich dojrzewania. Limfocyty T dojrzewają w grasicy (Thymus), a także po opuszczeniu grasicy pod wpływem wydzielonych przez nią hormonów. Limfocyty B, które przekształcają się

* Wygłoszono na konferencji biologii komórki nt. „receptory komórkowe” w dniach 23 i 24 listopada 1979 r., zorganizowanej przez Polskie Towarzystwo Anatomiczne i Sekcję Biologii Komórki Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików w Warszawie.

w komórki plazmatyczne, związane są z odpowiedzią typu humoralnego czyli z produkcją przeciwciał humoralnych i najważniejszą ich rolą jest walka z infekcjami wywołanymi przez mikroorganizmy. Limfocyty T związane są z odpowiedzią typu komórkowego i najprawdopodobniej jednym z najważniejszych ich zadań jest, oprócz kooperacji z limfocytami B w odpowiedzi typu humoralnego, eliminacja komórek własnych organizmu transformowanych wirusami. Szersze omówienie podstawowych zagadnień immunologii można znaleźć w podręcznikach [6, 99, 107].

TABELA 1

Niektóre receptory limfocytów ludzkich

Limfocyty	B	T	3 populacja
Porcent limfocytów w krwi obwodowej człowieka	14	80	6
Receptory immunoglobulinowe (IgR)	+	?	—
Receptory dla fragmentu F_c immunoglobulin G ($F_c \gamma R$)	+	+	+
M ($F_c \mu R$)	+	+	—
Receptory dla składników dopełniacza			
CR ₁	+	—	+
CR ₂	+	—	—
Receptory dla erytrocytów owcy	—	+	—
Receptory dla wirusa Ebstein-Barra	+	—	—

W ramkach zaznaczono receptory będące markerami limfocytów T lub B.

Na powierzchni limfocytów wykryto dotychczas wiele receptorów rozróżnianych na podstawie ich budowy (IgR) lub powinowactwa do odpowiednich substancji (tab. 1). Zwykle niewiele jednak wiemy o ich strukturze i funkcji. Najważniejsze dla funkcji limfocytów wydają się być receptory wiążące antygen. Nie udało się jednak jednoznacznie rozstrzygnąć, co zostanie potem szerzej omówione, czy receptory dla antygenów posiadające budowę zbliżoną do immunoglobulin, tzw. receptory immunoglobulinowe (IgR), występujące na powierzchni limfocytów B w istocie przenoszą po połączeniu ze swoistym antygenem bodziec pobudzający komórkę. W przypadku zaś limfocytów T, gdzie taka rola receptorów wiążących antygen wydaje się udokumentowana, bardzo niewiele wiemy o strukturze tych receptorów.

Zainteresowanie receptorami podyktowane jest chęcią lepszego zrozumienia funkcji limfocytów. Z drugiej strony identyfikacja receptorów umożliwia określenie do jakiej subpopulacji należą posiadające te receptory limfocyty. Ta ostatnia informacja przydatna jest szczególnie w he-

matologii dla określenia na jakim poziomie różnicowania znajdują się i z jakich limfocytów różnicują się określone komórki białaczki lub chłoniaka. Informacje takie mogą w przyszłości wpłynąć na bardziej zróżnicowane leczenie poszczególnych form chorób rozrostowych wywodzących się z układu limfatycznego.

Należy pamiętać, że dla określenia przynależności limfocytów do różnych subpopulacji mają zastosowanie oprócz receptorów także inne markery, np. antygeny powierzchniowe, niektóre enzymy, a także testy funkcjonalne.

Receptory wiążące antygen są jedynymi receptorami, które syntetyzowane są prawdopodobnie wyłącznie przez limfocyty i mają dla funkcji tych komórek najistotniejsze znaczenie. Tym też receptorom poświęcono najwięcej uwagi w niniejszym opracowaniu.

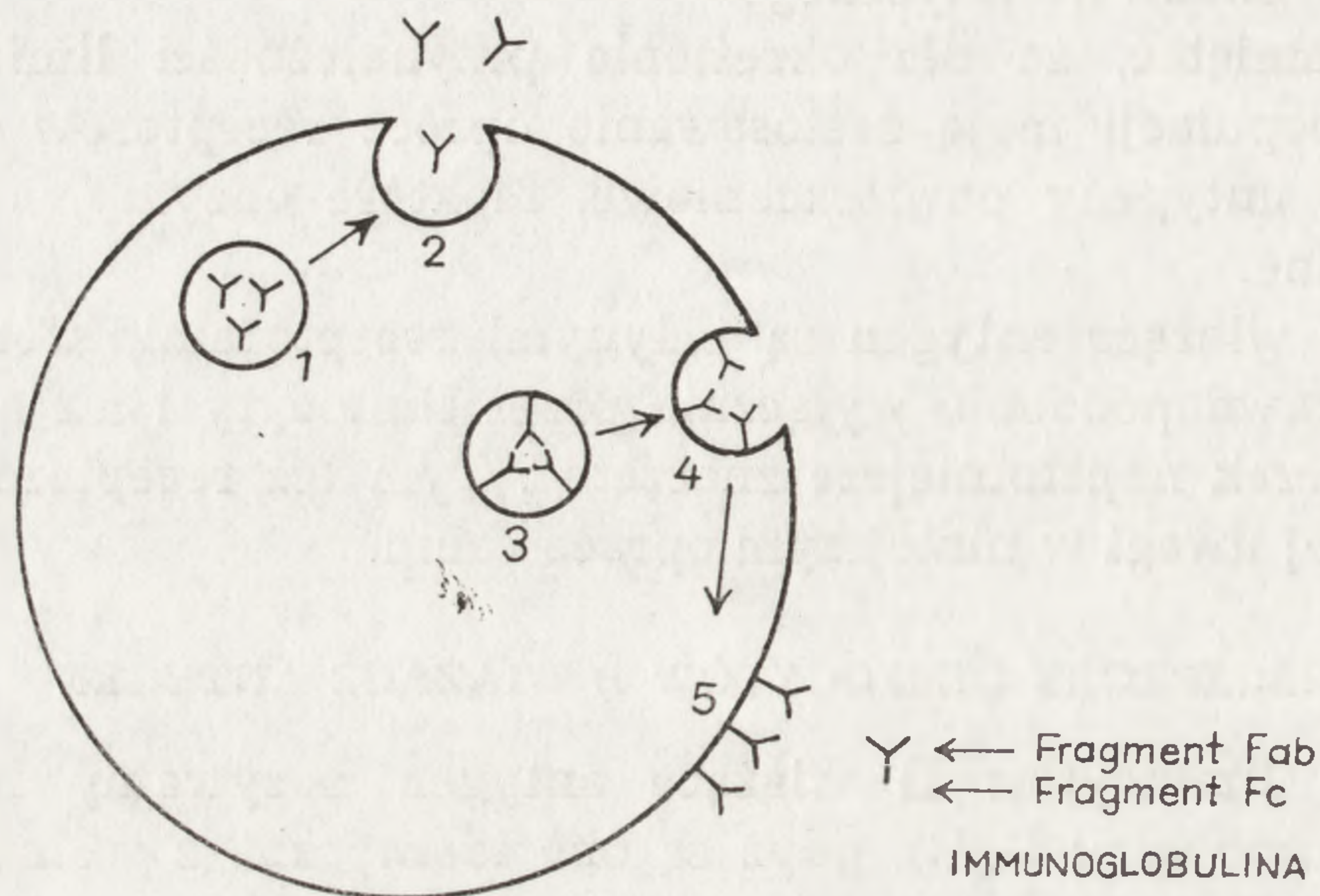
RECEPTORY LIMFOCYTÓW B WIAŻĄCE ANTYGEN

Receptory limfocytów B wiążące antygen nazywamy receptorami immunoglobulinowymi (IgR), gdyż są one identyczne z wolnymi immunoglobulinami (Ig) uwalnianymi przez dany limfocyt B do środowiska [6, 99, 107].

Powstaje więc pytanie, dlaczego jedne immunoglobuliny związane są z błoną komórkową, a drugie w stanie wolnym opuszczają komórkę. Jedną z hipotez próbujących odpowiedzieć na to pytanie zakłada, że w pęcherzykach wydzielniczych te dwa typy immunoglobulin zachowują się odmiennie (ryc. 1). Jedne z nich związane są fragmentem Fc z wewnętrzną powierzchnią pęcherzyka wydzielniczego, drugie zaś znajdują się w nim w stanie wolnym [139]. Sugeruje się, że te ostatnie immunoglobuliny zawierają więcej grup węglowodanowych [81]. Z chwilą połączenia się błony pęcherzyka wydzielniczego z błoną komórkową, wolne Ig wydzielane są do środowiska, natomiast cząsteczki Ig związane z błoną pęcherzyka stają się receptorami immunoglobulinowymi (IgR), gdyż błona pęcherzyka zostaje włączona do błony komórkowej*. IgR mają okres półtrwania w błonie komórkowej rzędu 10 godzin i wydaje się, że w sposób ciągły uwalniane są do środowiska wraz z fragmentem błony komórkowej, co następnie równoważone jest syntezą nowych receptorów [139, 143]. Inny składnik błony komórkowej, badany w tym samym doświadczeniu, antygen H-2 jest daleko bardziej stabilny, co świadczy o selektywności procesu.

* Wyniki nowszych badań sugerują, że syntezę IgR limfocytów B i wolnych immunoglobulin przez niego uwalnianych odpowiadają różne mRNA. Części stałe łańcuchów ciężkich IgR są dłuższe i zawierają dodatkowe aminokwasy tworzące fragment o własnościach hydrofobowych odpowiedzialny za związanie IgR z błoną komórkową.

Istniała opinia, że wszystkie receptory immunoglobulinowe określonego limfocyta B są, przynajmniej w określonym czasie, identyczne. Przekonanie to opierało się na obserwacji podobieństwa miejsc wiążących antygen w IgR i humoralnych przeciwciałach produkowanych



Ryc. 1. Transport wewnątrzkomórkowy immunoglobulin. W pęcherzykach wydzielniczych mogą znajdować się dwa typy immunoglobulin: nie związane z błoną (1) lub z nią związane (3). Po fuzji pęcherzyków wydzielniczych z błoną komórkową następuje wydzielenie humoralnych immunoglobulin (2) lub pojawienie się receptorów immunoglobulinowych na powierzchni limfocyta (4, 5). Być może oba typy immunoglobulin mogą znajdować się w jednym pęcherzyku

przez ten limfocyt [2, 9] oraz sugestii, że dany limfocyt produkuje immunoglobuliny identyczne pod względem markerów izo-, allo- i idiotypowych. (Markery izotypowe określają na podstawie różnic i podobieństw antygenowych odmiany immunoglobulin związane z przynależnością do klasy, podklasy, typu, podtypu. Markery allotypowe określają formy alleliczne, a idiotypowe cechy osobnicze swoiste dla każdej cząsteczki immunoglobuliny.) Ta ostatnia sugestia opierała się w głównej mierze na fakcie, że immunoglobuliny (lub ich fragmenty) produkowane przez komórki nowotworowe wywodzące się z komórek plazmatycznych (plasmocytoma) są pod każdym względem identyczne w określonym procesie nowotworowym. Obecnie poglądy te uległy częściowej rewizji. Okazało się bowiem, że na powierzchni limfocyta mogą równocześnie współistnieć IgR należące do różnych klas [37, 42, 64, 115, 126, 140]. Istnieją również doniesienia świadczące o zdolności limfocytów do równoczesnej produkcji różnych Ig przeciw dwu różnym antygenom [22], a nawet zdolności jednej cząsteczki Ig do wiązania dwóch różnych antygenów do dwu różnych miejsc fragmentu F_{ab} [8, 23].

