

P2435db

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 17-NR 4'90
(289-387)

Postępy Biologii Komórki

WYDAWNICTWO SGGW
FUNDACJA • ROZWÓJ SGGW-AR •

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wicenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

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

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1990 **Postępów Biologii Komórki** recenzowali:

doc dr Leszek **Kaczmarek**, dr Maciej **Kawalec**, prof dr Jerzy **Kawiak**, prof dr Jan **Kłysik**, prof dr Jan Stanisław **Knypl**, dr Jacek **Kubiak**, doc. dr Jacek **Kuźnicki**, doc. dr Hanna **Łukasiewicz**, mgr Marek **Maleszewski**, prof. dr Jan **Michejda**, prof. dr Maria **Olszewska**, prof. dr Zofia **Osuchowska**, dr Tomasz **Skórski**, prof. dr Andrzej **Tarkowski**, prof. dr Witold **Walezych**, prof. dr Stanisław **Więckowski**, prof. dr Henryk **Wysocki**, prof. dr Maciej **Zabel**.

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy.

Redakcja

Wydawnictwo SGGW-AR, Fundacja •ROZWÓJ SGGW-AR•

Nakład 500 + 30 egz. Ark. wyd. 9,6. Ark. druk. 6,25

Oddano do składu w listopadzie 1990 r. Podpisano do druku w lutym 1991 r. Druk ukończono w marcu 1991 r.

KOMPLEKSY ANTEN ENERGETYCZNYCH TYLAKOIDÓW^x

ENERGETIC ANTENNAE COMPLEXES OF THYLAKOIDS

Grzegorz JACKOWSKI, Jolenta SCHNEIDER

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Szesczenie. Przedstawiono aktualny stan wiedzy o własnościach tylakoidowych kompleksów "chlorofil a/b - białko", pełniących rolę anten energetycznych. Szczególną uwagę zwrócono na spektroskopowe właściwości kompleksów antenowych, ich organizację wewnętrzną i stechiometrię składników.

Słowa kluczowe. Chloroplasty, tylakoidy, kompleksy "chlorofil a/b - białko", LHCII, CP29, CP26, CP24, LHCI.

Summary. The current state of knowledge of properties of thylakoid "chlorophyll a/b - protein" complex which act as energetic antennae is presented. Special attention was paid to their spectral features, internal structure and stoichiometry of components.

Key words. Chloroplasts, thylakoids, "chlorophyll a/b - protein" complexes, LHCII, CP29, CP26, CP24, LHCI.

Wykaz skrótów. PSI, PSII – fotosystem I i II; LHCI i II – kompleks chlorofil a/b - białko zbierający energię świetlną, odpowiednio PSI i PSII; LHCP – białka kompleksu LHC; pLHCP – prekursor białka LHC; SDS – siarczan deodecyłu sodu; PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym; m. cz. – masa cząsteczkowa.

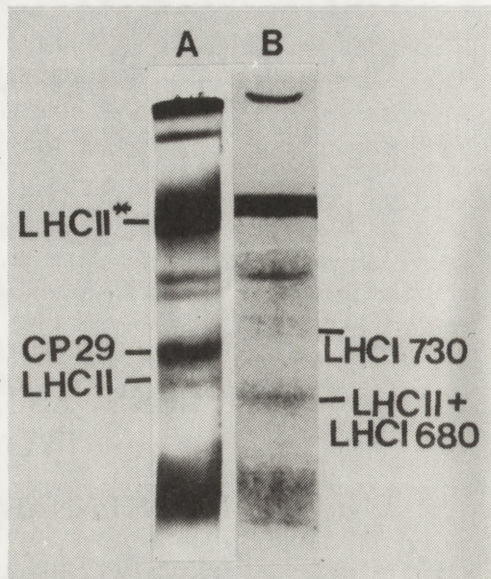
WSTĘP

Od połowy lat sześćdziesiątych wiadomo, że cząsteczki chlorofilu w błonach tylakoidowych są połączone z białkami w formie zróżnicowanych kompleksów pigmentowo-białkowych. Zastosowanie do badań biochemiczno-strukturalnej organizacji tylakoidów metod upłynniania i funkcjonowania błon przy użyciu detergentów i selektywnych technik rozdzielania umożliwiły identyfikację i charakterystykę poszczególnych kompleksów chlorofilowo-białkowych. Podsumowanie bieżącego stanu wiedzy w tej dziedzinie zawiera opra-

^xNiniejsze opracowanie powstało w ramach CPBP 04.12.4.1.

cowanie zbiorcze Green z 1988 r. [23]. Obecnie przyjmuje się, że wśród identyfikowanych elektroforetycznie kompleksów chlorofilowo-białkowych (rys. 1) przynajmniej trzy zawierające chlorofil *a* i *b* pełnią funkcje molekularnych anten energetycznych absorbujących kwanty światła i przekazujących energię wzbudzenia centrom reakcji fotosyntetycznych [23].

Dwa spośród nich noszą nazwę "zbierających energię świetlną kompleksów chlorofil *a/b* - białko" i z literatury anglojęzycznej (*light harvesting chlorophyll a/b - protein complex*) określane są skrótami *LHCI* i *LHCII* w związku ze zdolnością preferencyjnej współpracy z centrami reakcji odpowiednio fotosystemu I (*PSI*) i fotosystemu II (*PSII*). Trzeci z kompleksów antenowych określony skrótem *CP29* (*chlorophyll-protein 29 kDa*) uważany jest za wewnętrzną antenę energetyczną *PSII* [14, 23]. W rezultacie udoskonalenia technik elektroforetycznych odkryto ostatnio dwa dalsze kompleksy białek związanych z chlorofilem *a* i *b*, zwane *CP24* i *CP26* i zaliczane do anten energetycznych [7, 18, 19]. Informacje dotyczące tych kompleksów są jednak jak dotąd skąpe i niejednoznaczne [7, 8, 18, 23]. Zważywszy, że od opublikowania w piśmiennictwie polskim opracowania Woźnego [60], zawierającego dane dotyczące ogólnej charakterystyki *LHC*, nastąpił nie tylko znaczny postęp badań nad *LHCII*, ale także odkryte zostały dalsze kompleksy antenowe, wyłoniła się potrzeba opracowania przeglądu aktualnej wiedzy o kompleksach antenowych. Ponadto odrębne opracowanie zostało poświęcone immunochemicznym właściwościom białek tych kompleksów [30].



Rys. 1. Kompleksy chlorofilowo-białkowe tylakoidów całkowitych goździka – A (Jackowski i Gościło, dane niepublikowane) i tylakoidów stromy kukurydzy – B [6]; błony tylakoidowe upłynnione za pomocą β -oktyloglukozydu i *SDS* rozdzielano metodą *SDS*-PAGE w temp. 4°C: A – *LHCII*^{*} forma oligomeryczna, *LHCII* – forma monomeryczna; B – *LHCI* 680 i *LHCI* 730 reprezentują dwie subpopulacje *LHCI*

CHARAKTERYSTYKA KOMPLEKSÓW ANTENOWYCH STRUKTURA I FUNKCJA *LHC II*

LHC II jest jednym z najwcześniej opisanych [lit. szczeg. cyt. 10, 23, 58], a zarazem najintensywniej badanych kompleksów chlorofilowo-białkowych tylakoidów. Efektem przeszło dwudziestoletnich badań jest obszerna, wieloaspektowa literatura szczegółowa oraz liczne artykuły przeglądowe, z których tylko w ostatnich latach ukazały się m.in. opracowania Brechta [10], Thornbera [58], Staehelina [53], Chitnisa i Thornbera [15].

W skład *LHCII* wchodzi: 1–5 hydrofobowych białek, chlorofil *a*, chlorofil *b* oraz ksantofile. Przyjmuje się, że *LHCII* zawiera do 50% całkowitego chlorofilu i do 40% całkowitego białka tylakoidów, przy czym na jedną cząsteczkę białka przypada 5–7 cząs-

teczek chlorofilu *a*, 4–6 cząsteczek chlorofilu *b* oraz 2 lub 3 cząsteczki ksantofili [15]. Stosunek molowy chlorofilu *a* do *b* jest bliski jedności i najczęściej wynosi 1,0–1,2 [33]. Skład ksantofili *LHCII* nie został dotąd ostatecznie rozstrzygnięty. Brody i wsp. [11] sugerują, że *LHCII* zawiera co najmniej 4 różne rodzaje tych barwników. Natomiast Plumley i Schmidt [47] w badaniach nad optymalizacją warunków rekonstrukcji *LHCII* *in vitro* stwierdzili, że do uzyskania preparatu *LHCII* szpinaku o widmach fluorescencji i dichroizmu kołowego bardzo zbliżonych do widm natywnego *LHCII* wystarczy wprowadzenie dwu spośród trzech badanych ksantofili (luteina, neoksantyna, wiolaksantyna).

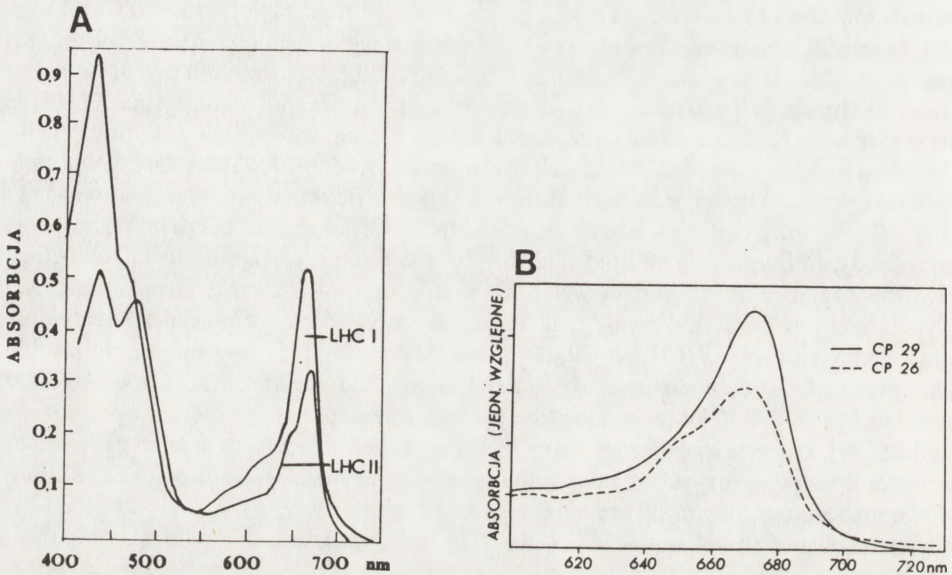
Od kilku lat istnieją dane wskazujące, iż w skład *LHCII* wchodzi także lipidy acylowe: galaktolipidy, sulfolipidy i fosfolipidy [32, 50]. Istotną rolę przypisuje się fosfatydyloglicerolowi zawierającemu występujący wyłącznie w chloroplastach kwas Δ^3 -transheksadecenowy. Z licznych doniesień wynika, że może on wpływać na formowanie i stabilność oligomerycznych form *LHCII* [31, 32, 40], na efektywność przekazywania energii wzbudzenia przez *LHCII* do centrum reakcji *PSII* oraz na efektywność transportu elektronów w obrębie *PSII* [28, 40]. W tej sytuacji dużym zaskoczeniem było doniesienie Plumleya i Schmidta [47], którzy stwierdzili, że rekonstrukcja *LHCII* szpinaku *in vitro* nie wymaga obecności lipidów acylowych w mieszaninie rekonstrukcyjnej, wyrazili pogląd, że lipidy acylowe nie są integralnymi składnikami tego kompleksu. Zważywszy, że lipidy mogą być silnie zasocjowane z białkami *LHCII* (*LHCII*) i mogą pozostawać z nimi w kompleksie mimo intensywnego wieloetapowego odtłuszczania [50], wydaje się prawdopodobne, że Plumley i Schmidt [47] wprowadzili do środowiska rekonstrukcyjnego lipidy acylowe jako zanieczyszczenia polipeptydów.