Komórki macierzyste limfocytów B w życiu płodowym pojawiają się w wątrobie [82] u myszy w drugim [69], u królika w 3–4 tygodniu [53], a u człowieka w 8 tygodniu [69]. Najwcześniejszym markerem umożliwiającym identyfikację tych komórek jest obecność immunoglobulin klasy IgM w cytoplazmie komórki [53, 69]. W tym okresie życia płodowego nie stwierdza się jeszcze komórek limfoidalnych z IgR [69]. Dopiero potem obserwuje się limfocyty B z powierzchniowymi receptorami klasy IgM [49], a następnie limfocyty B mające na swej powierzchni równocześnie receptory klasy IgM i IgD [42, 64, 115, 126, 140]. U człowieka dorosłego większość limfocytów B należy właśnie do tej ostatniej grupy, tzn. ma równocześnie IgR klasy IgM i IgD [37]. Receptory o strukturze podobnej do IgD znaleziono również na limfocytach B królika [31, 144]. Pojawienie się na powierzchni limfocytów B receptorów klasy IgD wiąże się z mniejszą wrażliwością tych limfocytów płodowego nie stwierdza się jeszcze komórek limfoidalnych z IgR [69]. na indukcję tolerancji immunologicznej [37, 138]. I tak surowica skierowana przeciw IgD zwiększa produkcję przeciwciał klasy IgG w odpowiedzi immunologicznej, co wyjaśnia się pobudzeniem immunoglobulinowego receptora identycznego z IgD [79]. Łatwość indukowania tolerancji w życiu płodowym można by zatem tłumaczyć przewagą receptorów IgM na limfocytach B. Natomiast pojawienie się dodatniej reaktywności immunologicznej wydaje się być w związku z pojawieniem się receptorów IgD. Być może jednak przyczyną powyższych różnic w reaktywności immunologicznej jest obserwowany przez niektórych badaczy brak powtórnego ujawnienia się IgR na płodowych i noworodkowych limfocytach B po ich endocytozie, która — jak dalej wyjaśniono — jest następstwem reakcji z antygenem [15]. U dorosłego człowieka tylko niewielki odsetek limfocytów posiada na swej powierzchni receptory klasy IgG lub IgA. Ocenia się, że limfocyt B ma na swej powierzchni około 1×10^5 cząsteczek IgR [134, 135].

Receptory immunoglobulinowe, podobnie jak inne białka błonowe, mogą przesuwac się w płaszczyźnie błony. Traktowanie limfocytów B przeciwciałami skierowanymi przeciw immunoglobulinom lub reakcja swoistych antygenów wielowartościowych z receptorami immunoglobulinowymi prowadzi do szeregu zdarzeń dających się wytłumaczyć przemieszczaniem receptorów immunoglobulinowych w płaszczyźnie błony na skutek łączenia cząsteczki przeciwciała lub antygeny jednocześnie z dwoma lub więcej receptorami. Kolejność tych zdarzeń można przedstawić następująco [26, 29, 73, 102, 136]: 1. skupianie się IgR w drobne plamkowate skupiska (patching), 2. skupianie się plamek na jednym biegunie komórki z wytworzeniem charakterystycznej czapeczki (capping), 3. endocytoza skupionych na biegunie limfocyta kompleksów. Ten

ostatni proces zaczyna się już w czasie tworzenia się plamek [94]. Opisane procesy znane są także w odniesieniu do innych komponent związanych z błoną komórkową innych typów komórek. W wyniku opisanych zmian kompleksy antygen—receptor ulegają endocytozie, niewielka jednak ich część uwalnia się od błony i pojawia w środowisku. [29, 108].

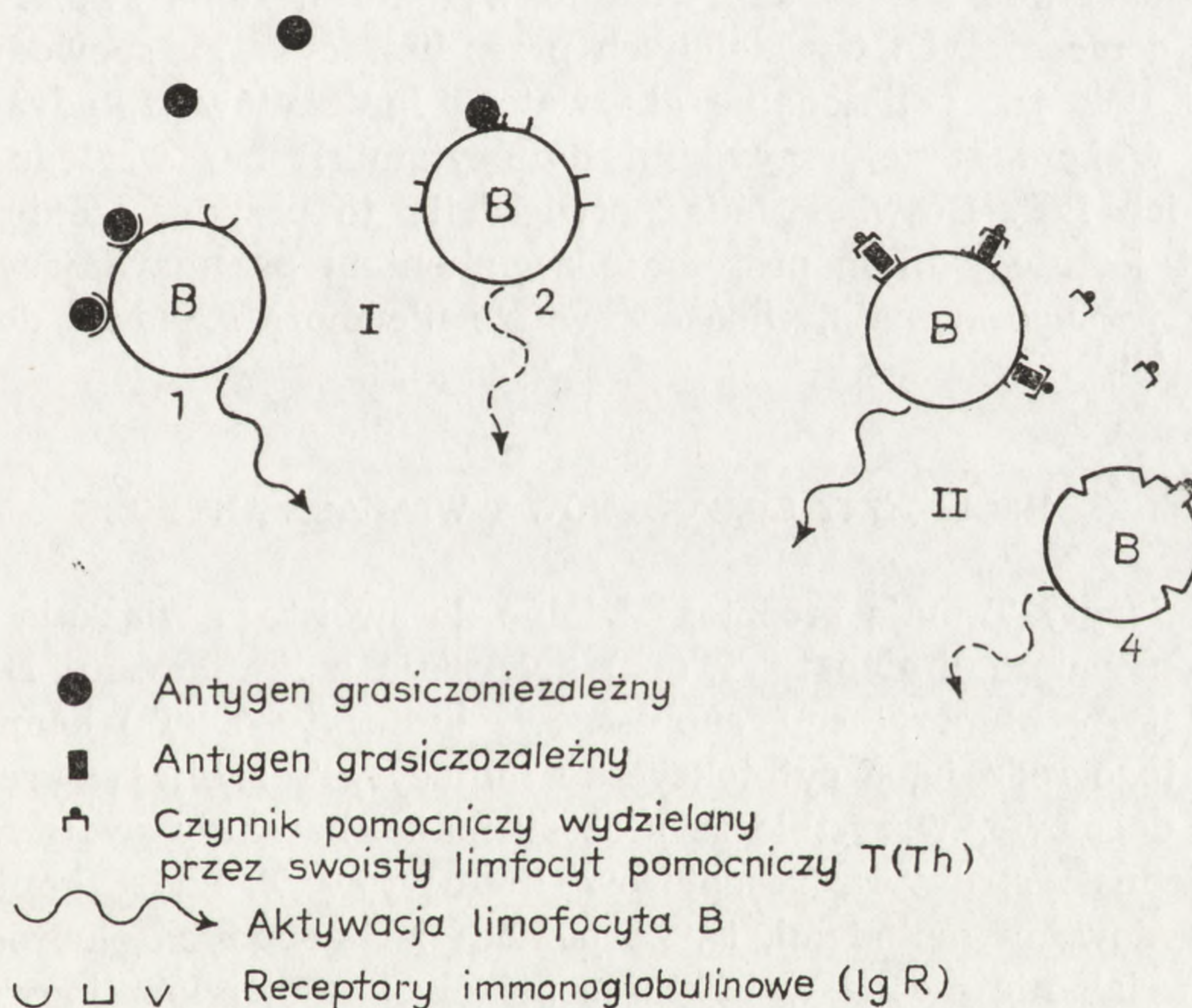
Nieoczekiwanie, okazało się, że nie ma korelacji między opisanymi zmianami obserwowanymi po połączeniu antygenów wielowartościowych z IgR limfocytów B a aktywacją limfocytów prowadzącą do ich proliferacji i produkcji komórek efektorowych odpowiedzi immunologicznej [152]. Wydawałoby się, że związanie swoistych antygenów przez IgR limfocyta B powinno być sygnałem prowadzącym do jego aktywacji. Jednak problem co jest zasadniczym bodźcem prowadzącym do aktywacji limfocyta i przez jakie receptory bodziec ten jest przekazywany pozostaje dotychczas nie rozwiązany. Wiadomo, że tylko nieliczne antygeny (tzw. grasiczniezależne) mogą aktywować limfocyty B bez pomocy limfocytów T. Do antygenów grasiczniezależnych należą między innymi lipopolisacharyd (LPS) ze ściany bakterii Gram-ujemnych, dekstran, oczyszczona tuberkulina (purified protein derivative — PPD) [104]. Znaczna większość antygenów jest niezdolna do bezpośredniej aktywacji limfocytów B i wymaga pośrednictwa (kooperacji) limfocytów T. Antygeny takie nazywamy grasiczozależnymi. Współdziałanie limfocytów T polega na produkcji przez nie (limfocyty takie zwane są limfocytami T pomocniczymi; T helper — Th) pewnych czynników humoralnych [59]. Dopiero łączne oddziaływanie antygeny i wspomnianych czynników (zwanych pomocniczymi) na limfocyt B prowadzi do jego aktywacji.

Obserwacje te są podstawą hipotezy, w której założono, że do aktywacji limfocyta B potrzeba dwu sygnałów [14], z których jeden pochodzi bezpośrednio z antygeny i w przenoszeniu tego sygnału pośredniczą IgR, drugi zaś pochodzi z limfocytów T przy czym receptor (określany czasami jako akceptor) przenoszący ten sygnał nie został dotąd bliżej poznany [132].

Postawiono również hipotezę, według której próbuje się pomniejszyć znaczenie receptorów immunoglobulinowych limfocytów B i zakłada się, że jedynym sygnałem prowadzącym do aktywacji limfocyta B jest sygnał przekazywany przez czynnik aktywujący, który w odpowiedzi na antygeny grasiczozależne wydzielany jest przez limfocyty T, a w przypadku grasiczniezależnych obecny jest w cząsteczce antygeny uniezależniając limfocyt B od pomocy limfocytów T. Ta ostatnia hipoteza w przeciwieństwie do poprzedniej nazywa się hipotezą jednego sygnału [85].

Żadna z tych hipotez nie tłumaczy wszystkich zjawisk obserwowana-

nych przy aktywacji limfocytów B, ale każda z nich zakłada istnienie bliżej nieokreślonego receptora (akceptora), który współdziałałby z IgR (model dwu sygnałów) albo byłby jedynym receptorem przenoszącym bodziec aktywujący (model jednego sygnału). Hipoteza jednego sygnału jest pozornie sprzeczna ze znaczeniem, jakie tradycyjnie przypisujemy IgR w procesie aktywacji limfocytów B, dlatego wymaga ona krótkiego komentarza. Hipoteza opiera się głównie na następujących spostrzeżeniach [85]: 1. wszystkie antygeny grasiczniezależne posiadają własności poliklonalnych aktywatorów limfocytów B, tzn. że w odpowiednio wysokich stężeniach zdolne są do pobudzenia wszystkich limfocytów B bez względu na swoistość IgR, 2. myszy niezdolne z genetycznych względów do odpowiedzi na LPS (lipopolisacharyd) nie są również zdolne do odpowiedzi na determinanty antygenowe sztucznie z innymi aktywatorami. Według hipotezy jednego sygnału (ryc. 2) lim-



Rys. 2. Ilustracja hipotezy „jednego sygnału” dla aktywacji limfocytów B

I. Grasiczniezależne antygeny zdolne są do pobudzenia każdego limfocyta B (np. 1 i 2) pod warunkiem, że stężenie antygeny jest dostatecznie duże. Przy niższych stężeniach antygen wiążąc się z IgR swoistymi dla antygeny koncentruje się na powierzchni odpowiedniego limfocyta B, który tym samym ulega pobudzeniu (tzn. limfocyt 1, ale nie 2); II. Grasiczozależne antygeny wiążąc się ze swoistymi dla nich IgR powodują, że swoiste czynniki pomocnicze wydzielone przez odpowiednio swoiste dla tego antygeny limfocyty Th łączą się głównie z limfocytym B zawierającym swoiste IgR i antygen (tzn. z limfocytym 3, a nie 4). Przy dużym stężeniu czynników pomocniczych mogą one pobudzać wszystkie limfocyty B (tzn. np. 3 i 4)

focyt B aktywowany jest przez czynnik wydzielany przez limfocyty Th (pomocnicze limfocyty T) w przypadku odpowiedzi na antygen grasiczozależny, natomiast w przypadku odpowiedzi na antygen grasiczozależny przez czynnik stanowiący integralną część antygeny. Receptory immunoglobulinowe służyłyby tylko do tworzenia pomostu między limfocytami B i związanym z antygenem czynnikiem aktywującym oraz do „zagęszczania” czynników aktywujących na powierzchni limfocyta B. Ponieważ czynnik pomocniczy limfocyta Th ma podobnie jak immunoglobuliny zdolność swoistego wiązania antygeny [41], to w odpowiedzi na antygen grasiczozależny wspomaga on (aktywuje) tylko te limfocyty B, które związały określony antygen. Dzieje się tak dlatego, że czynnik przyłączając się do antygenów związanych uprzednio przez IgR odpowiedniego klonu limfocytów B aktywuje te właśnie limfocyty B. Jeżeli przytoczone rozważania są słuszne, to należy spodziewać się, że odpowiednio wysokie stężenie swoistych czynników pomocniczych wydzielonych przez limfocyty Th spowoduje podobny skutek jak poliklonalne aktywatory limfocytów B, gdyż czynniki wejdą w kontakt ze wszystkimi limfocytami B bez względu na swoistość ich IgR. Doświadczenia potwierdziły to przypuszczenie [19, 41], co jest jeszcze jednym pośrednim argumentem przemawiającym za hipotezą jednego sygnału, choć oczywiście nie może stanowić dowodu jej słuszności.

RECEPTORY LIMFOCYTÓW T WIAŻĄCE ANTYGEN

Limfocyty T mają receptory zdolne do swoistego wiązania antygeny [1]. Pomocnicze limfocyty T (Th) kooperują z limfocytami B w odpowiedzi typu humoralnego, supresorowe limfocyty T (Ts) hamują odpowiedź tego rodzaju, a cytotoksyczne limfocyty T zabijają określone komórki docelowe. Wszystkie te procesy mają charakter swoisty. Dotychczas jednak struktura receptorów limfocytów T budzi kontrowersje. Standardowymi metodami, tj. za pomocą znakowanych fluorochromami przeciwciał, nie można wykryć receptorów immunoglobulinowych (IgR) na powierzchni limfocytów [65, 137]. Z tego powodu wykrycie IgR na powierzchni limfocytów ludzkich za pomocą bezpośredniej metody immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom jest na ogół przyjmowane jako dowód przynależności do limfocytów B. Przy użyciu bardziej czułych metod, jak znakowanie białek powierzchni komórki radioaktywnym jodem, ich solubilizacja i wytrącenie swoistymi przeciwciałami przeciw immunoglobulinom, można wykryć IgR na powierzchni limfocytów T [4, 27, 45], przy czym

jest ich mniej niż na limfocytach B [134] i wydają się różne od analogicznych receptorów limfocytów B. Miejsca wiążące antygen w receptorach immunoglobulinowych limfocytów B i T są prawdopodobnie identyczne [10, 11]. Nie stwierdza się jednak obecności w IgR limfocytów T markerów charakterystycznych dla części stałych łańcuchów ciężkich. Być może są one różne od znanych nam markerów lub te części łańcuchów ciężkich są zagłębione w błonie komórkowej i tym samym niedostępne dla skierowanych przeciw nim przeciwciał [105]. Receptory limfocytów T wiążące antygen różnią się również funkcjonalnie od analogicznych receptorów limfocytów B. Limfocyty T rozpoznają bowiem pewne antygeny, na przykład antygeny wirusowe, słabe antygeny transplantacyjne w powiązaniu z silnymi antygenami zgodności tkankowej [131, 142]. W następstwie zakażenia myszy wirusem lub uczulenia syngenicznymi (tj. pochodzącymi od zwierzęcia tego samego szczepu wsobnego) komórkami transformowanymi wirusem, powstają cytotoksyczne limfocyty T zdolne do lizy autogenicznych (tj. własnych) i syngenicznych, lecz nie allogenicznych komórek wirusowych transformowanych tym wirusem. Aby wytłumaczyć to zjawisko, przyjęto hipotezę, że dla zaistnienia cytotoksyczności konieczna jest zgodność między cytotoksycznymi limfocytami T i transformowanymi wirusem komórkami docelowymi w zakresie antygenów głównego systemu zgodności tkankowej (MHC), czyli u myszy systemu H-2. Dla zjawiska tego przyjęto termin „ograniczenie zależne od H-2” (H-2 restrykcja). Wykazano w badaniach kooperacji limfocytów T i B oraz limfocytów T i makrofagów w procesie odpowiedzi immunologicznej, że skuteczna kooperacja zachodzi tylko w przypadku zgodności obu populacji komórek w zakresie systemu H-2, a konkretnie genów regionu I u myszy [30, 110]. Okazało się także, że jako „własne” rozpoznają limfocyty T komórki docelowe posiadające antygeny transplantacyjne obecne na komórkach nabłonkowych grasicy, w której limfocyty T dojrzewały [141, 153]. W dalszych pracach wykazano, że tzw. „H-2 restrykcja” (albo ogólniej „MHC restrykcja”) nie jest całkowita i raczej można mówić o „H-2 preferencji”, gdyż okazuje się, że limfocyty T uczulone transformowanymi wirusem komórkami syngenicznymi zdolne są w pewnym stopniu również do cytotoksycznej odpowiedzi przeciw allogenicznym komórkom docelowym transformowanym tym wirusem [20, 24, 77] i że kooperacja między limfocytami T i B oraz limfocytami T i makrofagami w układzie allogenicznym jest możliwa [133]. Nie wiadomo dotychczas czy „H-2 restrykcja” polega na zgodności między cytotoksycznymi limfocytami T i transformowanymi wirusem komórkami docelowymi, czy też po prostu na zgodności między komórkami docelowymi i komórkami użytymi pierwotnie do immunizacji. Istnieją bowiem doniesienia su-

gerujące, że indukcja odpowiedzi cytotoksycznej *in vivo* nie podlega „H-2 restrykcji”, a obserwuje się jedynie, że cytotoksyczne limfocyty T będą skutecznie zabijać komórki docelowe zgodne pod względem antygenów systemu H-2 z komórkami pierwotnie użytymi do immunizacji [77].

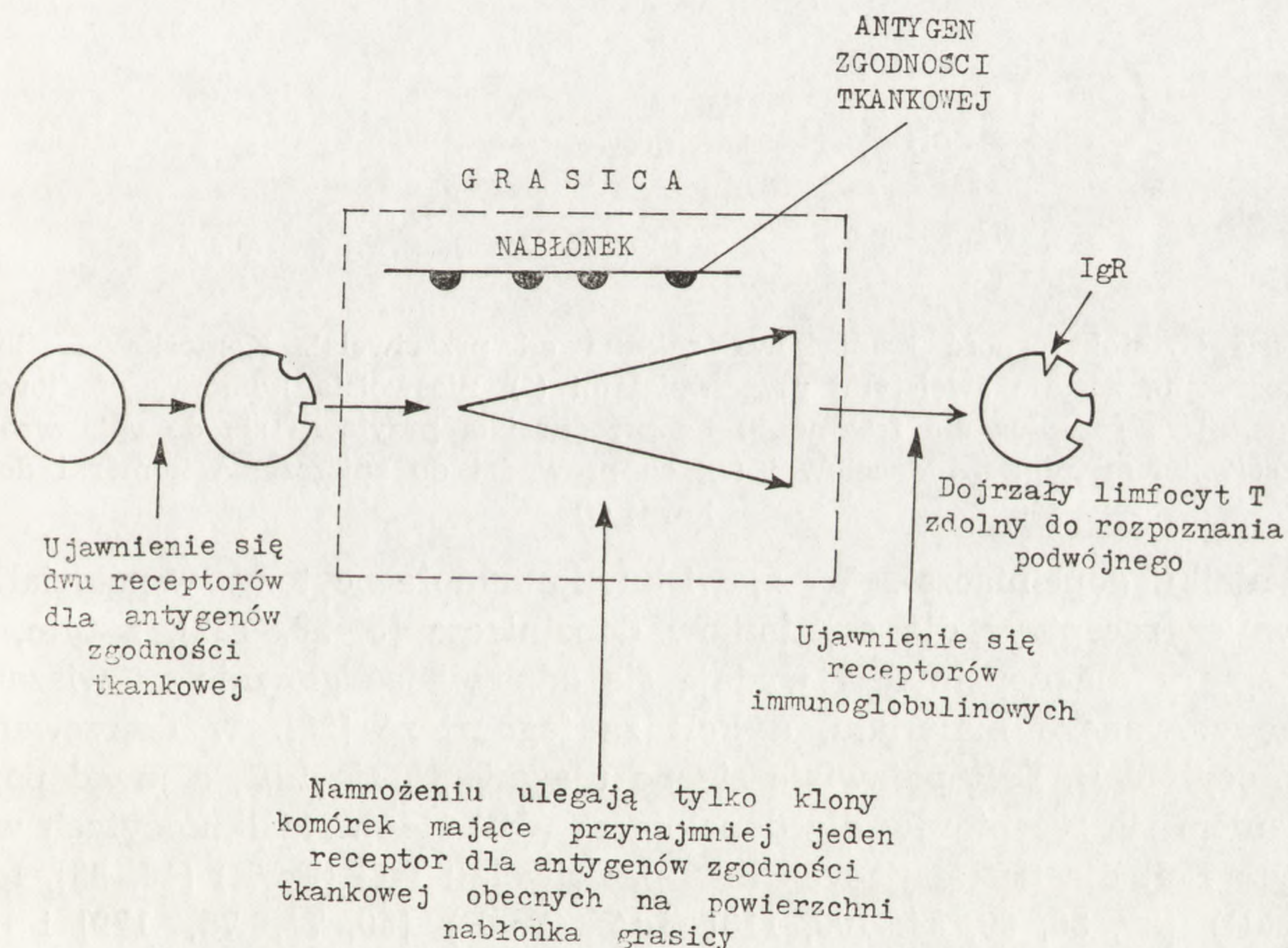
Zjawisko „H-2 restrykcji” próbuje się tłumaczyć dwiema alternatywnymi hipotezami: 1. hipotezą „zmiany własnych antygenów” („altered self”) i 2. hipotezą „podwójnego rozpoznania” („dual recognition”). Pierwsza z nich zakłada, że antygen wirusowy reaguje z silnym antygenem zgodności tkankowej i dopiero wtedy zmieniony tym antygenem zgodności tkankowej jest rozpoznawany przez receptor cytotoksycznego limfocyta T. Druga hipoteza zakłada, że dla istnienia efektu cytotoksycznego konieczne jest aby limfocyt T połączył się dwoma różnymi receptorami odpowiednio z silnym antygenem zgodności tkankowej i z antygenem wirusowym.