W związku z wysoką zawartością chlorofilu *b*, odróżniającą *LHCII* od pozostałych kompleksów chlorofilowo-białkowych, w widmie absorpcji *LHCII* sporządzonym w temp. pokojowej (rys. 2), obok typowych wierzchołków dla chlorofilu *a* (przy 432–440 nm i 667–679 nm) oraz dla chlorofilu *b* (przy 470–472 nm) występuje charakterystyczny wierzchołek chlorofilu *b* przy 650–653 nm [16, 26].

Charakterystyczne jest także widmo fluorescencji *LHCII* w temp. 77 K (rys. 3), z wyraźnym wierzchołkiem przy 686 nm oraz niewielkim wzniesieniem przy 695 nm [26]. Widmo wzbudzenia fluorescencji dla wierzchołka 686 nm wyraźnie dowodzi zaangażowania chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów jako anten energetycznych [48]. Istnieją dane wskazujące, że natywny *LHCII* jest oligomerem i występuje w tylakoidach jako trimer [10, 19].

Za powyższą koncepcją przemawia fakt, iż w różnych systemach łagodnie denaturującej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym *LHCII* występuje w jednej lub dwu formach oligomerycznych oraz w formie monomeru [1, 57]. Zdaniem Lyonsa i Unwina [38] nie jest jednak wykluczone, że trimery są artefaktami odzwierciedlającymi hydrofobowe interakcje monomerów *LHCII*, do jakich dochodzi w obecności detergentów. Powszechnie przyjmuje się, że *LHCII* jest kompleksem transmembranowym, którego część polipeptydowa wnika na głębokość ok. 20 nm od stromy oraz ok. 0,7 nm do światła tylakoidu [37].

Z licznych danych wynika, że *LHCII* charakteryzuje się heterogenicznością strukturalną i funkcjonalną. Uważa się powszechnie, że *LHCII* składa się z dwóch subpopulacji: wewnętrznej silnie związanej z centrum reakcji *PSII* oraz znacznie słabiej z nim związanej subpopulacji peryferycznej, mobilnej [35, 36, 51]. Subpopulacje te różnią się składem polipeptydowym, natomiast nie różnią się stosunkiem chlorofilu do białka oraz chlorofilu *a* do *b* [52]. Konsekwencją heterogeniczności strukturalnej *LHCII* jest zróżnicowanie

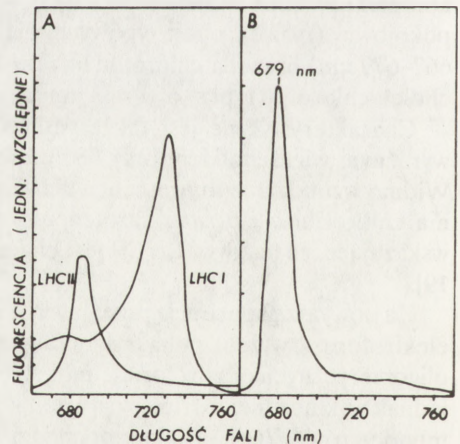


Rys. 2. Widmo absorpcji *LHCII* i *LHCI* grochu – A (wg [25] uproszczone) oraz *CP29* i *CP26* kukurydzy – B [7] sporządzone w temp. pokojowej

strukturalne *PSII* na *PSII α* i *PSII β* . W zlokalizowanym w tylakoidach gran *PSII α* centrum reakcji jest związane z obydwoma subpopulacjami *LHCII* [2], natomiast w *PSII β* antenę energetyczną stanowi silnie związana subpopulacja wewnętrzna *LHCII*. Przy tym *PSII β* ustępuje znacznie ilościowo *PSII α* i występuje na terenie tylakoidów stromy [2]. *PSII β* uważany jest za formę ontogenetycznie wcześniejszą, z której w trakcie dojrzewania chloroplastów powstaje *PSII α* przez dodanie subpopulacji peryferycznej – mobilnej *LHCII* i przemieszczenie powstałej struktury do rejonu gran [36, 41, 42].

Model dwu subpopulacji *LHCII* zaproponowano na podstawie wyników badań wykonanych na szpinaku, u którego *LHCII* zawiera dwa polipeptydy o m. cz. 27 i 25 kDa [35]. Subpopulacja wewnętrzna *LHCII* szpinaku zawiera tylko polipeptyd o m. cz. 27 kDa, a subpopulacja peryferyczna – mobilna oba polipeptydy. Model ten

nie jest uniwersalny, np. nie może być bezpośrednio zastosowany do opisanie bardziej skomplikowanej struktury *LHCII*, np. u kukurydzy [9]. *LHCII* kukurydzy zawierający 5



Rys. 3. Niskotemperaturowe (77 K) widma emisji fluorescencji *LHCII* i *LHCI* grochu (wg [25] uproszczone) oraz *CP29* szpinaku [27]; długość fal wzbudzenia fluorescencji wynosiła 478 nm dla *LHCII* oraz 390–560 nm dla *CP29*

polipeptydów rozdzielono na 7 lub 8 subpopulacji, przy czym w skład poszczególnych subpopulacji wchodzi polipeptydy i barwniki w różnych kombinacjach ilościowych.

Jak wiadomo, podstawową funkcją *LHCII* jest przekazywanie energii wzbudzenia do centrum reakcji *PSII*, w czym uczestniczą wszystkie barwniki kompleksu z prawie 100% wydajnością [49]. Jednak w zależności od warunków świetlnych *LHCII* pełni również funkcję regulatora rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy obydwoma fotosystemy. W normalnych warunkach świetlnych *LHCII* przekazuje całość energii wzbudzenia centrum reakcji *PSII* zlokalizowanym w tylakoidach gran. Jak wykazano, w ostatnich latach chloroplasty dysponują mechanizmem szybkich adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, w tym do zmian natężenia i składu spektralnego światła. Adaptacje te wiążą się z odwracalną fosforylacją polipeptydów *LHCII* przy udziale tylakoidowej kinazy aktywowanej przez zredukowany plastochinon [43 i cyt. lit.]. Wysłunięto koncepcję, że ta fosforylacja i defosforylacja (katalizowana przez tylakoidową fosfatazę) stanowi podstawę rozdziału energii wzbudzenia przez *LHCII* pomiędzy *PSI* i *PSII*. Dziś powszechnie przyjmuje się, że w rezultacie fosforylacji polipeptydów *LHCII* następuje przemieszczenie się subpopulacji peryferycznej – mobilnej kompleksu z rejonu tylakoidów gran do tylakoidów stromy i przekazywanie energii wzbudzenia do centrum reakcji *PSI*, natomiast defosforylacja wywołuje zjawisko odwrotne [32, 34, 36].

Innego rodzaju adaptację stwierdzono w przypadku traktowania rośliny podwyższonymi temperaturami [55]. Dochodzi wówczas do oddysocjowania centrum reakcji *PSII* wraz z wewnętrzną subpopulacją *LHCII* od peryferycznej subpopulacji *LHCII* (a więc następuje przekształcenie *PSII α* w *PSII β*) i przemieszczenie się powstałego *PSII β* do tylakoidów stromy. Postuluje się, że oba typy przekształceń strukturalnych *PSII* zapobiegają nadmiernemu wzbudzeniu i fotoutlenieniu *PSII* [56].

Obok funkcji antenowej oraz regulatora rozdziału energii wzbudzenia pomiędzy oba fotosystemy, *LHCII* pełni także istotną rolę w zespalaniu tylakoidów w grana. Wskazują na to m.in. wyniki badań, w których zaobserwowano ścisłą korelację między formowaniem się stosów granowych a pojawieniem się *LHCII* w plastydach zazieleniających się roślin [3]. Stwierdzono również korelację pomiędzy zawartością *LHCII* w błonach tylakoidowych a względnym stopniem przylegania tylakoidów w granach oraz szerokością stosów granowych [17, 45]. Rośliny ceniolubne oraz adaptowane do niskich natężeń światła cechuje wyższy udział *LHCII* i zarazem większa szerokość gran w porównaniu z roślinami światłolubnymi i adaptowanymi do wysokich natężeń światła [3]. Mechanizmem leżącym u podstawy udziału *LHCII* w zespalaniu błon tylakoidowych jest również proces odwracalnej fosforylacji polipeptydów mobilnej frakcji tego kompleksu [22, 34]. Według Kyle i wsp. [34] wywołany fosforylacją treoniny wzrost powierzchniowych ładunków ujemnych polipeptydów *LHCII* prowadzi do zmian konformacyjnych tego kompleksu, powodując rozłączanie się błon tylakoidów i boczną migrację mobilnej subpopulacji *LHCII* z regionów błon zespolonych (gran) do niezespolonych (tylakoidów stromy). Wraz z defosforylacją następuje odwrócenie sytuacji. Wyczerpujące omówienie roli odwracalnej fosforylacji *LHCII* zarówno w regulacji procesu zespalania tylakoidów gran, jak i dystrybucji energii wzbudzenia zawiera wymienione poprzednio polskojęzyczne opracowanie zbiorcze Woźnego [60], a także anglojęzyczne Gounaris i wsp. [22].

STRUKTURA I FUNKCJA CP29

Do kompleksów pełniących funkcję anten energetycznych należy również znacznie mniej dotąd poznany kompleks określany skrótem *CP29*, uważany za wewnętrzną antenę *PSII* [14, 23]. Stosunkowo niewielka ilość informacji dotycząca *CP29* jest wynikiem powszechnego stosowania metody elektroforetycznego rozdzielu upłynnionych tylakoidów wg Anderson i wsp. [1], nie pozwalającej na ujawnienie tego kompleksu. W tym przypadku *CP29* komigruje z monomeryczną formą *LHCII*. Aby oddzielić *CP29*, niezbędne jest zastosowanie innych warunków upłynniania błon tylakoidowych, np. w obecności β -oktyloglukozydu [14, 23]. Nazwa *CP29* wprowadzona została przez Camm i Green [13] dla kompleksu wyodrębnionego ze szpinaku [13, 20, 57]. W ostatnich latach kompleks ten został opisany jako składnik anteny *PSII* szeregu innych gatunków, w tym: kukurydzy [7], fasoli [57], jęczmienia [29, 59] i soi [42].

W skład *CP29* wchodzi białka oraz chlorofil *a* i *b*, przy czym stosunek ilościowy chlorofilu *a* do *b* mieści się w przedziale 2–5 [7, 14, 23]. Wysoka absorpcja przy 490 nm w widmie absorpcji kompleksu wskazywała, że *CP29* zawiera również karotenoidy [13]. Ich skład został określony dopiero w ubiegłym roku przez Henryssoona i wsp. [27], który w *CP29* szpinaku zidentyfikował luteinę, wiolaksantynę i neoksantynę. Według tych autorów poszczególne ksantofile występują w jednakowych ilościach odpowiadających od 0,5 do 1 cząsteczki barwnika na cząstkę *CP29*.

Nieliczne są dotąd próby ustalenia stechiometrii składników *CP29*. Na podstawie analizy składu wysoko oczyszczonego preparatu *CP29* szpinaku Barbato i wsp. [5] podali, że na jedną cząsteczkę białka *CP29* przypadają 3,3 cząsteczki chlorofilu *a* i 0,8 cząsteczki chlorofilu *b*. Natomiast z badań Glicka i Melisa [21] prowadzonych na pozbawionym chlorofilu *b* mutancie chlorina f jęczmienia wynika, że jedna cząsteczka białka *CP29* jest związana z 13 cząsteczkami chlorofilu *a*. Opierając się na różnicy w liczbie cząsteczek chlorofilu przypadających na cząsteczkę P-680 w kompleksie centrum reakcji *PSII* (obejmującym białka *D1*, *D2*, cyt *b559*, *CP47*, *CP43*, *CP29* i *CP26*) oraz w rdzeniu centrum reakcji *PSII* (zawierającym białka *D1*, *D2*, cyt *b559*, *CP47*, *CP43*) Barbato i wsp. [5] obliczyli, że natywny *CP29* jest trimerem. Pogląd ten podważa fakt, że z reguły nie obserwuje się oligomerycznych form *CP29* w warunkach rozdzielu elektroforetycznego kompleksów chlorofilowo-białkowych.