Antygeny wirusowe tworzą rzeczywiście kompleksy z antygenami H-2 [12], a komórki mające na swej błonie antygeny wirusowe, a nie posiadające antygenów H-2, nie są — według niektórych doniesień — wrażliwe na działanie cytotoksycznych limfocytów T [154]. Zjawisko „H-2 restrykcji” skłania do przypuszczenia, że limfocyty T w odpowiedzi na pewne antygeny, na przykład wirusowe, rozpoznają równocześnie antygeny należące do głównego systemu zgodności tkankowej. Cytotoksyczne limfocyty T reagując z antygenami wirusowymi rozpoznają równocześnie antygeny H-2K i H-2D, a pomocnicze limfocyty T odpowiadając na inne antygeny rozpoznają równocześnie antygeny Ia [153]. Wydaje się, że na powierzchni limfocytów T istnieją dwa typy receptorów wiążących antygen. Jeden z nich to receptory immunoglobulinowe (IgR), drugi zaś reprezentuje receptory, których nie można wykryć znakowanymi przeciwciałami skierowanymi przeciw immunoglobulinom.

Przyjęcie teorii podwójnego rozpoznania, przy założeniu dwu receptorów dla antygenów głównego systemu zgodności tkankowej, posłużyło do zaproponowania trzyreceptorowego modelu namnażania limfocytów T (ryc. 3). Wyjaśnia on wybiórcze namnażanie klonów limfocytów T rozpoznających własne antygeny grasicy za pomocą nieimmunoglobulinowych receptorów [145]. Jak wynika z rysunku, wprawdzie dojrzałe limfocyty zdolne są zawsze do rozpoznania własnych antygenów zgodności tkankowej, to jednak niektóre z nich zdolne są także do rozpoznania określonego alloantygeny za pomocą drugiego receptora nieimmunoglobulinowego. Ze względu na dużą różnorodność receptorów zgodności tkankowej obecność na powierzchni jednego limfocyta dwu nieimmunoglobulinowych receptorów przeciw własnym antygenom jest rzadka.

RECEPTORY DLA FRAGMENTU Fc PRZECIWCIAŁ

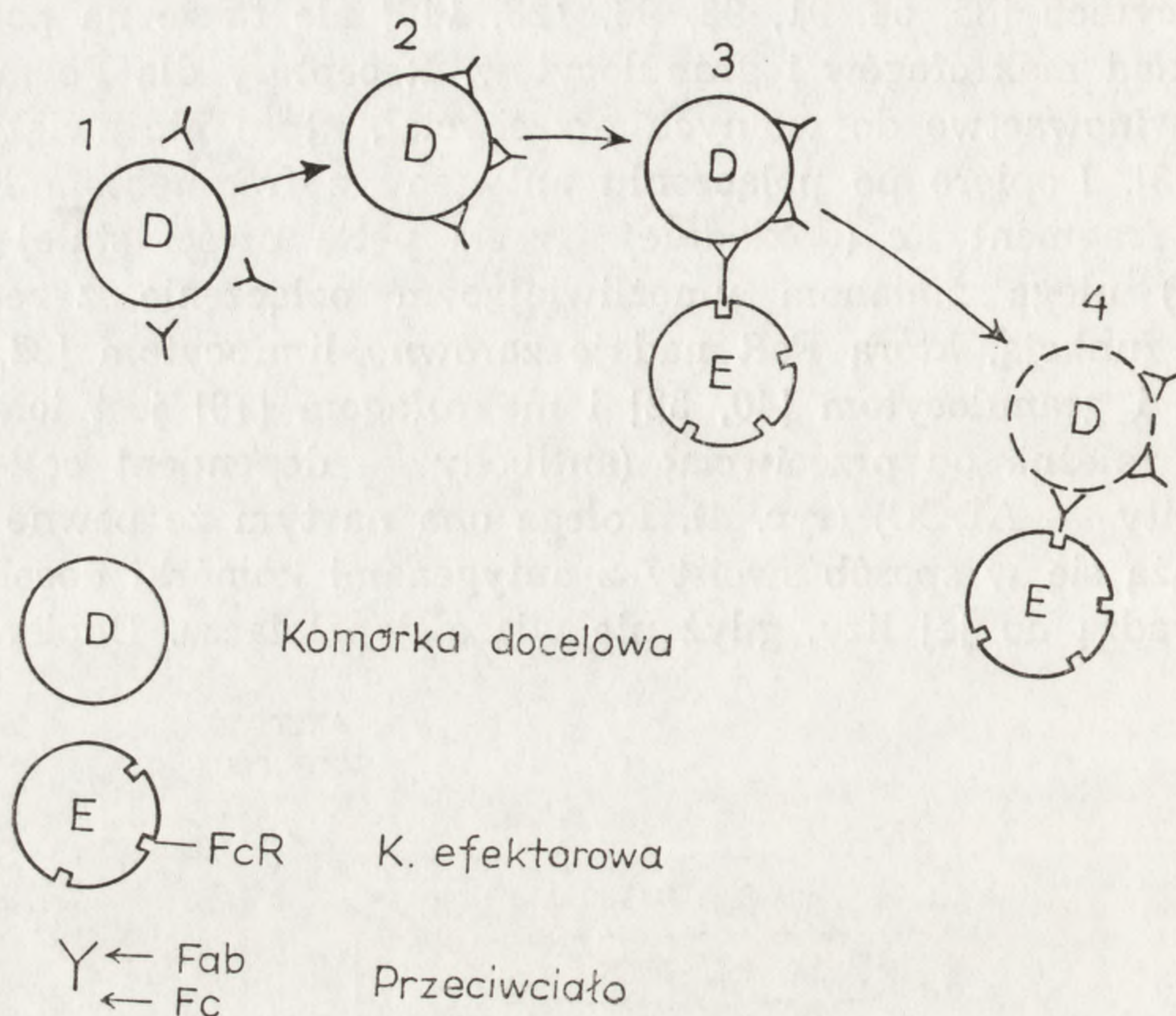
Receptory dla fragmentu Fc przeciwciał (FcR) występują nie tylko na limfocytach [35, 54, 91, 92, 96, 128, 146] ale także na powierzchni na przykład makrofagów i granulocytów. Receptory dla Fc mają tylko słabe powinowactwo do wolnych przeciwciał, które nie związały antygeny [103]. Dopiero po połączeniu antygeny z fragmentem Fab przeciwciała fragment Fc (dokładniej trzecia pętla części stałej łańcucha ciężkiego) ulega zmianom umożliwiającym połączenie z receptorem. Wspólną funkcją, którą FcR nadaje zarówno limfocytom [32, 67, 116, 117], jak i granulocytom [40, 52] i makrofagom [76] jest ich cytotoksyczność zależna od przeciwciał (antibody — dependent cell-mediated cytotoxicity — ADCC) (ryc. 4). Polega ona na tym że pewne przeciwciała wiążą się w sposób swoisty z antygenami komórki docelowej, ale nie prowadzą do jej lizy, gdyż nie wiążą dopełniacza. Dopiero przyłą-



Rys. 3. Schemat etapów dojrzewania limfocytów T [145]

czenie się komórek efektorowych mających receptor dla Fc do fragmentu Fc przeciwciał opłaszczających prowadzi do lizy komórki docelowej. Komórki efektorowe w tym przypadku odgrywają rolę, którą można porównać do roli dopełniacza w cytotoksyczności zależnej od przeciwciał wiążących dopełniacz. Wiązanie między komórką efektorową i opłaszczającymi przeciwciałami jest nieswoiste.

Inną funkcją, która zależna jest od FcR, ale która ujawnia się tylko w granulocytach i makrofagach jest immunofagocytoza [5, 28], czyli pochłanianie antygenów, które związały swoiste przeciwciała (i pewne



Rys. 4. Cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał. Komórka docelowa opłaszczona zostaje swoistymi przeciwciałami (2), nieswoista komórka efektorowa posiadająca receptor dla fragmentu Fc przeciwciała przyłącza się do opłaszczonej przeciwciałem komórki docelowej (3), co prowadzi do zniszczenia komórki docelowej (4)

składniki dopełniacza). W zjawisku immunofagocytozy współdziałają również receptory dla składników dopełniacza [5, 28, 122], z tym, że receptory dla dopełniacza wydają się odpowiadać głównie za wiązanie fagocytowanego materiału, a FcR za fagocytozę [28]. W dojrzewaniu limfocytów B, FcR pojawiają się po ujawnieniu się IgR, a przed pojawieniem się receptorów dla dopełniacza (CR) [148]. Na limfocytach wykryto FcR dla następujących klas przeciwciał: IgG (Fc γ R) [46, 83], IgM (Fc μ R) [35, 36, 66, 84, 109, 118] IgA (Fc α R) [50, 74, 75, 129] i IgE (Fc ϵ R) [38, 124, 149, 150]. Niektóre limfocyty wydają się również posiadać receptory dla fragmentu wydzielniczego przeciwciał klasy IgA [121]. Olbrzymia większość dojrzałych limfocytów B (około 90%) ma zarówno Fc γ R, jak i Fc μ R, [95]. Wśród limfocytów T około 20% posiada Fc γ R i około 75% Fc μ R, a pozostałe nie posiadają receptorów dla fragmentu Fc przeciwciał [86]. Limfocyty T posiadające Fc γ R odpowiadają supresorowym limfocytom T (Ts), natomiast posiadające

Fc μ R pomocniczym (Th) [88]. Receptory Fc γ R mają słabsze powinowactwo do fragmentu Fc i dłuższy okres półtrwania w błonie komórkowej w porównaniu z Fc μ R [87]. Receptory FcR występują również na powierzchni tzw. limfocytów trzeciej populacji [98]. Do tej grupy zalicza się limfocyty nie mające markerów limfocytów B ani T. Populację tę określano jako limfocyty N (null) [18] lub U (unidentified), lub L. Ta ostatnia nazwa pochodzi z podziału limfocytów ludzkich nie tworzących spontanicznych rozetek z erytrocytami owcy na: 1. limfocyty z IgR (limfocyty B), 2. limfocyty z immunoglobulinami związanymi mniej trwale przez FcR (membrane-Labile IgG receptors) [57, 58]. Nazwy te nie są najodpowiedniejsze, gdyż tylko bardzo niewiele limfocytów nie ma żadnych receptorów lub markerów i nawet limfocyty N mają między innymi FcR. Do limfocytów trzeciej populacji należą również tzw. komórki K (Killer) posiadające Fc γ R, receptory dla składników dopełniacza (CR) i zdolne do wspomnianej wcześniej cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał [117], a także komórki macierzyste limfocytów. FcR na powierzchni komórek K wydają się posiadać większą chwytliwość, są gęściej ułożone i odporne na działanie trypsyny w przeciwieństwie do FcR na powierzchni limfocytów B [90]. Jest rzeczą znamioną, że receptory Fc γ R izolowane z supresorowych limfocytów T mają własności hamowania odpowiedzi typu humoralnego [61, 89]. Wydaje się również, że limfocyty T mogą wychwytywać i lokalizować na swej powierzchni FcR uwolnione z makrofagów [70]. Traktowanie limfocytów przeciwciałami skierowanymi przeciw antygenom Ia u myszy lub HLA-D u człowieka blokuje receptory dla Fc [123, 127], co można tłumaczyć obecnością tych determinant antygenowych w cząsteczce receptora lub bliskim położeniem w błonie komórkowej antygeny i receptora.

RECEPTORY DLA SKŁADNIKÓW DOPEŁNIACZA

Receptory dla składników dopełniacza występują podobnie jak FcR zarówno w limfocytach [130], jak i na granulocytach i makrofagach [3, 101, 111]. Na tych ostatnich dwóch grupach komórek współdziałają one z FcR w immunofagocytozie [5].