Widmo absorpcji *CP29* (rys. 2) charakteryzuje obecność tych samych maksimów, jakie obserwuje się w przypadku *LHCII*, przy czym wierzchołek absorpcji dla chlorofilu *b* przy 650 nm jest znacznie słabiej zaznaczony bądź niedostrzegalny, a wierzchołek absorpcji w czerwonej części widma odpowiadający chlorofilowi *a* jest z reguły przesunięty o 2–3 nm w kierunku dalekiej czerwieni [57]. Niskotemperaturowe (77 K) widmo fluorescencji kompleksu (rys. 3) ma wyraźne maksimum przy 676–680 nm [7]. *CP29* obejmuje 9–10% całkowitego chlorofilu tylakoidów [24, 57] i jak wykazano metodami cytoimmunochemicznymi, 80–85% kompleksu znajduje się na terenie tylakoidów gran [20, 29]. Równocześnie stwierdzono, że w przeciwieństwie do *LHCII*, *CP29* nie ulega fosforylacji w warunkach in vitro [19]. W związku z powyższym oraz faktem, że *CP29* jest ściśle związane z centrum reakcji *PSII*, Dunahay i wsp. [19] wyrazili pogląd, iż *CP29* może być składnikiem wewnętrznej anteny *LHCII*. Podobną rolę przypisuje się dwu innym nowo odkrytym kompleksom zawierającym chlorofil *a* i *b* nazwanym *CP24* i *CP26* [5, 7, 18]. Równocześnie w odniesieniu

do CP24 istnieją sugestie, że może być identyfikowany z jedną z subpopulacji LHCI, mianowicie LHCI-689 [7].

STRUKTURA I FUNKCJA CP26

CP26 został po raz pierwszy opisany przez Bassi i wsp. [7] u kukurydzy. Jego obecność stwierdzono w efekcie elektroforetycznego rozdzielania cząstek PSII w warunkach sprzyjających migracji całej puli LHCI w formie oligomeru. W ten sposób ujawniono kompleks, który w normalnych warunkach elektroforezy był niezauważany ze względu na komigrację z monomeryczną formą LHCI.

CP26 zawiera białko, chlorofil *a* i *b*, przy czym stosunek chlorofilu *a/b* wynosi 2. Obecność karotenoidów i lipidów acylowych w CP26 nie była dotąd badana. Widmo absorpcyjne CP26 (rys. 2) zawiera wierzchołki charakterystyczne dla chlorofilu *a*, podczas gdy niskotemperaturowe widmo fluorescencji ma wierzchołek przy 680 nm. Wyizolowany z tylakoidów szpinaku w identyczny sposób, jak to zrobili Bassi i wsp. [7] u kukurydzy, kompleks chlorofil *a/b*-białko został nazwany CP27 przez Dunahay i wsp. [18]. CP26 (CP27) jest ściśle zasocjowany z CP29 i jak już wspomniano, jest uważany za wewnętrzną antenę PSII [6]. Ponadto istnieje koncepcja, według której CP26 może współuczestniczyć wraz z CP29 i CP24 w przejmowaniu nadmiaru energii wzbudzenia z LHCI w warunkach zagrażających fotoinhibicją PSII [7]. Barbato i wsp. [5] sądzą, że CP26 – podobnie jak CP29 – przyjmuje *in vivo* strukturę trimeryczną.

STRUKTURA I FUNKCJA LHCI

Dopiero kilkanaście lat po wyodrębnieniu LHCI, w roku 1983, został po raz pierwszy wyizolowany i scharakteryzowany przez Hawortha i wsp. [25] zbierający energię świetlną kompleks związany z PSI. LHCI okazał się nie tylko jednym z najmniej licznych kompleksów chlorofilowo-białkowych tylakoidów, ale równocześnie stosunkowo trudnym do wyodrębnienia. Jak podaje Green [23], bezcelowa jest izolacja LHCI tradycyjną metodą bezpośredniego rozdzielania elektroforetycznego upłynnionych tylakoidów na SDS-PAGE, bowiem kompleks ten komigruje z mniejszym oligomerem LHCI lub innym komponentem PSII, jakim jest kompleks chlorofil *a*-białko zwany CP47. Wyodrębnienie LHCI przy użyciu technik elektroforetycznych jest możliwe pod warunkiem np. uzyskania czystego preparatu tylakoidów stromy lub przez łączenie metod elektroforezy z innymi, takimi jak ultrawirowanie lub/i chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie [44]. W świetle powyższych danych zrozumiałe, iż LHCI jest znacznie słabiej poznany w porównaniu z LHCI.

W skład LHCI oprócz białek wchodzi chlorofile *a* i *b* oraz karotenoidy. Przy tym stosunek chlorofilu *a* do *b* jest znacznie wyższy od podawanego dla LHCI i dość zróżnicowany. Może wynosić od 2,5 w rzęsy [44] do 3,7 u grochu [25], a niekiedy autorzy donoszą o znacznych różnicach uzyskiwanych dla kolejnych preparatów LHCI tego samego gatunku, np. u jęczmienia [8]. W składzie karotenoidowym kompleksu zbadanym dotychczas

tylko u rzęsy [44] stwierdzono luteinę, wiolaksantynę i β -karoten. Natomiast zupełnie otwarta jest kwestia ewentualnej obecności lipidów acylowych.

Nie jest znana dokładna stechiometria składników *LHCI*. Pewną ilość informacji na ten temat wnoszą dane dotyczące liczby cząsteczek chlorofilu *a* + *b* przypadających na antenę energetyczną cząstki *PSI* (po uwzględnieniu chlorofilu *a* stanowiącego wewnętrzną antenę). Ilość tę oszacowano u szpinaku na 100 cząsteczek [39], a u jęczmienia na 120 cząsteczek [8]. Przyjmując, że *LHCI* szpinaku zawiera taką samą liczbę trzech polipeptydów [18], można obliczyć, że na każdy z nich przypadają 33 cząsteczki chlorofilu *a* + *b*. Liczba ta może okazać się dwu- do trzykrotnie mniejsza, gdy *LHCI* jest in vivo di- lub trimerem. Prawdopodobieństwo występowania form oligomerycznych *LHCI* potwierdza doniesienie Bassi i Simpsona [8], którzy wśród rozdzielonych elektroforetycznie kompleksów chlorofilowo-białkowych kukurydzy stwierdzili obecność oligomeru *LHCI*. Ponadto Bruce i Malkin [12] ustalili, że na jedną cząsteczkę P 700 u rzęsy przypadają dwie cząsteczki *LHCPI* o m. cz. 23 kDa. W związku ze znacznie mniejszą zawartością chlorofilu *b* w stosunku do chlorofilu *a* widmo absorpcji tego kompleksu (rys. 2) jest zdominowane przez maksima odpowiadające chlorofilowi *a* przy 432–440 nm oraz przy 668–674 nm. Charakterystyczny dla chlorofilu *b* wierzchołek w paśmie Soreta (470–472 nm) jest w przypadku *LHCI* zwykle zauważalny jako słabe wzniesienie, natomiast w rejonie 650 nm nigdy nie obserwuje się odrębnego wierzchołka dla chlorofilu *b*, jak to ma miejsce w przypadku *LHCII* [26, 44, 58]. *LHCI* ma w temp. 77 K charakterystyczne widmo fluorescencji (rys. 3) o dwu wierzchołkach przy 680 i 730 nm [8, 26], a Remy i Ambard-Bretteville [48] opisali w widmie fluorescencji *LHCI* grochu dodatkowy, bardzo wyraźnie zaznaczony wierzchołek przy 650 nm. Analiza widma wzbudzenia fluorescencji dowodzi, że najważniejszym barwnikiem antenowym tego kompleksu jest chlorofil *a* [8].

U kilku gatunków roślin [6, 8] stwierdzono istnienie dwu subpopulacji *LHCI* różniących się składem polipeptydowym, nieznacznie zawartością chlorofilu *a* i *b*, a także własnościami absorbcyjnymi: widmem dichroizmu kołowego i widmem fluorescencji w 77 K. Kompleksy te identyfikowane na podstawie niskotemperaturowego widma emisyjnego fluorescencji określone są odpowiednio jako *LHCIIa* lub *LHCI-680* oraz *LHCIIb* lub *LHCI-730*. Na podstawie wyników frakcjonowania i rekonstrukcji *PSI* jęczmienia Bassi i Simpson [8] zaproponowali model transferu energii dla *PSI*, wg którego *LHCI* pełni rolę anteny pośredniczącej przy przekazie energii wzbudzenia przez mobilną subpopulację *LHCII* do *PSI*. Przekaz energii wzbudzenia następowałby zgodnie z sekwencją: *LHCII* → *LHCI-680* → *LHCI-730* → centrum reakcji *PSI* (P 700 chl *a* – P1).

Z danych immunocytochemicznych wynika, że w odróżnieniu od *LHCII*, którego mobilna subpopulacja może przemieszczać się z tylakoidów gran do tylakoidów stromy, *LHCI* jest kompleksem występującym w obrębie tylakoidów stromy [29]. Z drugiej strony istnieją doniesienia wskazujące, że część (ok. 35%) populacji *LHCI* może znajdować się na terenie tylakoidów gran [4]. Andreasson i wsp. [4] stwierdzili u szpinaku heterogeniczność funkcjonalną *PSI* analogiczną do heterogeniczności *PSII*. Opierając się na analizie aktywności fotochemicznej *PSI* oraz kinetyki fotoutleniania P 700 wysoko oczyszczonych preparatów tylakoidowych gran i stromy wykazali obecność odrębnych funkcjonalnie populacji *PSI α* w granach i *PSI β* w tylakoidach stromy. Różnice funkcjonalne *PSI α* i *PSI β* zdaniem autorów odzwierciedlają różnice w wielkości anteny energetycznej, czyli *LHCI*. Nie wiadomo, jak te różnice mają się do opisywanej poprzednio struktury subpopulacyjnej *LHCIIa* i *LHCIIb* [6, 8].

LITERATURA

- [1] ANDERSON JM, WALDRON JC, THORNE SW. Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. Spectral characteristics of six complexes resolved by an improved electrophoretic procedure. *FEBS Lett* 1987; **92**: 227–233.
- [2] ANDERSON JM, MELIS A. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 745–749.
- [3] ANDERSON JM. Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Ann Rev Plant Physiol* 1986; **37**: 93–136.
- [4] ANDREASSON E, SVENSSON P, WEIBULL C, ALBERTSSON PA. Separation and characterization of stroma and grana membranes – evidence for heterogeneity in antenna size of both Photosystem I and Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1988; 339–350.
- [5] BARBATO R, RIGONI F, GIARDI MT, GIACOMETTI GM. The minor antenna complexes of an oxygen evolving photosystem II preparation: purification and stoichiometry. *FEBS Lett* 1987; **251**: 147–154.
- [6] BASSI R, MACHOLD O, SIMPSON D. Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize. *Carlsberg Res Comm* 1985; **51**: 363–370.
- [7] BASSI R, HOYER-HANSEN G, BARBATO R, GIACOMETTI GM, SIMPSON DJ. Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 13333–13341.
- [8] BASSI R, SIMPSON DJ. Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. *Eur J Biochem* 1987; **163**: 221–230.
- [9] BASSI R, RIGONI F, BARBATO R, GIACOMETTI G. Light-harvesting chlorophyll a/b proteins (LHCII) populations in phosphorylated membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **836**: 29–38.
- [10] BRECHT E. The light-harvesting chlorophyll a/b protein complex: results from a twenty-year research period. *Photobiochem Photobiophys* 1986; **12**: 37–50.
- [11] BRODY S, SIMPSON DJ, ROCK M. Distribution of cis-trans- β -carotene in pigment-protein fractions of photosystem I complex. *Z Naturforsch* 1988; **43 c**: 577–580.
- [12] BRUCE BD, MALKIN R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem I complex. *J Biol Chem* 1988; **263**: 7302–7308.
- [13] CAMM EL, GREEN BR. Widespread distribution of some minor chlorophyll-protein complexes in some plants and algae. *Plant Physiol* 1981; **67**: 1061–1063.
- [14] CAMM EL, GREEN BR. The chlorophyll ab complex, CP 29 is associated with the photosystem II reaction core. *Biochim Biophys Acta* 1989; **974**: 180–184.
- [15] CHITNIS PR, THORNER JP. The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth Res* 1988; **16**: 41–63.
- [16] CLINE K. Light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Plant Physiol* 1988; **86**: 1120–1126.
- [17] DAHLIN C. Immunogold localization of LHCII proteins in chloroplasts with different degrees of grana stacking induced by SAN-9789. *Physiol Plantarum* 1989; **76**: 438–444.
- [18] DUNAHAY TG, STAEHELIN LA. Isolation and characterization of a new minor chlorophyll a/b protein complex from spinach. *Plant Physiol* 1986; **80**: 429–434.
- [19] DUNAHAY TG, SCHUSTER G, STAEHELIN LA. Phosphorylation of spinach chlorophyll-protein complexes. *FEBS Lett* 1987; **215**: 25–30.
- [20] DUNAHAY TH, STAEHELIN LA. Immunolocalization of the chlorophyll a/b-light-harvesting and CP 29 under conditions favouring phosphorylation and dephosphorylation of thylakoid membranes (state1-state2 transitions). *Prog Photosynth Res* 1987; **2**: 701–704.
- [21] GLICK RE, MELIS A. Minimum photosynthetic unit size in System I and System II of barley chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1988; **935**: 151–155.
- [22] GOUNARIS K, BARBER J, HARWOOD JL. The thylakoid membranes of higher plants chloroplasts. *Biochem J* 1986; **237**: 313–326.
- [23] GREEN BR. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes. *Photosynth Res* 1988; **15**: 3–32.
- [24] GREEN BR, ALLRED DR, MORISHIG DT, STAEHELIN LA. Hierarchical response of light-harvesting chlorophyll-proteins in a lightsensitive chlorophyll b-deficient mutant of maize. *Plant Physiol* 1988; **87**: 357–364.
- [25] HAWORTH P, WATSON JL, ARNTZEN CJ. The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex specifically associated with photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 1983; **724**: 151–158.

- [26] HAYDEN DB, COVELLO PS, BAKER NR. Characterization of a 31 kDa polypeptide that accumulates in the light-harvesting apparatus of maize leaves during chilling. *Photosynth Res* 1988; **15**: 257-270.
- [27] HENRYSSON T, SCHRODER WP, SPANGFORT M, AKERLUND HE. Isolation and characterization of the chlorophyll a/b protein complex CP 29 from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 301-308.
- [28] HORVATH G, DROPPA M, HIDEGE E, ROZSA Z. The role of phospholipids in regulating photosynthetic electron transport activities: treatment of chloroplasts with phospholipase A₂. *J Photochem Photobiol* 1989; **3**: 515-527.
- [29] HOYER-HANSEN G, BASSI R, HONBERG LS, SIMPSON DJ. Immunological characterization for chlorophyll a/b-binding proteins of barley thylakoids. *Planta* 1988; **173**: 12-21.
- [30] JACKOWSKI G, SCHNEIDER J. Immunochemiczne właściwości białek tylakoidowych anten energetycznych. *Post Biol Kom*; w druku.
- [31] KROL M, HUNER NPA, WILLIAMS JP, MAISSAN EE. Prior accumulation of phosphatidylglycerol high in trans- Δ^3 -hexadecenoic acid enhances the in vitro stability of oligomeric light-harvesting complex II. *J Plant Physiol* 1989; **135**: 75-80.
- [32] KRUPA Z, HUNER NP, WILLIAMS JP, MAISSAN E, JAMES DR. Development at cold-hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light-harvesting complex II. *Plant Physiol* 1987; **84**: 19-24.
- [33] KUHLEBRANDT W, BARBER J. Separation of phosphorylated and unphosphorylated light-harvesting chlorophyll a/b protein complex by column. *Biochim Biophys Acta* 1988; **934**: 118-122.
- [34] KYLE DJ, STAEHELIN LA, ARNTZEN CJ. Lateral mobility of the light-harvesting complexes in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Archiv Biochem Biophys* 1983; **222**: 527-541.
- [35] LARSSON UK, ANDERSSON B. Different degrees of phosphorylation and lateral mobility of two polypeptides belonging to the light-harvesting complex of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1985; **809**: 396-402.
- [36] LARSSON UK, SUNDBY C, ANDERSSON B. Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b protein complex (LHCII): 1. Polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1987; **894**: 59-68.
- [37] LI J. Light-harvesting chlorophyll a/b protein: three dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 386-390.
- [38] LYON MR, UNWIN PNT. Two-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b complex by cryoelectron microscopy. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1515-1523.
- [39] MALKIN R, ORTIZ W, LAME E, BONNERJEA J. Structural organization of thylakoid membrane electron transfer complexes: photosystem I. *Physiol Veget* 1985; **25**: 619-625.
- [40] MAROC J, TREMOLIERES A, GARNIER J, GUYON D. Oligomeric form of the light-harvesting chlorophyll a + b - protein complex CP II, phosphatidylglycerol, Δ^3 -trans-hexadecenoic acid and energy transfer in *Chlamydomonas reinhardtii*, wild type and mutants. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 91-99.
- [41] MELIS A. Functional properties of photosystem II β in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1985; **808**: 334-342.
- [42] MORRISEY PJ, GLICK RE, MELIS A. Supramolecular assembly and function of subunits associated with the chlorophyll a/b light harvesting complex II (LHCII) in soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 335-344.
- [43] MURPHY JD. The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1986; **864**: 33-94.
- [44] NÉCHUSHTAI R, PETERSON G, PETER GF, THORNER JP. Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b - protein of photosystem I in *Lemma gibba*. *Eur J Biochem* 1987; **164**: 345-350.
- [45] NURMI A. Comparison between thylakoid composition and chloroplast ultrastructure in developing plants of *Brassica*, *Helianthus*, *Sisymbrium* and *Tanacetum*. *J Ultrastr Res* 1985; **92**: 190-200.
- [46] PETER GF, THORNER JP. Antenna components of photosystem II with emphasis on the major pigment-protein, LHCII b. [w] Scheer H, Schneider S (red.) Photosynthetic light-harvesting systems. Berlin: W de Gruyter and Co Berlin 1988.
- [47] PLUMEY FG, SCHMIDT GW. Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc Acad Sci USA* 1987; **84**: 146-150.
- [48] REMY R, AMBARD-BRETTEVILLE F. Evidence for a chlorophyll a/b - protein complex associated with photosystem I. *FEBS Lett* 1984; **170**: 174-180.
- [49] SIEFERMANN-HARMS D. Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim Biophys Acta* 1985; **811**: 325-355.

- [50] SIGRIST M, ZWILLENBERG C, GORPID C, EICHENBERGER W, BOSCHETTI A. Sulfolipid associated with the light-harvesting complex and associated with photosystem II apoproteins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci* 1988; **58**: 15–23.
- [51] SPANGFORT M, LARSSON UK, ANDERSON JM, ANDERSSON B. Isolation of two different subpopulations of the light-harvesting chlorophyll a/b complex of photosystem II (LHCII). *FEBS Lett* 1987; **224**: 343–347.
- [52] SPANGFORT M, ANDERSSON B. Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II – isolation and biochemical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 163–170.
- [53] STAEHELIN LA. Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. [w] Staehelin LA, Arntzen CJ. (red.) *Encycl. Plant Physiol* 15 (New Series) 1986; 1–84 Berlin Springer-Verlag.
- [54] STAYTON MM, BLACK M, BEDBROOK J, DUNSMUIR P. A novel chlorophyll a/b binding (Cab) protein gene from *Petunia* which encodes the lower molecular weight Cab precursor protein. *Nucl Acid Res* 1986; **14**: 9781–9796.
- [55] SUNDBY C, ANDERSSON B. Temperature induced reversible migration along the thylakoid membrane of photosystem II regulates its association with LHCII. *FEBS Lett* 1985; **191**: 24–28.
- [56] SUNDBY C, MELIS A, MAENPAA P, ANDERSSON B. Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem II α to photosystem II β . *Biochim Biophys Acta* 1986; **851**: 476–483.
- [57] TANAKA A, TANAKA M, TSUJI H. Resolution of chlorophyll a/b protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis: evidence for heterogeneity of light-harvesting chlorophyll-protein complexes. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 1537–1545.
- [58] THORNBURGH JP. Biochemical characterization and structure of pigment-proteins of photosynthetic organisms. [w] Staehelin LA, Arntzen CJ (red.) *Encycl Plant Physiol* Berlin Springer Verlag 1986; 19: 95–142.
- [59] WHITE MJ, GREEN BR. Antibodies to the photosystem I chlorophyll a + b antenna cross-react with polypeptides of CP 29 and LHC II. *Eur J Biochem* 1987; **163**: 545–551.
- [60] WOŹNY A. Struktura i subultrastruktura chloroplastów granowych. *Postępy Biol Kom* 1985; **12**: 205–262.

Otrzymano 3 kwietnia 1990 r.

Przyjęto 11 września 1990 r.

Adres Autorów: 61-713 Poznań, Al. Niepodległości 14

SEKWENCJE POWTARZAJĄCE SIĘ W GENOMACH ROŚLINNYCH

REPETITIVE SEQUENCES IN PLANT GENOMES

Tomasz SAKOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie. Genomy większości roślin wyższych zawierają wysoki procent sekwencji powtarzających się. We wszystkich gatunkach roślin zbadanych do tej pory, wyniki eksperymentów reasocjacyjnych wskazywały na obecność frakcji repetytywnych, które mogą stanowić nawet do 70% DNA jądrowego u roślin; frakcja ta ma zatem poważny udział w tworzeniu chromosomów. Frakcje repetytywne były analizowane pod względem struktury, funkcji i modelu rozproszenia w genomach. Proponowano dla tych sekwencji szereg przypuszczalnych funkcji, wliczając, takie jak udział w procesach rekombinacji czy replikacji DNA. Jednakże jak dotąd, brak jasnych dowodów świadczących jednoznacznie o ich biologicznej roli.

Słowa kluczowe: sekwencje repetytywne, DNA jądrowy, organizacja genomu roślinnego.

Summary. Most higher plant genomes contain a high proportion of repeated sequences. In all plant species studied so far, reassociation experiments have demonstrated the presence of repetitive fractions which may comprise as much as 70% of nuclear DNA in plants. Thus repetitive DNA is a major contributor to plant chromosome. Repeated fractions of plant genomes have been investigated with respect to their structure, function and dispersion. A number of possible functions has been suggested for these sequences, including involvement in recombination or replication processes. However, no direct evidence concerning their biological significance has yet been presented.

Key words: repetitive sequences, nuclear DNA, plant genomes' organizations.