Receptory dla składników dopełniacza (CR) występują głównie na powierzchni limfocytów B [83], ale także na limfocytach T [120]. Wydaje się, że obecność CR nadaje limfocytom B zdolność do odpowiedzi na antygeny grasiczozależne [71]. Rozróżniamy dwa receptory dla składników dopełniacza: CR1 i CR2. Receptor CR1 ma zdolność łączenia się ze składnikami dopełniacza C3b i C4b, natomiast CR2 ze skła-

dnikiem C3d [100, 112], który powstaje z C3b pod wpływem aktywatora C3 i po odłączeniu się składnika C3c [100]. W trakcie różnicowania się komórek, najpierw pojawiają się CR2, a następnie CR1. W trakcie dalszego różnicowania komórek, CR2 przestają być wykrywane. Receptory dla C3 wiążą również składnik C5 dopełniacza [68], a ich czas odnowy w błonie wynosi około 3–4 godzin [113].

INNE RECEPTORY LIMFOCYTÓW

Limfocyty tworzą spontaniczne rozetki z erytrocytami. Choć odpowiedzialne za wiązanie erytrocytów receptory lub miejsca wiążące nie zostały dokładnie zbadane, zdolność do tworzenia spontanicznych rozetek przez limfocyty jest wykorzystywana do identyfikacji poszczególnych subpopulacji limfocytów. Tworzenie spontanicznych rozetek z normalnymi (nieopłaszczonymi przeciwciałami) erytrocytami owcy jest powszechnie używane do identyfikacji ludzkich limfocytów T [13, 21]. Rozetki takie określamy jako E w przeciwieństwie do rozetek tworzonych przez erytrocyty opłaszczone przeciwciałami (rozetki EA) lub przeciwciałami w obecności składników dopełniacza (rozetki EAC), które służą do wykrywania odpowiednio receptorów FcR i CR. Część limfocytów T tworzy rozetki już w ciągu pięciu minut w przeciwieństwie do pozostałych wymagających około 60 min inkubacji z erytrocytami owcy. Te pierwsze rozetki określane są jako „aktywne” [34, 147, 151]. Tworzy je subpopulacja limfocytów T posiadająca receptory o wysokiej chwytności dla erytrocytów owcy. Pewna subpopulacja ludzkich limfocytów T tworzy spontaniczne rozetki z własnymi (autogenicznymi) erytrocytami [16, 17], przy czym odsetek tych limfocytów maleje wraz z rozwojem nowotworu [17]. Ludzkie limfocyty T tworzą spontaniczne rozetki z erytrocytami małpy rezus [72], a limfocyty B i limfocyty trzeciej populacji z erytrocytami małpy *Macaca speciosa* [93] i z erytrocytami mysimi [7, 47, 125].

Na powierzchni limfocytów występują również inne receptory, jak na przykład dla histaminy [114, 119], prostaglandyn [43], insuliny w przypadku pobudzonych limfocytów [55, 56], poly I:C [25], adenozyiny [80], ale znaczenie tych receptorów nie jest jeszcze dostatecznie poznane. Wiadomo, że histamina hamuje niektóre funkcje limfocytów, jak: cytotoksyczność limfocytów T, wydzielanie czynnika hamowania migracji makrofagów oraz produkcję przeciwciał [114]. Podobnie adenozyyna stymulując syntezę cAMP [80] również wpływa hamująco na różne funkcje limfocytów.

Na limfocytach B znajdują się receptory dla wirusa Ebstein-Barra (EBV) [44, 60], a na limfocytach T receptory dla wirusa odry [106] i dla

lektyny izolowanej ze ślimaka *Helix pomatia* [51]. Jak już wspomniano we wstępie obecność różnych receptorów na powierzchni limfocytów przyczynia się do ich łatwiejszego klasyfikowania, jak i identyfikacji wywodzących się z nich komórek nowotworowych [48]. Prawdopodobnie większość tych receptorów o często nieznanym znaczeniu obecna jest także na powierzchni niektórych innych komórek i tylko łatwość badania limfocytów przyczynia się do wykrywania na ich powierzchni tych receptorów.

LITERATURA

- [1] ALTMAN A., COHEN I. R., FELDMAN M., Normal T-cell receptors for alloantigens., *Cell. Immunol.*, **7**: 134–142, 1973.
- [2] ANDERSSON B., Studies on antibody affinity at the cellular level. Correlation between binding properties of secreted antibody and cellular receptor for antigen on immunological memory cells, *J. Exp. Med.*, **135**: 312–322, 1972.
- [3] ANWAR A. R. E., KAY A. B., Membrane receptors for IgG and complement (C4, C3b and C3d) on human eosinophils and neutrophils and their relation to eosinophilia, *J. Immunol.*, **119**: 976–982, 1977.
- [4] AVRAMAES S., HÖSLI P., STANISLAWSKI M., RODRIGOT M., VOGT E., A quantitative study at the single cell level of immunoglobulin antigenic determinants present on the surface of murine B and T lymphocytes, *J. Immunol.*, **122**: 648–659, 1979.
- [5] BAR-SHAVIT Z., RAZ A., GOLDMAN R., Complement and Fc receptor-mediated phagocytosis of normal and stimulated mouse peritoneal macrophages, *Europ. J. Immunol.*, **9**: 385–391, 1979.
- [6] BELLANTI J. A., *Immunology: Basic Processes*. Saunders, Philadelphia 1979.
- [7] BERTOGLIO J., THIERRY C., FLORES G., BOUCHAREL C., DORE J. F., Mouse red cell rosette formation of human lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **120**: 411–413, 1978.
- [8] BHATTACHARJEE A. K., GLAUDEMANS C. P. J., Dual binding specificities in MOPC 384 and 870 murine myeloma immunoglobulins, *J. Immunol.*, **120**: 411–413, 1978.
- [9] BINZ H., LINDENMANN J., Cellular receptors: binding of radioactively labeled anti-alloserum. *J. Exp. Med.*, **136**: 827–884, 1972.
- [10] BINZ H., WIGELL H., Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. 2. Determination of frequency and characteristics of idiotypic T and B lymphocytes in normal rats using direct visualization, *J. Exp. Med.*, **142**: 1218–1230, 1975.
- [11] BINZ H., WIGZELL H., Shared idiotypic determinants on B and T lymphocytes reactive against the same antigenic determinants. 5. Biochemical and serological characteristics of naturally occurring, soluble antigen-binding T-lymphocyte-derived molecules, *J. Immunol.*, **5**: 559–571, 1976.
- [12] BLANK K. J., LILLY F., Evidence for an H-2/viral protein complex on the cell surface as the basis for the H-2 restriction of cytotoxicity, *Nature*, **269**: 808–809, 1977.

- [13] BRAIN P., GORDON J., WILLETTS W. A., Rosette formation by peripheral lymphocytes, *Clin. exp. Immunol.*, **6**: 681-688, 1970.
- [14] BRETSCHER P. A., The two signal model for B cell induction, *Transplantation Rev.*, **23**: 37-48, 1975.
- [15] BRUYNS C., URBAIN-VANSANTEN G., PLAUARD C., De-CLOTENS C., URBAIN J., Ontogeny of mouse lymphocyte and inactivation by antigen of early B lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **73**: 2462-2466, 1976.
- [16] CARAUX J., THIERRY C., ESTEVE C., FLORES G., LODISE R., SERROU B., Human autologous rosettes. 1. Mechanism of binding of autologous erythrocytes by T cells, *Cell. Immunol.*, **45**: 36-48, 1979.
- [17] CARAUX J., THIERRY C., SERROU B., Human autologous rosettes. 2. Prognostic significance of variations in autologous rosette-forming cells in the peripheral blood of cancer patients, *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**: 593-597, 1979.
- [18] CHESS T., LEVINE H., MacDERMOTT R. P., SCHLOSSMAN S. F., Immunologic functions of isolated human lymphocyte subpopulations. 6. Further characterization of the surface Ig-negative, E rosette negative (null cell) subset, *J. Immunol.*, **115**: 1483-1487, 1975.
- [19] CHIORAZZI N., FU S. M., KUNKEL H. G., Induction of polyclonal antibody synthesis by human allogeneic and autologous helper factors, *J. Exp. Med.*, **149**: 1543-1548, 1979.
- [20] COLLAVO D., PARENTI A., BIASI G., CHIECO-BIANCHI L., COLOMBATTI A., Secondary in vitro generation of cytolytic T-lymphocytes (CTL's) in the murine sarcoma virus system: virus-specific CTL induction across the H-2 barrier, *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**: 885-890, 1978.
- [21] COOMBS R. R. A., GURNER B. W., WILSON A. B., HOLM G., LINDGREN B., Rosette formation between human lymphocytes and sheep red cells not involving immunoglobulin receptors, *Int. Arch. Allergy*, **39**: 658-663, 1970.
- [22] COUDERC J., BLEUX C., VENTURA M., LIACOPOULOS P., Single mouse cells producing two antibody molecules and giving rise to antigen-driven intracellular variation after immunization with two unrelated antigens, *J. Immunol.*, **123**: 173-181, 1979.
- [23] CZAJA M. J., RICHARDS F. F., VARGA J. M., Multispecific lymphoid cell surface receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **74**: 1224-1228, 1977.
- [24] DEVENS B., NAOR D., Immune responses to weakly immunogenic virally induced tumors. 3. Genetically unrestricted cytotoxicity of allogeneic tumor target cells, *J. Immunol.*, **122**: 1397-1401, 1979.
- [25] DIAMENTSTEIN T., BLITSTEIN-WILLINGER E., Specific binding of poly (I)-poly (C) to the membrane of murine B lymphocyte subsets, *Europ. J. Immunol.*, **8**: 896-899, 1978.
- [26] DIENER E., PAETKAU V. H., Antigen recognition: early surface-receptor phenomena induced by binding of a tritium-labeled antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **69**: 2364-2368, 1972.
- [27] DWYER J. M., WARNER N. L., MACKAY I. R., Specificity and nature of the antigen-combining sites of fetal and mature thymus lymphocytes, *J. Immunol.*, **108**: 1439-1446, 1972.
- [28] EHLENBERGER A. G., NUSSENZWEIG V., The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis, *J. Exp. Med.*, **145**: 357-371, 1977.
- [29] ENGERS H. D., UNANUE E. R., The fate of anti-Ig-surface Ig complex on B lymphocytes, *J. Immunol.*, **110**: 465-475, 1973.

- [30] ERB P., MEIER B., FELDMANN M., Two-gene control of T-helper cell induction, *Nature* **263**: 601-604, 1976.
- [31] ESKINAZI D. P., BESSINGER B. A., McNICHOLAS J. M., LEARY A. L., KNIGHT K. L., Expression of an unidentified immunoglobulin isotype on rabbit Ig-bearing lymphocytes, *J. Immunol.*, **122**: 1469-1474, 1979.
- [32] EVANS R. L., CHESS L., LEVINE H., SCHLOSSMAN S. F., Antibody-dependent cellular cytotoxicity by allosensitized human T cells, *J. Exp. Med.*, **605-610**, 1978.
- [33] FEITELSON M. A., ASHMAN R. F., "Stop and go" kinetics of receptor movements induced by anti-Ig or antigen on individual lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **34**: 310-318, 1977.
- [34] FELSBURG P. J., EDELMAN R., GILMAN R. H., The active E rosette test: correlation with delayed cutaneous hypersensitivity, *J. Immunology*, **116**: 1110-1114, 1976.
- [35] FERRARINI M., HOFFMAN T., FU S. M., WINCHESTER R., KUNKEL H. G., Receptors for IgM on certain human B lymphocytes, *J. Immunol.*, **119**: 1525-1529, 1977.
- [36] FERRARINI M., MORETTA L., MINGARI M., TONDA P., PERNIS B., Human T cell receptor for IgM: specificity for the pentameric Fc fragment. *Europ. J. Immunology*, **6**: 520-521, 1976.
- [37] FINKELMAN F. D., LIPSKY P. E., The role of cell membrane immunoglobulin in primate B lymphocyte differentiation, *Immunol. Rev.*, **45**: 117-139, 1979.
- [38] FRITSCHÉ R., SPIEGELBERG H. L., Fc receptors for IgE on normal rat lymphocytes, *J. Immunol.*, **121**: 471-478, 1978.
- [39] FRØLAND S., NATVIG J. B., Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers, *Transplant. Rev.*, **16**: 114-162, 1973.
- [40] GALE R. P., ZIGHELBOIM J., Modulation of polymorphonuclear leukocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Immunol.*, **113**: 1793-1800, 1974.
- [41] GEHA R. S., Regulation of human B cell activation, *Immunol. Rev.*, **45**: 275-305, 1979.
- [42] GODING J. W., LAYTON J. E., Antigen-induced co-capping of IgM and IgD-like receptors on murine B cells, *J. Exp. Med.*, **144**: 852-857, 1976.
- [43] GOODWIN J. S., WILK A., LEWIS M., BANHURST A. D., WILLIAMS R. G., High-affinity binding sites for prostaglandin E on human lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **43**: 150-159, 1979.
- [44] GREAVES M. F., BROWN G., RICKINSON A. B., Epstein-Barr virus binding sites on lymphocyte subpopulations and the origin of lymphoblasts in cultured lymphoid cell lines and in the blood of patients with infectious mononucleosis, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **3**: 514-524, 1975.
- [45] GREY H. M., COLON S., CAMPBELL P., RABELLINO E., Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. 5. Quantitative studies on the question of whether immunoglobulins are associated with T cells in the mouse, *J. Immunol.*, **109**: 776-783, 1972.
- [46] GREY H. M., KUBO R. T., CEROTTINI J. C., Thymus derived T cell immunoglobulins. Presence of a receptor site for IgG and absence of large amounts of "buried" Ig determinants on T cells, *J. Exp. Med.*, **136**: 1323-1328, 1972.
- [47] GUPTA S., GRIECO M. H., Rosette-formation with mouse erythrocytes:

- probable marker for human B lymphocytes. *Int. Arch. Allergy*, **49**: 734-742, 1975.
- [48] GUPTA S., GOOD A., Markers of human lymphocyte subpopulations in primary immunodeficiency and lymphoproliferative disorders, *Seminars in Hematology*, **17**: 1, 1980.
- [49] GUPTA S., PAHWA R., O'REILLY R., GOOD R. A., SIEGAL F. P., Ontogeny of lymphocyte subpopulations in human liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **73**: 919-922, 1976.
- [50] GUPTA S., PTATSOUDES C. D., SCHULOF R. S., GOOD R. A., Receptors for IgA on subpopulation of human T and B lymphocytes, *Cell. Immunol.*, **45**: 469-470, 1979.
- [51] HAMMARSTRÖM S., HELLSTRÖM U., PERLMANN P., DILLNER M. L., A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood, *J. Exp. Med.*, **138**: 1270-1275, 1973.
- [52] HAFEMAN D. G., LUCAS Z. J., Polymorphonuclear leukocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against tumor cells: dependence on oxygen and the respiratory burst, *J. Immunol.*, **123**: 55-62, 1979.
- [53] HAYWARD A. R., SIMONS M. A., LAWTON A. R., COOPER M. D., Pre-B and B cells in rabbits. Ontogeny and allelic exclusion of kappa light chain genes, *J. Exp. Med.*, **148**: 1367-1377, 1978.
- [54] HÄYRY P., ANDERSSON L. C., Functional significance of the Fc receptor on mixed lymphocyte culture activated T blasts, *Cell. Immunol.*, **25**: 237-244, 1976.
- [55] HELDERMAN J. H., REYNOLDS T. C., STROM T. B., The insulin receptor as a universal marker of-activated lymphocytes. *Europ. J. Immunol.*, **8**: 589-595, 1978.
- [56] HELDERMAN H., STROM T. B., Specific insulin binding site on T and B lymphocytes as a marker of cell activation, *Nature*, **274**: 62-63, 1978.
- [57] HOROWITZ D. A., GARRETT M. A., Destructive functional properties of human blood L lymphocytes: a comparison with T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes, *J. Immunol.*, **118**: 1712-1721, 1977.
- [58] HOROWITZ D. A., LOBO P. I., Characterization of two populations of human lymphocytes bearing easily detectable surface immunoglobulins, *J. Clin. Invest.*, **56**: 1464-1472, 1975.
- [59] ISAC R., MOZES E., Antigen-specific T cell factors: a fine analysis of specificity, *J. Immunol.*, **118**: 584-588, 1977.
- [60] JONDAL M., KLEIN G., Surface markers on human B and T lymphocytes. 2. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 1365-1378, 1973.
- [61] JOSKOWICZ M., RABOURDIN-COMBE C., NEDUPORT-SAUTES C., FRIDMAN W. H., Characterization of a suppressive immunoglobulin-binding factor (IBF). 3. Biochemical and immunochemical characteristics of IBF produced by activated T cells, *J. Immunol.*, **121**: 777-783, 1978.
- [62] KARNOVSKY M. J., UNANUE E. R., LEVENTAHL M., Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. 2. Mapping of surface moieties, *J. Exp. Med.*, **136**: 907-930, 1972.
- [63] KARNOVSKY M. J., UNANUE E. R., Mapping and migration of lymphocyte surface macromolecules, *Fed. Proc.*, **32**: 55-59, 1973.
- [64] LALA P. K., LAYTON J. E., NOSSAL G. J. V., Maturation of B lymphocytes. 2. Sequential appearance of increasing IgM and IgD in the adult bone marrow, *Europ. J. Immunol.*, **9**: 39-44, 1979.

- [65] LAMELIN J. P., LISOWSKA-BERNSTEIN B., MATTER A., RYSER J. E., VASSALLI P., Mouse thymus-independent and thymus-derived lymphoid cells. 1. Immunofluorescent and functional studies, *J. Exp. Med.*, **136**: 984-1007, 1972.
- [66] LAMON E. W., ANDERSSON B., WHITTEN H. D., HURST M. M., GHANTA V., IgM complex receptors on subpopulations of murine lymphocytes, *J. Immunol.*, **116**: 1199-1203, 1976.
- [67] LAMON E. W., WHITTEN H. D., SKURZAK H. M., ANDERSSON B., LIDIN B., IgM antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney Sarcoma Virus system: The involvement of T and B lymphocytes as effector cells, *J. Immunol.*, **115**: 1288-1294, 1975.
- [68] LANDEN B., DIERICH M. P., Identity of C3 and C5 receptors on lymphoid cells., *J. Immunol.*, **122**: 1015-1017, 1979.
- [69] LAWTON A. R., COOPER M. D., Lymphoid differentiation: an ontogenic perspective, *Transplant. Proc.*, **10**: 689-693, 1979.
- [70] LEE S. T., PARASKEVAS F., Macrophage — T cell interactions. 1. The uptake by T cells of Fc receptors released from macrophages, *Cell. Immunol.*, **40**: 141-153, 1978.
- [71] LEWIS G. K., RANKEN R., NITECKI D. E., GOODMAN J. W., Murine B-cell subpopulations responsive to T-dependent and T-independent antigens, *J. Exp. Med.*, **144**: 382-397, 1976.
- [72] LOHRMAN H. P., NOVIKOV L., Rosette formation between human T-lymphocytes and unsensitized rhesus monkey erythrocytes, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **3**: 99-111, 1974.
- [73] LOOR F., FORNI L. PERNIS B., The dynamic state of the lymphocyte membrane. Factors affecting the distribution and turnover of surface immunoglobulins, *Europ. J. Immunology*, **2**: 203-212, 1972.
- [74] LUM L. G., MUCHMORE A. V., O'CONNOR N., STROBER W., BLEASE R. M., Fc receptors for IgA on human B, and human non-B, non-T lymphocytes, *J. Immunol.*, **123**: 714-719, 1979.
- [75] LUM L. G., MUCHMORE A. V., KOREN D., DECKER J., KOSKI I., STROBER W., BEASE R. M., A receptor for IgA on human T lymphocytes, *J. Immunol.*, **122**: 65-69, 1979.
- [76] MANTOVANI A., CAPRIOLI V., GRITTI P., SPREAFICO F., Human mature macrophages mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity on tumor cells, *Transplantation*, **24**: 291-293, 1977.
- [77] MATZINGER P., Induction of H-2 restricted cytotoxic T cells: in vivo induction has the appearance of being unrestricted, *Cell. Immunol.*, **33**: 92-100, 1977.
- [78] MARCHALONIS J. J., CONE R. E., ATWELL J. I., Isolation and partial characterization of lymphocyte surface immunoglobulins, *J. Exp. Med.*, **135**: 956-971, 1972.
- [79] MARTIN L. N., LESLIE G. A., In vivo effects of antiserum to IgD on surface immunoglobulins, serum immunoglobulins and lymphocyte blastogenesis in rhesus monkeys, *Immunology*, **37**: 253-262, 1979.
- [80] MARONE G., PLAUT M., LICHTENSTEIN L. M., Characterization of a specific adenosine receptor on human lymphocytes, *J. Immunol.*, **121**: 2153-2159, 1978.
- [81] MELCHER U., UHR J. W., An electrophoretic difference between surface and secreted IgM of murine splenocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 1282-1287, 1973.
- [82] MELCHORS F., B lymphocyte development in fetal liver. 1. Development

- of reactivities to B cell mitogens "in vivo" and "in vitro", *Europ. J. Immunol.* **7**: 476-481, 1977.
- [83] McCONNELL I., HURD C. M., Lymphocyte receptors. 1. Receptors for Fc of IgG and complement (C3b) on immunoglobulin-bearing, antigen-binding and antibody-secreting cells, *Immunology*, **30**: 825-833, 1976.
- [84] McCONNELL I., HURD C. M., Lymphocyte receptors. 2. Receptors for rabbit IgM on human T lymphocytes, *Immunology*, **30**: 835-839, 1976.
- [85] MÖLLER G., One non-specific signal triggers B lymphocytes. *Transplant. Rev.*, **23**: 126-137, 1975.
- [86] MORETTA L., FERRARINI M., MINGARI M. C., MORETTA A., WEBB S. R., Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness, *J. Immunol.*, **117**: 2171-2174, 1976.
- [87] MORETTA L., MINGARI M. C., MORETTA A., Human T cell subpopulations in normal and pathologic conditions, *Immunol. Rev.*, **45**: 163-193, 1979.
- [88] MORETTA L., WEBB S. R., GROSSI C. E., LYDYARD P. M., COOPER M. D., Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG, *J. Exp. Med.*, **146**: 184-200, 1977.
- [89] NEAUPORT-SAUTES C., RABOURDIN-COMBE C., FRIDMAN W. H., T-cell hybrids bear Fc γ receptors and secrete immunoglobulin binding factor, *Nature*, **277**: 656-659, 1979.
- [90] PANG G., WILSON J. D., Different rosette assays for detecting Fc receptor-bearing lymphocytes measure different subpopulations, *Immunology*, **35**: 407-414, 1978.
- [91] PARASKEVAS F., LEE S. T., ORR K. B., ISRAELS L. G., A receptor for Fc on mouse B-lymphocytes, *J. Immunol.*, **108**: 1319-1327, 1972.
- [92] PARASKEVAS F., ORR K. B., ANDERSON E. D., LEE S. T., ISRAELS L. G., The biologic significance of Fc receptor on mouse B-lymphocytes, *J. Immunol.*, **108**: 1729-1732, 1972.
- [93] PELLEGRINO M. A., FERRONE S., THEOFILOPOULOS A. N., Rosette formation of human lymphoid cells with monkey red blood cells, *J. Immunology*, **115**: 1065-1071, 1975.
- [94] DePETRIS S., RAFF M. C., Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy, *Nature New Biol.*, **241**: 257-259, 1973.
- [95] PICHLER W. J., BRODER S., Fc-IgM and Fc-IgG receptors on human circulating B lymphocytes, *J. Immunol.*, **121**: 887-890, 1978.
- [96] PICHLER W. J., GENDELMAN F. W., NELSON D. L., Fc receptors on human T lymphocytes. 2. Cytotoxic capabilities of human T γ , T μ and L cells, *Cell. Immunol.*, **42**: 410-417, 1979.
- [97] PICHLER W. J., LUM L., BRODER S., Fc receptors on human T lymphocytes 1. Transition of T γ to T μ cells, *J. Immunol.*, **121**: 1540-1548, 1978.
- [98] PRIMI D., LEWIS G. K., TRIGLIA R., GOODMAN J. W., Rosette formation between murine lymphocytes and erythrocytes, *J. Exp. Med.*, **149**: 1349-1359, 1979.
- [99] PTAK W., *Podstawy immunologii*, PZWL, Warszawa 1976.
- [100] RABELLINO E. M., ROSS G. D., POLLEY M. J., Membrane receptors of mouse leukocytes. 1. Two types of complement receptors for different regions of C 3, *J. Immunol.*, **120**: 879-885, 1978.