WSTĘP

Szybki rozwój metod badawczych związanych z odkryciem enzymów restrykcyjnych (klonowanie, sekwencjonowanie DNA, hybrydyzacje, czy metody pozwalające na badanie struktur DNA wyższego rzędu) pozwolił w ostatnich latach na dokładniejszą, niż to było możliwe do tej pory, analizę genomów eukariotycznych. Badania zapoczątkowane przez Brittena i Kohne'a [2] ujawniły we wspomnianych genomach obecność różnego typu

sekwencji powtarzających się (repetytywnych). Wkrótce okazało się, że są one charakterystyczną cechą tych genomów. Omawiane sekwencje stanowią od kilku do ok. 70% całkowitego DNA, a ich ilość i typ nie są uzależnione od ewolucyjnego położenia danego organizmu. Znane są przykłady odległych filogenetycznie gatunków o bardzo podobnych sekwencjach powtarzających się i przeciwnie – odmian blisko spokrewnionych, w których sekwencje te wykazują znaczną odmienność. Poznane sekwencje nukleotydowe podzielono uwzględniając ich częstość w genomach na sekwencje:

- unikalne, występujące w pojedynczych kopiach,
- umiarkowane powtarzające się, których liczbę kopii oceniono na 10^3 – 10^5 ,
- wysoce powtarzalne, o liczbie kopii przekraczającej 10^5 .

Każda z wymienionych grup sekwencji była przedmiotem szczegółowych analiz pod względem ich organizacji genomowej, struktury i funkcji. Sekwencje umiarkowanie powtarzające się są zwykle dodatkowo dzielone na dwie główne klasy:

SINES, do której należą krótkie powtarzające się sekwencje rozproszone, a ich elementy mają zwykle długość do 500 pz;

LINES o elementach powtarzających się długości kilku tysięcy pz.

Elementy należące do obu wspomnianych grup rozproszone są wśród sekwencji unikalnych i wysoce powtarzalnych [4, 9]. Dokonano także innego podziału omawianych sekwencji, uwzględniającego sposób ich organizacji genomowej. Najczęściej wyróżnia się tutaj sekwencje rozproszone, w których poszczególne elementy powtarzające się oddzielone są od siebie innymi sekwencjami oraz sekwencje tworzące tzw. szyk tandemowy, gdzie powtarzające się jednostki występują bezpośrednio obok siebie. Niezależnie od swojego charakteru omawiane sekwencje zlokalizowane są głównie w nieaktywnej transkrypcyjnie części chromatyny (heterochromatyna) zajmując pozycję telomerową, przycentromerową lub interkalarną.

Stopień poznania sekwencji powtarzających się jest znacznie większy w genomach zwierzęcych niż u roślin, lecz i tutaj mimo ich gruntownej analizy funkcje biologiczne, jakie mają one do spełnienia, w dalszym ciągu nie są oczywiste. W niektórych genomach ich procentowa zawartość przekracza 70% i wydaje się, że już chociażby ta wielkość sprawia, iż powinny one pełnić konkretną funkcję. Wiadomo, że nieznaczny procent sekwencji powtarzających się podlega procesowi transkrypcji. Jednakże funkcje przypisywane omawianym sekwencjom do tej pory są bardziej oparte na hipotezach i spekulacjach niż na ewidentnych dowodach eksperymentalnych. Sytuacja ta sprawiła, że pojawiły się także teorie, według których sekwencje powtarzające się nie pełnią w genomach żadnej istotnej roli i niejako wymykają się spod ich kontroli (tzw. *selfish DNA*) [15].

WIELKOŚĆ GENOMÓW ROŚLINNYCH A LICZBA SEKWENCJI POWTARZAJĄCYCH SIĘ

Genomy większości wyższych roślin charakteryzują duże rozmiary, ponieważ w bardzo licznych przypadkach są to genomy amfiploidalne czy poliploidalne. Kilka znanych gatunków wysoce poliploidalnych ma genomy przekraczające rozmiarami 10^{11} pz. Jednak większość typowych genomów roślinnych ma rozmiary 10^9 – 10^{10} pz. Przykładami roślin o mniejszych genomach są m.in. bawełna – $0,7 \times 10^9$ pz, len – $0,4 \times 10^9$ pz, fasola – $0,3$ – $0,6 \times$

10^9 pz, szpinak – $0,8 \times 10^9$ pz w przeliczeniu na haploidalny genom. Z przeciwnej strony znajdują się genomy takich roślin, jak: cebula – $7-20 \times 10^9$ pz czy bób – 44×10^9 pz. Uwagę zwraca fakt, że w obrębie tej samej rodziny spotyka się przedstawicieli o bardzo rozmaitych rozmiarach genomów, jak np. fasola złocista – $0,5 \times 10^9$ pz i wspomniany wyżej bób – 44×10^9 pz [19]. Jednakże nie wielkość genomu jest czynnikiem decydującym o stopniu jego poznania. W ścisłym związku z rozmiarami genomów roślinnych pozostaje zawartość w nich sekwencji powtarzających się. Rezultaty badań wskazują, że wśród gatunków z większą zawartością DNA (powyżej 2 pg), nawet do 75% sekwencji może wykazywać cechy sekwencji repetytywnych. Proporcjonalnie do wzrostu rozmiarów genomu rośnie w nich także zawartość sekwencji powtarzających się. Analogiczna relacja w przypadku genomów małych jest znacznie mniej wyraźna [5].

STRUKTURA I ROZMIESZCZENIE NIEKTÓRYCH GENÓW ROŚLINNYCH

Średnia liczba genów w chromosomach wyższych roślin była oznaczana najczęściej przez pomiar szybkości renaturacji DNA komplementarnego do RNA (cDNA). Tym sposobem oznaczono m.in. liczbę różnych typów sekwencji reprezentowanych w polisomalnym RNA tytoniu i pietruszki [4]. Wymieniona metoda wskazała na obecność 10–15 tysięcy różnych typów sekwencji RNA. Liczba 15 tys. genów w przeliczeniu na ilość pz wynosi ok. $1,8 \times 10^7$ pz.

Inne badania wskazały, że liczba genów w przeliczeniu na haploidalny genom jest wielkością zbliżoną dla roślin niezależnie od rozmiarów genomu. I tak: zaliczany do grupy najmniejszych genomów roślin wyższych genom *Arabidopsis* o rozmiarach 2×10^8 pz i znacznie większe genomy rzędu 8×10^{10} mają podobną ilość sekwencji kodujących [4]. Tak więc, uwzględniając wielkość genomu można powiedzieć, że w genomach mniejszych procent sekwencji kodujących jest wyższy niż w genomach dużych.

Przykładem genów roślinnych, dla których konkretnym sekwencjom nukleotydowym przypisano określone funkcje, są geny rRNA. Skonstruowano model struktury i organizacji tych genów w genomach roślinnych [21]. Jednostki genów rybosomalnych RNA obecne są u roślin w tysiącach kopii. Są one tandemowo ułożone w jednym lub kilku miejscach niektórych chromosomów nazwanych organizatorami jąderkowymi (NOR) [4]. Miejsca te są widoczne w chromosomach metafazowych i mogą być mapowane przy zastosowaniu hybrydyzacji in situ z użyciem rRNA jako radioaktywnej sondy.

Podobnie do większości genów RNA, geny 5S tworzą również układy tandemowe. U pszenicy elementy powtarzające się mają długość 410 i 500 pz. Sekwencja kodująca 5S RNA ma długość 118 pz i jest wysoce konserwatywna i u roślin, i u zwierząt. Spośród poznanych sekwencji genów 5S kilka jest niemal identycznych, ponieważ poza sekwencją kodującą mają dodatkowo 15-nukleotydowy odcinek powtórzony dwukrotnie. W kierunku 5' od sekwencji kodującej leży 70-nukleotydowy fragment DNA, w którym zlokalizowane są regiony promotorowe dla RNA polimerazy III i sekwencje istotne w korygowaniu inicjacji transkrypcji. Szczególnie ważna jest tutaj sekwencja ATAAG położona w pozycji 25–29 nukleotydów poprzedzających miejsce startu transkrypcji. W tej samej pozycji niemal identyczne sekwencje stwierdzono w genomach zwierząt i drożdży [4]. Bezpośred-

nio po zakończeniu sekwencji kodującej występuje blok A-T złożony z 14–17 pz z dominacją T na niekodującej nici DNA.

Geny 18S, 5,8S i 25S rybosomalnych RNA zgrupowane są razem i oddzielone odcinkami sekwencji "przerwykowych". Geny 5S RNA leżą pomiędzy takimi układami [4]. Tego typu organizacja genów rRNA jest powszechna w genomach roślinnych.

ORGANIZACJA GENOMOWA RODZIN SEKWENCJI POWTARZAJĄCYCH SIĘ

Klasyfikacja sekwencji powtarzających się, oparta na liczbie ich kopii w genomie i wyliczona na podstawie pomiarów kinetyki renaturacji DNA, niosła ze sobą liczne niedokładności, ponieważ nie uwzględniała m.in. takich elementów, jak wewnętrzna struktura powtórzeń czy ich organizacja genomowa. Bardzo częstym zjawiskiem jest powtarzalność określonego segmentu czy jego części w różnych jednostkach powtarzających się.

Zastosowanie metod analizy restrykcyjnej, klonowania i sekwencjonowania fragmentów DNA umożliwiło precyzyjne określenie wyżej wymienionych parametrów, co w połączeniu ze znajomością pełnych sekwencji nukleotydowych odcinków DNA pozwoliło stworzyć bardziej generalną klasyfikację [5].

Wyróżnić można zatem:

a) tandemowe układy ściśle spokrewnionych jednostek powtarzających się występujące bezpośrednio obok siebie;

b) rodziny powtórzeń rozproszonych; jest to szeroko badana, bardzo heterogenna klasa sekwencji; zawiera grupy sekwencji, którym przypisuje się funkcje w procesach parowania chromosomów homologicznych i w procesie rekombinacji;

c) rodziny multigenów: większość genów, jeżeli nie wszystkie, jest obecna w licznych kopiach tworząc zgrupowane kompleksy; nie muszą one w całości podlegać transkrypcji (niektóre z nich to pseudogeny).

Zaprezentowany podział uwzględnia jedynie układ elementów powtarzających się bez uwzględnienia liczby kopii. Parametry określające liczbę kopii są zbliżone do podanych we Wstępie na przykładzie genomów zwierzęcych. Próby lokalizacji sekwencji tandemowych, które czasem jako duży zblokowany układ mogą tworzyć element rozproszony, wskazują na ich zgrupowanie w regionach heterochromatynowych.

SEKWENCJE TANDEMOWE

Chlorella

Również w genomach najprymitywniejszych eukariotów – glonów zostały wykryte niewielkie ilości omawianych sekwencji. Pierwszym opisanym przykładem tego typu sekwencji u glonów była tandemowa sekwencja repetytywna nazwana rodziną HaeIII, u *Chlorella* stanowiąca ok. 2% wszystkich sekwencji powtarzających się, których łączną ilość oceniono na 15% całkowitego DNA [10]. Zidentyfikowana rodzina należy do grupy krótkich sekwencji powtarzających się, a element wyodrębniany przez użycie restryktazy HaeIII ma długość 170 pz.

Secale cereale

Przedmiotem szerokich badań była m.in. heterochromatyna żyta. Blisko 18% całkowitego DNA to regiony heterochromatyny leżące w telomerach wszystkich chromosomów [6]. Z wymienionej liczby ponad 60% całkowitego DNA stanowią cztery tandemowe układy sekwencji powtarzających się. Są one obecne w liczbie $0,3-1,5 \times 10^6$ kopii na haploidalny genom [3]. Interesującego spostrzeżenia dokonał Flavell [6], który stwierdził, że genom *Secale cereale* zawiera ponad 10% sekwencji powtarzających się złożonych z elementów o długości 120, 480, 610 i 630 pz. Element 480 pz złożony jest z dwóch blisko spokrewnionych z sobą sekwencji o długości 230 pz, podczas gdy element 630 pz ma trzy homologiczne podjednostki, każda o długości 130 pz i dodatkowy fragment 280 pz nie wykazujący żadnego pokrewieństwa względem pozostałych. Poszukiwania wymienionych sekwencji w ściśle spokrewnionych, ale zawierających mniej heterochromatyny gatunkach wskazywały na znaczny spadek liczby tych sekwencji. Szczególnie wyraźnie jest to widoczne na przykładzie *S. silvestre* o małej ilości heterochromatyny [6] (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość w % tandemowych sekwencji w rodzaju *Secale* [16]

Dł. jedn. powt.	<i>S. cereale</i>	<i>S. vavilovii</i>	<i>S. montanum</i>	<i>S. silvestre</i>
480	6.1	2-5	1-5	-
610	2.7	-	0.5	-
120	2.4	1.5-3.0	1.5-3.0	2.4
630	0.6	0.01-0.04	0.16	-

Vicia faba

W genomie *V. faba* została zidentyfikowana rodzina fragmentów FokI [12]. Rodzina ta stanowi typowy przykład sekwencji powtarzających się o charakterze tandemowym. Wykazano, że powtarzający się element ma długość 59 pz. Tworzy on układy dimeryczne, trimeryczne i tetrameryczne. Tak więc, wśród produktów trawienia DNA *V. faba* zidentyfikowano fragmenty o długościach 59, 118, 177 i 236 pz. Zgodność sekwencji nukleotydowych wymienionych odcinków jest niemal całkowita. Liczbę kopii w genomie oceniono na $5 \times 10^6 - 5 \times 10^7$ na diploidalny genom. Analizując wewnętrzną organizację monomeru o długości 59 pz, wykazano obecność dwóch powtórzonych odcinków utworzonych przez fragmenty 19 i 20 pz. Stanowiły one zakończenia monomeru z obu jego końców. Stopień wzajemnej homologii wspomnianych zakończeń wynosił ponad 80%. Środkowa część elementu 59 pz to odcinek 20-nukleotydowy zupełnie niespokrewniony z dwoma skrajnymi. Przypuszcza się, że element powtarzający się rodziny FokI (59 pz) został utworzony poprzez duplikację pierwotnego odcinka 19-20-nukleotydowego, a następnie związanie z odmiennym sekwencyjnie fragmentem 20 pz. W obrębie "zduplikowanych", krańcowych odcinków występuje wewnętrzna, niekompletna symetria osiowa. Obecności fragmentów należących do rodziny FokI nie stwierdzono metodami hybrydizacyjnymi, w innych gatunkach roślin rodziny motylkowatych. Rodzina opisywanych fragmentów została zlokalizowana metodą hybrydizacji in situ wyłącznie w środkowych rejonach długich ramion wszystkich pięciu par chromosomów akrocentrycznych [22]. Regiony te ściśle korespondują z pozycją prążków heterochromatyny.

Podobny charakter mają sekwencje leżące w odcinku łącznikowym (*spacer*) rDNA między genami 18S i 25S rRNA. Element powtarzający się ma długość 325 pz i należy do tzw. rodziny MluI [23]. Tak jak to opisano powyżej w elemencie 59 pz z rodziny FokI, tak

i w elemencie o długości 325 pz krańcowe jego odcinki to proste powtórzenia – tutaj o długości 150 pz. Pomiędzy dwoma takimi odcinkami (o niepełnej zgodności sekwencyjnej) leży odcinek DNA długości 14–15 nukleotydów, zupełnie niespokrewniony sekwencyjnie. Ta złożona budowa elementu powtarzającego się przypomina konstrukcją LTR retrowirusów czy ruchome elementy Tys w drożdżach [3]. Łącznikowy odcinek rDNA między genami 18S i 25S rRNA, w którym leżą elementy rodziny MluI, jest nietranskrybowany. Eksperymenty hybrydyzacyjne, gdzie jako radioaktywnych sond używano fragmentów o długości 325 pz, wykazały silne sygnały w bardzo szerokim spektrum produktów trawienia, co może sugerować możliwość transpozycji opisywanego elementu w bardzo różne miejsca genomu.

Brassicaceae

Wśród przedstawicieli roślin należących do rodziny krzyżowych (*Brassicaceae*) Hallden i wsp. [8] stwierdzili obecność tandemowych powtórzeń o długości monomeru 175 pz w ilości $1,7\text{--}3,0 \times 10^5$. Wymienione fragmenty powstały jako wynik degradacji całkowitego DNA enzymem HindIII. Sekwencja monomeru wykazywała ponad 50% homologię z wieloma genami tRNA i prawdopodobnie może wywodzić się od sekwencji wyjściowej, która była sekwencją genów tRNA. Wzajemna zgodność sekwencyjna między poszczególnymi monomerami przekraczała 93%, a zmiany miały charakter mutacji punktowych, małych insercji i delecji.

Cucurbita

W około $1,3 \times 10^5$ kopii występuje w genomie *Cucurbita pepo* tandemowa sekwencja repetytywna, w której element powtarzający się ma długość 351 pz. Sekwencja ta stanowi 4–8% genomu [14].

SEKWENCJE ROZPROSZONE

Allium

Zdecydowana większość sekwencji powtarzających się w genomach *Allium* [1] ma charakter rozproszony. Liczne fragmenty należące do jednej rodziny są ściśle spokrewnione z częścią dłuższych jednostek powtarzających się. Na przykład w genomie czosnku (*A. sativum*) stwierdzono obecność populacji fragmentów o długości 1050 pz, która stanowiła 0,6% całkowitego DNA. Liczbę kopii tych fragmentów oceniono na 8×10^4 , czyli była to sekwencja o umiarkowanej powtarzalności. Jednakże użycie fragmentów omawianej populacji cząsteczek w eksperymentach hybrydyzacyjnych ujawniło, że sekwencje homologiczne do użytej sondy stanowiły blisko 8% genomu. Wynik ten wskazywał, że odcinki DNA o długości 1050 pz (lub subfragmenty) stanowią element powtarzający się różnych rodzin sekwencji powtarzalnych.

Obecność populacji fragmentów o długości 1050 pz stwierdzono także w genomach spokrewnionych z czosnkiem (*A. sativum*) m.in. u cebuli (*A. cepa*) czy pora (*A. porrum*). Co najmniej 30% genomu czosnku to sekwencje wysoce powtarzalne. Natomiast w genomach spokrewnionych ich procentowa zawartość jest znacznie niższa [1].

Zea mays

W genomie kukurydzy stwierdzono blisko 60–70% sekwencji repetytywnych. Główna ich część to krótkie, rozproszone elementy oddzielone odcinkami sekwencji unikalnych lub innych sekwencji powtarzających się [4]. W omawianym genomie wyróżniono dwa typy sekwencji powtarzających się:

1 – krótkie elementy powtarzające się o długości 500–1000 pz, oddzielone segmentami unikalnych odcinków DNA o długości 2100 pz [4]. Do tej grupy należy m.in. element Cin-1 o długości 700 pz. Może on być otoczony przez sekwencje unikalne 2300, 1050 czy 270 pz [3].

2 – sekwencje o umiarkowanej powtarzalności oddzielone elementami sekwencji wysoce powtarzalnych [3]. Ten rodzaj rozproszenia znany jest także w genomach grochu, pszenicy i żyta [4].

Lupinus luteus

W genomie łubinu żółtego zidentyfikowano i scharakteryzowano rozproszoną frakcję repetytywną nazwaną rodziną fragmentów EcoRI [18]. Długość elementu powtarzającego się wynosi co najmniej 16000 pz i w tym obszarze dokonano bliższej analizy organizacji wspomnianej sekwencji. Na przestrzeni wymienionych 16000 pz trzykrotnie powtarza się fragment EcoRI-EcoRI o długości 1070 pz. Liczbę jego kopii w haploidalnym genomie oceniono na $6,5 \times 10^4$. Występują także w tym obszarze odcinki wykazujące względem siebie wysoki stopień homologii sekwencyjnej, a poza tym odcinki unikalne w skali analizowanego obszaru (liczba kopii tych ostatnich wynosi $0,82 \times 10^4$). Opisana rodzina EcoRI jest więc przykładem sekwencji, w której w obszarze długiej jednostki powtarzającej się występują odcinki o różnej liczbie powtórzeń. Wydaje się, że obecność omawianej sekwencji może być cechą specyficzną gatunkowo. Znaczny procent elementów powtarzających się rodziny EcoRI stanowią krótkie wewnętrzne powtórzenia, proste (*direct*) i odwrócone (*inverted*) złożone z kilku do kilkunastu nukleotydów. Wymieniona cecha jest bardzo charakterystyczna dla poznanych sekwencji powtarzających się w genomach roślin [11, 14, 22].

Vicia faba

Użycie enzymu restrykcyjnego BamHI do trawień DNA izolowanego z bobu pozwoliło na identyfikację wysoce repetytywnej rodziny fragmentów o długości 250, 850, 900, 990, 1150, 1500 i 1750 pz [13]. Wykazano, że fragment o długości 250 pz stanowi 0,1% całkowitego DNA bobu. Jednakże, zastosowanie wspomnianego fragmentu jako radioaktywnej sondy hybrydacyjnej wskazało, że całkowita liczba sekwencji o bardzo wysokiej homologii sekwencyjnej względem użytej sondy sięga liczby 4% genomowego DNA. Analiza struktur pierwszorzędowych fragmentów 850 i 1750 pz wykazała, że ich terminalne odcinki wykazują ponad 80% homologię w stosunku do elementu o długości 250 pz.

W przeciwieństwie do poprzednio omawianych rodzin FokI i MluI, rodzina BamHI jest przykładem sekwencji powtarzającej się o charakterze rozproszonym.

Porównując konserwatywność elementów powtarzających się w opisywanych rodzinach stwierdzić można, że dwie pierwsze rodziny, tj. FokI i MluI, wykazują bardzo wysoką zgodność amplifikowanej sekwencji, podczas gdy fragmenty rodziny BamHI charakteryzują się znaczną heterogennością sekwencyjną [23]. Tłumaczy się to faktem, że szybkość zachodzenia różnych mutacji w amplifikowanych jednostkach tej rodziny (BamHI) była

wielokrotnie wyższa niż w przypadku rodzin FokI i MluI. Lokalizacja fragmentów rodziny BamHI wskazuje na ich rozrzucenie po całym genomie [22].

Cucurbitaceae

Poza opisanymi wcześniej sekwencjami tandemowymi w rodzinie *Cucurbitaceae* zostały zidentyfikowane również liczne sekwencje repetytywne o charakterze rozproszonym. Wśród czterech badanych gatunków omawianej rodziny stwierdzono kilka klas tych sekwencji, spośród których 75–80% stanowią sekwencje o krótkich elementach powtarzających się (ok. 300 pz), a 15–20% to sekwencje o długich elementach powtarzających się (2000–4000 pz). Długość sekwencji unikalnych oddzielających elementy obu wymienionych grup sięga 1800–2900 pz. Analiza porównawcza sekwencji repetytywnych w czterech gatunkach rodziny *Cucurbitaceae* wykazała, że zdecydowanie bardziej konserwatywne sekwencyjnie są te o długich elementach powtarzających się [16].

ODWRÓCONE POWTÓRZENIA

Powyżej przedstawiono wybrane przykłady sekwencji powtarzających się w genomach roślinnych. Charakterystyczną cechą niemal wszystkich poznanych sekwencji powtarzających się, niezależnie od modelu organizacji genomowej, jest obecność w nich "zduplikowanych" sekwencji o przeciwnej orientacji leżących w ścisłym sąsiedztwie. Nazywane są one odwróconymi powtórzeniami. Sekwencje te zawierają dwie komplementarne kopie tych samych układów nukleotydowych o przeciwnej orientacji na tym samym łańcuchu DNA. Kopie te mogą parować się wewnątrzłańcuchowo. W mikroskopie elektronowym odwrócone powtórzenia mogą być obserwowane jako struktury "spinki do włosów" lub struktury krzyżowe i muszą mieć jednoniciowy odcinek DNA (tzw. *loop*), którego długość zależy od długości odcinka zlokalizowanego między dwoma odwróconymi powtórzeniami. Około 30% odwróconych powtórzeń to tzw. sekwencje palindromowe, które pozbawione są odcinków "łącznikowych" (*spacer*). Liczba tego typu sekwencji w genomach bawełny, pszenicy, ryżu, tytoniu czy soi nie przekracza 5% [4]. Długość takich dupleksowych struktur u bawełny i pszenicy wynosi 50–900 pz. Liczba odwróconych powtórzeń w genomie jest tym wyższa, im większe są rozmiary genomu [4].