- [101] RABELLINO E. M., ROSS G. D., TRANG H. T. K., WILLIAMS N., METCALF D., Membrane receptors of mouse leukocytes. 2. Sequential expression of membrane receptors and phagocytic capacity during leukocyte differentiation, *J. Exp. Med.*, **147**: 434-445, 1978.
- [102] RAFF M. C., DePETRIS S., Movement of lymphocyte surface antigens and receptors: the fluid nature of the lymphocyte plasma membrane and its immunological significance, *Fed. Proc.*, **32**: 48-54, 1973.
- [103] RAMASAMY R., RICHARDSON N. E., FEINSTEIN A., The specificity of the Fc receptor on murine lymphocytes for immunoglobulins of the IgG and IgM classes, *Immunology*, **30**: 851-858, 1976.
- [104] RINDGÉN B., RYNNEL-DAGÖÖ B., KUNORI T., SMITH C. I. E., HAMMARSTRÖM L., FREIJ D. A., MÖLLER E., Induction of antibody synthesis in human B lymphocytes by different polyclonal B cell activators: evaluation by direct and indirect PFC assays, *Immunol. Rev.*, **45**: 194-218, 1979.
- [105] ROELANTS G. E., RYDÉN A., HÄGG L. B., LOOR F., Active synthesis of immunoglobulin receptors for antigen by T lymphocytes, *Nature* **247**: 106-108, 1974.
- [106] ROITT I., *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 54-63, 1977.
- [107] ROITT I. M. *Podstawy immunologii*, PWN, 1977.
- [108] ROLLEY R. T., MARCHALONIS J. J., Dynamics of receptor and antigen interaction at the lymphocyte, *Transplant. Proc.*, **5**: 71-74, 1973.
- [109] ROMAGNANI S., MAGGI E., BIAGIOTTI R., GUIDIZI G. M., AMADON A., RICCI M., Receptors for IgM: a feature of subpopulations of both T and B human lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **32**: 324-332, 1978.
- [110] ROSENTHAL A. S., SHEVACH E. M., Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. 1. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 1194-1212, 1973.
- [111] ROSS G. D., JAROWSKI C. J., RABELLINO E. M., WINCHESTER R. J., The sequential appearance of Ia-like antigens and two different complement receptors during the maturation of human neutrophils, *J. Exp. Med.*, **147**: 730-744, 1978.
- [112] ROSS G. D., POLLEY M. J., Specificity of human lymphocyte complement receptors, *J. Exp. Med.*, **141**: 1163-1180, 1975.
- [113] ROSSO di San SECONDO V. E. M., MERONI P. L., FORTIS C., TEDESCO F., Study on the turnover of the receptors for the third component of complement on human lymphoid cells, *J. Immunol.*, **122**: 1658-1662, 1979.
- [114] ROSZKOWSKI W., PLAUT M., LICHTENSTEIN L. M., Selective display of histamine receptors on lymphocytes, *Science*, **195**: 683-685, 1977.
- [115] ROWE D. S., HUG K., FORNI L., PERNIS B., Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor, *J. Exp. Med.*, **138**: 965-972, 1973.
- [116] SAAL J. G., RIEBER E. P., HADAM M., RIETHMULLER G., Lymphocytes with T-cell markers cooperate with IgG antibodies in the lysis of human tumour cells, *Nature*, **265**: 158-160, 1977.
- [117] SANDILANS G., GRAY K., COONEY A., FROEBEL K., ANDERSON J. R., Human lymphocyte sub-populations and K cells, *Int. Archs. Allergy*, **50**: 416-426, 1976.
- [118] SANTANA V., Receptors for IgM on murine lymphoid cells, *Immunology*, **32**: 273-278, 1977.

- [119] SAXON A., MORLEDGE V. D., BONAVIDA B., Histamine-receptor lymphocytes (HRL). Organ and lymphoid subpopulation distribution in man, *Clin. Exp. Immunol.*, **28**: 394-399, 1977.
- [120] SCORZA SMERALDI R., SABBADINI VILLA M. G., PERUSSIA B., FABIO G., CASALI P., RUGARLI C., Expression of Fc and complement receptors on T lymphocytes activated in vitro by phytohaemagglutinin (PHA), *Immunology*, **32**: 827-830, 1977.
- [121] SETCAVAGE T. M., ROTHLEIN R., MUSCOPLAT C., KIM Y. B., A novel receptor for secretory component on porcine mononuclear cells, *Cell. Immunol.*, **27**: 47-51, 1976.
- [122] Van SNICK J. L., MASSON P. L., The effect of complement on the ingestion of soluble antigen-antibody complexes and IgM aggregates by mouse peritoneal macrophages, *J. Exp. Med.*, **148**: 903-914, 1978.
- [123] SOLHEIM B. G., THORSBY E., MÖLLER E., Inhibition of the Fc receptor of human lymphoid cells by antisera recognizing determinants of the HL-A system, *J. Exp. Med.*, **143**: 1568-1574, 1976.
- [124] SPIEGELBERG H. L., DAINER P. M., Fc receptors for IgG, IgM and IgE on human leukaemic lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **35**: 286-295, 1979.
- [125] STATHOPOULOS G., ELLIOT E. V., Formation of mouse or sheep red-blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukaemic individuals, *Lancet*, **2**: 600-601, 1974.
- [126] STERN C., McCONNEL I., Immunoglobulin M and D as antigen-binding receptors on the same cell, with shared specificity, *Europ. J. Immunol.*, **6**: 225-226, 1976.
- [127] STOUT R. D., MURPHY D. B., McDEVITT H. O., HERZENBERG L. A., The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. 4. Inhibition of binding of antigen-antibody complexes to Fc receptor-positive T cells by anti-Ia sera. *J. Exp. Med.*, **145**: 187-203, 1977.
- [128] STOUT R. D., WAKSAL S. D., HERZENBERG L. A., The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes. 3. Mixed lymphocyte reactivity and cell-mediated lympholytic activity of Fc⁻ and Fc⁺ T lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **144**: 54-68, 1976.
- [129] STROBER W., HAGUE N. E., LUM L. G., HENKART P. A., IgA-Fc receptors on mouse lymphoid cells, *J. Immunol.*, **121**: 2440-2445, 1978.
- [130] SUTER E. R., PROBST H., DUKOR P., The fine structure of complement-receptor lymphocytes in mice, *Europ. J. Immunol.*, **2**: 189-190, 1972.
- [131] SWIERKOSZ J. E., ROCK K., MRACK P., KAPPLER J. W., The role of H-2-linked genes in helper T-cell function. 2. Isolation on antigen-pulsed macrophages of two separate populations of F1 helper T cells each specific for antigen and one set of parental H-2 products, *J. Exp. Med.*, **147**: 554-570, 1978.
- [132] TAUSSIG M. J., FINCH A. P., Detection of acceptor sites on human lymphocytes for antigen-specific T cell factors, *Nature*, **270**: 151-154, 1977.
- [133] THOMAS D. W., SHEVACH E. M., Nature of the antigenic complex recognized by T lymphocytes : specific sensitization by antigens associated with allogeneic macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, **74**: 2104-2108, 1977.
- [134] UHR J. W., VITETTA E. S., Synthesis, biochemistry and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes, *Fed. Proc.*, **32**: 35-40, 1973.
- [135] UNANUE E. R., ENGERS H. D., KARNOVSKY M. J., Antigen receptors on lymphocytes, *Fed. Proc.*, **32**: 44-47, 1973.

- [136] UNANUE R., PERKINS W. D., KARNOVSKY M. J., Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. 1. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radioautography, *J. Exp. Med.*, **136**: 885–906, 1972.
- [137] VITETTA E. S., BIANCO C., NUSSENZWEIG V., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. 4. Distribution among thymocytes, bone marrow cells, and their derived populations, *J. Exp. Med.*, **136**: 81–93, 1972.
- [138] VITETTA E. S., CAMBIER J. C., LIGLER F. S., KETTMAN J. R., UHR J. W., B-cell tolerance. 4. Differential role of surface IgM and IgD in determining tolerance susceptibility of murine B cells, *J. Exp. Med.*, **146**: 1804–1808, 1977.
- [139] VITETTA E. S., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. 5 Release from murine splenic lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **136**: 676–696, 1972.
- [140] VITETTA E. S., UHR J. W., Cell surface immunoglobulin. 15. The presence of IgM and IgD-like molecules on the same cell in murine lymphoid tissue, *Europ. J. Immunol.*, **6**: 140–143, 1976.
- [141] WALDMANN H., POPE H., BETTLES C., DAVIES A. J. S., The influence of thymus on the development of MHC restrictions exhibited by T — helper cells, *Nature*, **277**: 137–138, 1979.
- [142] WALDMANN H., POPE H., BRENT L., BIGHOUSE K., Influence of the major histocompatibility complex on lymphocyte interactions in antibody formation, *Nature*, **274**: 166–168, 1978.
- [143] WERNET D., VITETTA E. S., UHR J. W., BOYSE E. A., Synthesis, intercellular distribution, and secretion of immunoglobulin and H-2 antigen in murine splenocytes, *J. Exp. Med.*, **138**: 847–857, 1973.
- [144] WILDER R. L., YUEN C. C., COYLE S. A., MAGE R. G., Demonstration of a rabbit cell surface Ig that bears light chain and V_H, but lacks μ -, α -, and γ -allotypes of rabbit IgD, *J. Immunol.*, **122**: 464–468, 1979.
- [145] WILLIAMSON A. R., Three-receptor, clonal expansion model for selection of self-recognition in the thymus, *Nature*, **283**: 527–532, 1980.
- [146] WINFIELD J. B., LOBO P. I., HAMILTON M. E., Fc receptor heterogeneity: immunofluorescent studies of B, T, and „third population” lymphocytes in human blood with rabbit IgG b4/anti-b4 complexes, *J. Immunology*, **119**: 1778–1784, 1977.
- [147] WYBRAN J., FUDENBERG H. H., Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases, *J. Clin. Invest.*, **52**: 1026–1032, 1973.
- [148] YANG W. C., MILLER S. C., OSMOND D. G., Maturation of bone marrow lymphocytes. 2. Development of Fc and complement receptors and surface immunoglobulin studied by rosetting and radioautography, *J. Exp. Med.*, **148**: 1251–1270, 1978.
- [149] YODOI J., ISHIZAKA K., Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. 1. Presence of human and rat T lymphocytes with FcE receptors, *J. Immunology*, **122**: 2577–2583, 1979.
- [150] YODOI J., ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. 2. Induction of Fc-receptor bearing lymphocytes by IgE, *J. Immunol.*, **123**: 455–462, 1979.
- [151] YU D.T.Y., Human lymphocyte subpopulations : early and late rosettes, *J. Immunol.*, **115**: 91–93, 1975.