MODELE GENOMOWEJ ORGANIZACJI

Analiza nukleotydowa sekwencji kodujących, promotorów czy też terminatorów wskazuje, że są to regiony DNA o wysokim stopniu konserwatywności. Z reguły są to sekwencje krótkie i stanowią małą część genomu roślin. Natomiast znaczna część tych genomów to sekwencje mało konserwatywne, "rozwijające" się swobodniej. Flavell [4] zaproponował model różnych typów sekwencji tworzących duże frakcje DNA roślin wyższych. Model ten koresponduje z modelem zaproponowanym wcześniej przez Thompsona i Murraya [5], w którym krótkie powtórzenia identycznych sekwencji podzielone są odcinkami DNA o pojedynczej liczbie kopii (R-SC-R-SC-R-SC-R). Inny model zakładał kombinację różnych sekwencji powtarzających się rozproszonych między sobą wg wzoru $R^2-R^3-R^4-R^2-R^5-R^6-R^2$. Sugeruje się, że oba wymienione modele są wynikiem transpozycji krótkich

fragmentów DNA i ich dywergencji. Jeżeli procesom amplifikacji podlegają długie odcinki DNA (kilka tysięcy pz) jednego z wyżej wymienionych regionów, istnieje duże prawdopodobieństwo, że segmenty te będą przenoszone wraz z różnymi przylegającymi sekwencjami. Nowe rodziny tworzone w ten sposób tworzą tandemowy szyk elementów powtarzających się (m.in. ten rodzaj organizacji wykazuje genom żyta [4]).

Tandemowe szyki mogą tworzyć się w wyniku amplifikacji krótkich regionów wraz z odcinkami sekwencji unikalnych. Po amplifikacji, sekwencje takie mogą podlegać translokacjom, co w rezultacie tworzy rozproszony wzór sekwencji powtarzających się. Tak więc wg Flavella [4] pierwotnym typem sekwencji powtarzających się były układy tandemowe, a dopiero z nich wywodzą się różne wzory sekwencji rozproszonych. Wiele nowych kombinacji tworzy się drogą przemieszczeń sekwencji i ponownych amplifikacji. Przykładowo w genomie żyta jedną z nowych rodzin jest populacja fragmentów, gdzie element powtarzalny ma długość 2200 pz, ale w swoim "wnętrzu" zawiera cztery odcinki o długości 120 pz pochodzące z innej rodziny. Te niespokrewnione fragmenty wykazują, z kolei, homologię sekwencyjną względem innych elementów powtarzających się w genomie.

Innym istotnym komponentem w procesie ewolucji chromosomalnego DNA są delecje, które równoważą procesy amplifikacyjne.

ELEMENTY RUCHOME W GENOMACH ROŚLINNYCH I ICH PODOBIEŃSTWA Z SEKWENCJAMI POWTARZAJĄCYMI SIĘ

Elementy ruchome to odcinki DNA zdolne do zmiany swego położenia w obrębie genomu organizmu. Proces odpowiedzialny za te zmiany to transpozycja. Podstawową właściwością poznanych elementów ruchomych jest obecność terminalnych odwróconych powtórzeń. Stwierdzono m.in., że odwrócone powtórzenia elementu Ac kukurydzy mają długość 11 nukleotydów, ale sekwencje obu końców nie wykazują idealnej zgodności [17]. Tymczasem zdecydowana większość elementów z grupy Ds kukurydzy wykazuje całkowitą komplementarność swoich sekwencji terminalnych. Spostrzeżenie to dało podstawę do stwierdzenia, że owe skrajne nukleotydy nie są niezbędne w procesie rozpoznawania przez transpozazę – enzym przeprowadzający proces transpozycji [3, 20]. Poznanie molekularnej budowy wielu elementów ruchomych w genomach roślinnych, a z drugiej strony informacje na temat struktury sekwencji powtarzających się dały początek analizom porównawczym obu tych grup sekwencji. Między innymi Shepherd i wsp. [3] wysunęli sugestię, że klasy sekwencji powtarzających się o średniej liczbie kopii, stanowiące istotny składnik genomu kukurydzy podlegają procesom amplifikacji i rozpraszania na zasadzie transpozycji fragmentów DNA. Przedstawiciele tych samych rodzin sekwencji powtarzających się zlokalizowani byli w licznych, bardzo różnych miejscach wszystkich chromosomów.

Analiza sekwencji poznanych elementów ruchomych i przedstawicieli rozproszonych powtarzających się rodzin fragmentów DNA wykazała wiele wspólnych cech. W obu stwierdzono obecność odwróconych powtórzeń terminalnych, regiony promotorowe dla inicjacji transkrypcji, sygnały terminacji i przyłączania fragmentów poli A. Stwierdzono również liczne podobieństwa strukturalne. Przykładem tych zbieżności jest m.in. rozproszona rodzina Cin1 pochodząca z genomu kukurydzy, wykazująca cechy charakterystyczne dla znanych elementów ruchomych [7]. Terminalne sekwencje nukleotydowe jednostek

powtarzających się rodziny Cin1 odnaleziono także w terminalnych odwróconych odcinkach ruchomych elementów u *Drosophila* [3]. Ponadto wykazano podobieństwa w organizacji sekwencji do retrowirusów [7]. Wyniki porównań sugerują, że prawdopodobnie wiele rozproszonych powtórzeń jest pozostałością elementów ruchomych [3]. Fragmenty tych elementów w trakcie ewolucji podlegały procesom amplifikacji i transpozycji. Dodatkowo, obu wymienionym procesom towarzyszyły delecje. Przypuszczalnie te trzy zjawiska, intensywnie przebiegające w genomach roślinnych, wywarły decydujący wpływ na ewolucyjny rozwój i zmiany w sekwencjach powtarzających się [3].

Szukając wspólnego pochodzenia sekwencji powtarzających się i elementów ruchomych wysunięto hipotezę, w myśl której liczni przedstawiciele sekwencji rozproszonych są defektywnymi wersjami elementów ruchomych, które następnie przemieszczają się w genomie według mechanizmu odpowiedzialnego za transpozycję kompletnych elementów ruchomych [3, 15].

POSTULOWANE FUNKCJE SEKWENCJI POWTARZAJĄCYCH SIĘ

Mimo że sekwencje powtarzające się znane są od blisko 20 lat i na przestrzeni minionego okresu były coraz lepiej charakteryzowane, szczególnie w genomach zwierząt, nadal kwestią otwartą pozostają ich funkcje. Wiadomo, iż nieznacznym procent wśród nich stanowią sekwencje niektórych grup genów (np. histonów, rRNA, tRNA). Ze względu na znaczne ilości omawianych sekwencji w genomach powinny one pełnić funkcje strukturalne (i takie przypisywano im w chwili identyfikacji). Uważano, że sekwencje te niosą w sobie informację o określonym układzie przestrzennym chromosomów. Inne przypisywane im funkcje to: udział w kontroli ekspresji genów, w inicjacji replikacji, w procesach dojrzewania pre-mRNA, w rekombinacji.

Jednakże wymienione funkcje, podobnie jak szereg innych, nie doczekały się jeszcze ewidentnych dowodów potwierdzających słuszność tych zdań. Należy jednak wspomnieć, że istnieją sekwencje powtarzające się, których funkcję dokładnie określono np. sekwencja tandemowa (GAGCT)_n i (GGGGT)_n genomów immunoglobulinowych w procesach rekombinacji S-S [15].

LITERATURA

- [1] BARNES SR, JAMES AM, JAMIESON G. The organization nucleotide sequence and chromosomal distribution of a satellite DNA from *Allium cepa*. *Chromosoma* 1985; **92**: 185–192.
- [2] BRITTEN RJ, KOHNE DE. Repeated sequences in DNA. *Science* 1986; **161**: 539–540.
- [3] DORING HP, STALINGER P. Molecular genetics of transposable elements in plants. *Ann Rev Genet* 1986; **20**: 175–200.
- [4] FLAVELL RB. The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences. *Ann Rev Plant Physiol* 1980; **31**: 569–596.
- [5] FLAVELL RB. Repeated sequences and genome architecture. New York Plenum Press 1986; 1–14.
- [6] FLAVELL RB. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. *Phil Trans R Soc London B* 1986; **312**: 227–242.

- [7] GIRL A, SAEDLER H. The En/Spm transposable element of *Zea mays*. *Plant Mol Biol* 1989; **13**: 261–266.
- [8] HALLDEN C, BRYNGELSSON T, SALL T, GUSTAFSSON M. Distribution and evolution of tandemly repeated DNA sequence in the family *Brassicaceae*. *J Mol Evol* 1987; **25**: 318–323.
- [9] HARDMAN N. Structure and function of repetitive DNA in eucaryotes. *Biochem J* 1986; **234**: 1–11.
- [10] HIRANO H, TAKEDA Y, IWAMURA T. Unique repetitive sequences of 170 bp in *Chlorella*. *Plant Mol Biol* 1986; **7**: 311–317.
- [11] JUNGHANS H, METZLAFF M. Genome specific highly repeated sequences of *Hordeum vulgare*: cloning, sequencing and squash dot test. *Theor Appl Genet* 1988; **76**: 728–732.
- [12] KATO A, YAKURA K, TANIFUJI S. Sequence analysis of *Vicia faba* repeated DNA the FokI repeat element. *Nucl Acid Res* 1984; **12**: 6415–6425.
- [13] KATO A, JIDA Y, YAKURA K, TANIFUJI S. Sequence analysis of *Vicia faba* higher repeated DNA: the BamHI repeated sequences families. *Plant Mol Biol* 1985; **5**: 41–53.
- [14] LECLERC RF, SIEGEL A. Characterization of repetitive elements in several *Cucurbita* species. *Plant Mol Biol* 1987; **8**: 497–507.
- [15] LASSOTA Z. *Biologia molekularna*. 1987, PWN Warszawa; 157–168.
- [16] MIRNAL R, BHAVE VS, GUPTA VS, RANJEKAR PK. Arrangement and size distribution of repeat and single copy DNA sequences in four species of *Cucurbitaceae*. *Plant Syst Evol* 1986; **152**: 133–151.
- [17] PEREIRA A, CUYPERS H, GIERL A, SCHWARZ-SOMMER ZS, SAEDLER H. Molecular analysis of the En/Spm transposable system of *Zea mays*. *EMBO J* 1986; **5**: 835–841.
- [18] SAKOWICZ T, GAŁĄZKA G, KONARZEWSKA A, KWINKOWSKI M, KŁYSIK J. An unusually high number of direct repeat detected by sequence analysis of the dispersed EcoRI family fragments in *Lupinus luteus*. *Planta* 1986; **168**: 207–213.
- [19] SORENSEN JC. The structure and expression of nuclear genes in higher plants. *Adv Genet* 1984; **22**: 109–144.
- [20] TAYLOR LP, CHANDLER VL, WALBOT V. Insertion of 1.4 kb and 1.7 kb Mu elements into the Bronzel gene of *Zea mays*. *Maydica* 1986; **31**: 31–45.
- [21] Van't HOF J, HERNANDEZ P, BJERKNES CA, LAMM SS. Localization of the replication origin in the 9 kb repeat size class of rDNA in pea. *Plant Mol Biol* 1987; **9**: 87–95.
- [22] YAKURA K, KATO A, TANIFUJI S. Cytological localization of highly repeated DNA sequences, the FokI sequence family and BamHI sequence families in *Vicia faba* chromosomes. *Jap J Genet* 1987; **62**: 325–332.
- [23] YAKURA K, KATO A, TANIFUJI S. Length heterogeneity of the large spacer of *Vicia faba* rDNA is due to the differing number of 325 bp repetitive sequence elements. *Mol Gen Genet* 1984; **193**: 41–53.