- [152] ZABŁOCKI B., Immunologia, Przegląd zagadnień aktualnych, Ossolineum, Wrocław, Warszawa, Kraków, Gdańsk 97-101, 1977.
- [153] ZINKERNAGEL R. M., CALLAHAN G. N., ALTHAGE A., COOPER S., KLEIN, P. A., KLEIN J., On the thymus in the differentiation of „H-2 self-recognition” by T cells: evidence for dual recognition? J. Exp. Med., 147: 882-896, 1978.
- [154] ZINKERNAGEL R., OLDSTONE M. B. A., Cells that express viral antigens but lack H-2 determinants are not lysed by other antiviral immune attack mechanisms, Proc. Natl. Acad. Sci. US., 73: 3666-3670, 1976.

Otrzymano: 1 grudnia 1980.

Przyjęto: 20 czerwca 1981.

Adres autorów: ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa oraz
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa.

RECENZJE

Biochemistry and structure of Cell Organelles. Książka wydana w roku 1980 przez Blackie and Son Limited, Bishopbrigs Glasgow G 64, 2 NZ.

Autorzy książki: Robert Reid, biochemik, jest wykładowcą na Uniwersytecie w Yorku, i Rachela Leech, botanik, studiowała cytologię roślin na Uniwersytecie w Oxfordzie, obecnie jest profesorem na Uniwersytecie w Yorku. Różnie można przedstawić strukturę i funkcje komórki dzieląc pełne „quantum” naszej wiedzy na rozdziały ujmujące problem strukturalnie, czynnościowo itp. Autorzy opisali po prostu strukturę i chemizm wybranych, ale najważniejszych organelli komórkowych tak roślinnych, jak i zwierzęcych. Obok szczegółowo i nowocześnie opisanych organelli, jak: jądro, plastydy i chloroplasty, mitochondria, mikrociała, siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego, lizosomy, autorzy umieścili dwa istotne rozdziały integrujące. Pierwszy z nich dotyczy przedziałowości w komórce, czyli tzw. kompartmentalizacji, oraz rozdział przedostatni (8), w którym znajdujemy informacje odnośnie pochodzenia poszczególnych organelli oraz przedstawione współdziałanie poszczególnych organelli na tle różnych szlaków metabolicznych. Ostatni rozdział dotyczy organelli związanych z aktywnością mięśniową. Jak widać, autorzy doszli do przekonania, że komórki kurczliwe stanowią wyodrębnioną grupę dzięki ich krańcowej specjalizacji, że włączenie elementów strukturalnych oraz specyficznego biochemizmu mięśni do któregokolwiek z bardzo zwartych i ściśle określonych rozdziałów rozbijałoby ich strukturę.

Książka jest w zasadzie przeznaczona dla studentów biologii i medycyny. Należy jednak założyć, że ewentualni czytelnicy mają za sobą podstawy biologii i biochemii. W przypadku naszych studentów oczywista jest znajomość języka angielskiego. Przekazywana czytelnikowi wiedza na łamach tej książki jest przez autorów proporcjonalnie podzielona na podstawową, którą czytelnik wchłania z łatwością, gdyż są to mu już fakty bliżej znajome oraz nowoczesną opartą na ostatnich osiągnięciach. Tych uczymy się łatwiej, ponieważ jawią się w tek-

ście jak nowe cegielki uzupełniające braki w dobrze ustawionej budowlu. Zarówno problemy szlaków metabolicznych, jak również struktur, w których one biegają, autorzy opisują dynamicznie podkreślając stałą płynność i cykliczność procesów oraz ich morfologicznego podłoża. W rozważaniach nad strukturą i funkcją poszczególnych organelli autorzy starają się, o ile to jest możliwe, opierać się na nowoczesnych zasadach fizyki i chemii dla podkreślenia, że są to reguły powszechnie obowiązujące również w biologii. Literatura, tak klasyczna, jak i współczesna jest cytowana z umiarem, co w tym przypadku można autorom zapisać na plus. Nadmiar cytowanej literatury bardzo obciąża tekst i czyni go dla młodych adeptów nauki, a nawet już wyzwolonych, trudnym do czytania, a zwłaszcza jeżeli nie jest on napisany w ich języku ojczystym. Można natomiast mieć żal do autorów, że w niektórych rozdziałach pominęli nazwiska pionierów nowoczesnej cytologii na stałe związane z pewnymi odkryciami. Wystarczy posłużyć się tylko przykładem z rozdziału 6, w którym czytelnik nie znajdzie nazwiska K. R. Portera nierozłącznie związanego z odkryciem siateczki śródplazmatycznej.

Dobry i zwięźle napisany tekst autorzy ilustrują schematami oraz fotografiami fragmentów komórek widzianych w mikroskopie elektronowym. Schematy i modele procesów oraz organelli są przejrzyste i pomysłowe, natomiast wiele fotografii można by było zastąpić lepszymi. Równoległe do pochwał, które bezsprzecznie należą się autorom za ich ciekawe ujęcie zagadnienia recenzent zmuszony jest również do wytknięcia tych uchybień, które utrudniają przyswajanie tekstu, a głównie ilustrujących go schematów. Należą do nich nie opisane nieliczne na szczęście skróty literowe, których znaczenia można się jedynie domyślać. Wytknięte tutaj z obowiązku recenzenta niedociągnięcia nie umniejszają wartości tego dzieła, które godne jest nabycia dla bibliotek przy zakładach biologicznych, medycznych i rolniczych.

Wincenty Kilarski

Aspects of animal movement pod redakcją H. Y. Elder'a i E. R. Truman'a. Książka została wydana przez znaną firmę wydawniczą Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne i Sydney, 1980.

Omawiana książka jest zbiorem wybranych wykładów jakie zostały wygłoszone w czasie sympozjum Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej (Society for Experimental Biology), które odbyło się w Reading

w grudniu 1978. Książka ukazała się na rynku księgarskim w drugiej połowie 1980 r., a więc w niespełna półtora roku po Sympozjum.

Obaj redaktorzy, fizjolog z Uniwersytetu w Glasgow (Elder) i zoolog z Uniwersytetu w Manchester (Trueman), dokonali właściwego wyboru autorów, którzy prezentowali najnowsze poglądy na zagadnienia związane z ruchem zwierząt. Autorzy poszczególnych rozdziałów sami są wybitnymi specjalistami w omawianych przedmiotach i oni to na podstawie własnych badań i eksperymentów kształtowali te najnowsze poglądy na zjawiska związane z lokomocją zwierząt. Na samym początku należy zaznaczyć, że dzieło jest przeznaczone dla zaawansowanych studentów biologii specjalizujących się w fizjologii ruchu, jak również dla ściśle ukierunkowanych, dojrzałych pracowników nauki.

Książka zawiera rozważania na temat mechanizmu skurczu mięśni, metod koordynacji z jakimi spotykamy się w świecie zwierząt. Bardzo dobry znawca zagadnienia Goldspink dyskutuje w pierwszym rozdziale problemy optymalizacji w wykorzystaniu energii przez różne typy włókien mięśniowych, ich własności biochemiczne oraz możliwości adaptacyjne do skrajnych temperatur spotykanych w środowisku naturalnym. W podsumowaniu pierwszego rozdziału G. Goldspink dochodzi do przekonania, że wszystkie jak do tej pory zaobserwowane zjawiska są możliwe do zrozumienia jedynie na bazie teorii ślizgowego przemieszczenia się filamentów.

Czytelnik znajdzie w omawianej książce 9 rozdziałów, w których kolejno dyskutuje się udział szkieletu w lokomotoryce zwierząt, a zwłaszcza możliwości magazynowania energii w różnych elementach szkieletowych bezkręgowców oraz w ścięgnach kręgowców lądowych (rozdział 2; J. D. Curry). Zjawiska metachronizmu w układzie lokomotorycznym bezkręgowców przedstawiają M. A. Sleight i D. J. Bardow w rozdziale 3. Jeden z redaktorów dzieła (H. Y. Edler) omawia zasady perystaltyki oraz sposoby poruszania się zwierząt za pomocą tego mechanizmu (rozdział 4); podczas gdy E. R. Trueman, w rozdziale 5 zapoznaje czytelnika ze sposobami pływania za pomocą mechanizmów odrzutowych, które są spotykane w obrębie parzydełkowców, mięczaków, a więc zwierząt pozbawionych szkieletu, a zatem podpory dla mięśni lokomotorycznych. Następne 4 rozdziały dotyczą mechanizmów poruszania się w wodzie przez ryby, owady; mechanizmów lotu ptaków, owadów oraz skoków owadów. Dyskusje nad tymi problemami oparte są na bardzo sumiennych studiach, które wymagały bardzo dobrej znajomości matematyki i zasad mechaniki oraz zastosowania przez autorów wyrafinowanych metod rejestracji elementów ruchu i odpowiedniej ich analizy matematycznej. Wymaga to również od czytelnika odpowiedniego przygotowania w celu pełnego zrozumienia wywodów au-

torów. Ponadto czytelnik znajdzie w recenzowanej książce rozdziały na temat zasad koordynacji ruchów bezkręgowców, mechanizmów chodzenia i wreszcie obszerną podsumowującą dyskusję nad koncepcją wydajności mechanicznej w zastosowaniu do naziemnego sposobu poruszania się.

Styl i sposób przedstawienia poruszanych, w niniejszej książce, problemów jest różny, jak to zazwyczaj bywa w wydaniach zbiorowych. Ujmując rzecz generalnie należy stwierdzić, że bardzo wiele trudnych problemów lokomotorycznych przedstawiono tutaj w sposób zwięzły i w miarę przystępny. Wiele zagadnień wymaga, jak już wspomniałem, przygotowania matematycznego i wtedy staną się one dla czytelnika bardziej oczywiste. Poszczególne rozdziały są bogato ilustrowane głównie wykresami i schematami, jakkolwiek znajdzie również czytelnik zdjęcia poklatkowe, a nawet fotografie z mikroskopu skaningowego. Poszczególne rozdziały uzupełnia cytowana, przez autorów, literatura z pełną bibliografią. Książkę zamyka indeks rzeczowy.

Wincenty Kilariski

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie zł 200,— półrocznie zł 100,—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na I półroczu roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półroczu roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201046-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland are available through the local press distributors or directly through the Foreign Trade Enterprise

ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

S. STOKŁOSOWA, Receptory komórkowe estradiolu i progesteronu	1
P. CHOMCZYŃSKI, Receptory komórkowe prolaktyny i laktogenu łożyskowego	23
S. SOBIESZCZYK, Receptory komórkowe insuliny i glukagonu. Ocena czynności i znaczenie w patologii zaburzeń metabolicznych	41
B. CYMBOROWSKI, Receptory hormonów kontrolujących rozwój i metamorfozę owadów	53
H. KONONOWICZ, Receptory hormonów roślinnych	67
M. JAKÓBISIAK i M. KAWALEC, Receptory limfocytów	101
Recenzje	125