Otrzymano 20 sierpnia 1990 r.

Przyjęto 11 września 1990 r.

Adres autora: 50-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

DESMOSOMY PUNKTOWE I ICH STRUKTURA MOLEKULARNA

SPOT DESMOSOMES AND THEIR MOLECULAR STRUCTURE

Krystyna KOZŁOWSKA i Krystyna KILKOWSKA-CHADZY PANAGIOTIS

Pracownia Cytofizjologii Zakładu Histologii i Samodzielna Pracownia Embriologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Streszczenie. Przedstawiono w ogólnym zarysie aktualne dane o ultrastrukturze, składowych biochemicznych i organizacji molekularnej desmosomów punktowych. Podkreślono różnice związane z ich pochodzeniem histologicznym. Zwrócono uwagę na rolę składowych desmosomalnych jako markerów w identyfikacji nowotworów.

Słowa kluczowe: połączenia międzykomórkowe, desmosomy punktowe, białka i glikoproteiny desmosomalne, filamenty pośrednie

Summary. Topical data concerning spot desmosomes ultrastructure, biochemical components and molecular organisation was presented in general outline; differences connected with their histological origin were stressed. Emphasized is a role of desmosomal components as a markers for identification of tumours.

Key words: intercellular junctions, spot desmosomes, desmosomal proteins and glycoproteins, intermediate filaments

WSTĘP

Organizmy zwierząt wyższych, chociaż składają się z wielu odrębnych komórek, to jednak funkcjonują jako jednolita całość. Cechą charakterystyczną organizacji tkankowej jest wzajemne oddziaływanie strukturalne i funkcjonalne przyległych komórek. Fundamentalną rolę w tym zjawisku odgrywają wyspecjalizowane obszary sąsiadujących ze sobą komórek, tworzące struktury zwane **połączeniami międzykomórkowymi**.

Wśród wielu rodzajów opisywanych połączeń międzykomórkowych dość dobrze poznano ultrastrukturę oraz skład biochemiczny połączeń określanych mianem desmosomów.

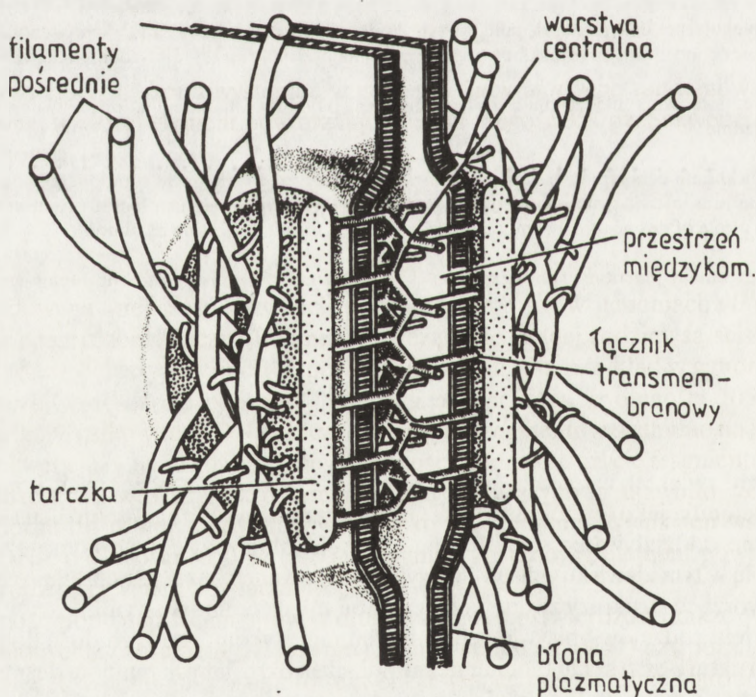
Szczególnie poznano budowę molekularną desmosomu, zwanego punktowym (ang. *spot desmosome*, *macula adherens*), do czego przyczynił się zarówno postęp w metodach

izolacji, jak i dostępność do badań materiału, w którym szczególnie obficie te struktury występują. Lata osiemdziesiąte naszego stulecia dostarczyły także wielu informacji o organizacji molekularnej makrocząsteczek w obrębie tych struktur.

DESMOSOM PUNKTOWY I JEGO ULTRASTRUKTURA

Desmosomy punktowe, opisane w 1954 r. przez Portera, tworzą pomiędzy sąsiednimi komórkami połączenia mające charakterystyczną morfologię [29]. Struktury te kształtem przypominają dyski o wymiarach 200–500 nm. Pomiedzy błonami plazmatycznymi przylegających komórek istnieje przestrzeń wynosząca średnio 30 nm (a więc większa niż w innych typach połączeń międzykomórkowych). Przestrzeń ta jest wypełniona włókninowatym materiałem przedzielonym przez jej środek elektronowo gęstą linią.

W cytoplazmie komórek, w obszarach desmosomów, do błon plazmatycznych sąsiadujących komórek przylegają struktury o dużej gęstości elektronowej; średnicy 0,5 μm i grubości 15–20 nm, zwane tarczkami lub płytkami. Do tarczek przylegają filamenty pośrednie. Wzajemny układ względem siebie wyżej opisanych struktur graficznie przedstawia rysunek 1 [29].



Rys. 1. Model desmosomu punktowego (wg Staehelin i wsp. [29], nieco zmodyfikowane)

SKŁAD BIOCHEMICZNY

Źródłem desmosomów do wielu badań jest nabłonek wielowarstwowy, płaski pyska wołu [5, 14, 19]. Desmosomy występują tu szczególnie obficie, jak też stosunkowo łatwo dają się stąd izolować. Doskonalenie metod izolacji pozwoliło na uzyskiwanie frakcji zawierających tylko tarczki desmosomalne oraz frakcji, które zawierały substancje zajmujące obszar międzykomórkowy. Frakcje zawierające obszar międzykomórkowy określone są przez niektórych badaczy jako "rdzeń" lub "desmoglea" [11]. Zaś jak podaje Penn i wsp., w 1987 r. udało się uzyskać zarówno czyste frakcje tarczki desmosomalnych bez mikrofilamentów, jak i z filamentami [24]. Ten materiał analizowany biochemicznie pozwolił ustalić, iż zarówno w tarczках, jak i obszarach błon plazmatycznych wchodzących w obręb desmosomów występuje zestaw specyficznych białek i glikoprotein typowych tylko dla tego obszaru komórki i tylko dla tych struktur [8, 11, 16, 20, 27, 32].

Badania biochemiczne, wzbogacone w ostatnich latach stosowaniem przeciwciał monoklonalnych, pozwoliły na specyficzną i dokładniejszą lokalizację określonych substancji w obrębie desmosomów.

BIĄŁKA

Do chwili obecnej wyizolowano i częściowo scharakteryzowano grupę białek uważanych za główne białka tej substruktury, które określono nazwą **desmoplakiny**. Obecnie wyróżniamy cztery desmoplakiny. Desmoplakinę I o m. cz. 240 kDa oraz desmoplakinę II o m. cz. 210 kDa wyizolowano już w 1983 r. [19]. W dwa lata później Gorbsky i wsp. [11] opisali dwie dalsze: desmoplakinę III o m. cz. 81 kDa i desmoplakinę IV o m. cz. 77 kDa. Desmoplakinę I, II i III lokalizuje się w tarczce, natomiast desmoplakina IV nie ma do końca ustalonej lokalizacji, a tylko przypuszcza się, że również znajduje się w tarczce. Desmoplakiny I i II wykazują dość znaczne podobieństwo w zakresie wartości ich punktu izoelektrycznego i jak wykazano w reakcji krzyżowej z przeciwciałami przeciw tym białkom, mają także wspólne determinanty antygenowe [11]. Ustalono [21], iż desmoplakina I występuje jako dimer, natomiast desmoplakina II ma postać monomeryczną. Autorzy uważają, iż wiąże się to z różnicami w składzie aminokwasowym tych obydwu białek, a mianowicie: desmoplakina II poza wyższą zawartością (o ok. 10%) glicyny nie ma tego fragmentu polipeptydowego, który umożliwia desmoplakinie I tworzenie dimerów.

Cowin i wsp. [4] uważają, iż desmoplakiny I i II pochodzące z desmosomów różnych tkanek i gatunków wykazują bardzo duże podobieństwa biochemiczne i charakteryzuje je stabilność ewolucyjna. Jednakże przeważa opinia, że tylko desmoplakina I jest stałym składnikiem tarczki desmosomalnych niezależnie od pochodzenia histologicznego desmosomów.

Białko to obecne jest zarówno w desmosomach wszystkich nabłoneków, jak i desmosomach mięśnia sercowego [5, 7, 9, 15]. Natomiast desmoplakina II występuje tylko w desmosomach nabłoneków wielowarstwowych i desmosomach nowotworów wywodzących się z tych nabłoneków [2, 6, 8, 14]. W związku z tym, że białko to występuje w nabłonekach wielowarstwowych w dużych ilościach, uważa się, że desmoplakina II związana jest z tworzeniem się warstw komórek [4]. Stosowanie przeciwciał przeciw desmoplakinom I i II wykazało, że nie występują one w żadnym innym typie połączeń międzykomórkowych

oprócz desmosomów; białka te zatem mogą być uważane za określające specyficznie typ połączenia międzykomórkowego.

Desmoplakiny III i IV, choć nie są zbadane tak dokładnie jak desmoplakiny I i II, to jednak uważa się, że są to białka różniące się znacznie od siebie tak pod względem lokalizacji, jak i cechami immunologicznymi.

Od 1985 r. opisuje się obecność w desmosomach jeszcze jednego wysoce specyficznego białka o m. cz. 240 kDa nazwanego przez Tsukita i wsp. **desmokalminą** [32]. Oczyszczona desmokalmina jest białkiem jednorodnym, wykazuje zależną od jonów wapnia zdolność do wiązania się z kalmoduliną. Tak pod względem antygenowości, jak i wartości punktu izoelektrycznego jest białkiem zdecydowanie różnym od desmoplakin. Oczyszczona forma desmokalminy składa się z dwóch łańcuchów polipeptydowych; w mikroskopie elektronowym wygląda jak zgięta różga o długości 10 nm.

Postuluje się, że białko to bierze udział w tworzeniu krzyżowych wiązań łączących filamenty keratyny między sobą, a lokalizując się w tarczce desmosomalnej od strony błony plazmatycznej wiąże się z tymi filamentami.

Desmokalmina uważana jest za kluczowe białko w tworzeniu desmosomów, ponieważ udowodniono, iż powstawanie tych struktur zależne jest od stężenia jonów wapnia [22, 23, 26]. Udowodniono także, iż desmokalmina nie tworzy połączeń z filamentami aktynowymi [32].

Ponadto, opisuje się również występowanie w tarczce desmosomalnej białka o m. cz. 83 000 kDa, zwanego **plakoglobina** [6]. Jednakże białko to nie jest składową wyłącznie tarczy desmosomalnych, stwierdzono bowiem, iż występuje również w innych typach połączeń międzykomórkowych. Oprócz tego plakoglobina występuje w formie rozpuszczalnej, a więc obecna jest także poza obszarem połączeń międzykomórkowych.

GLIKOPROTEINY

W 1981 r. Gorbsky i wsp. wykazali w desmosomach obecność białek glikozylowanych w subfrakcji określanej jako "rdzeń" desmosomów [10].

Glikoproteiny desmosomalne nazwano **desmogleinami** i stwierdzono, że są heterogennymi substancjami. Pomimo istnienia rozbieżności w określeniu stopnia heterogenności tych związków, ukształtował się pogląd, iż poszczególne desmogleiny należy traktować jako rodziny glikoproteinowe, a nie wyraźnie indywidualne substancje [4, 9, 20, 31].

Na podstawie wyników rozdzielania na żelu poliakrylamidowym część autorów opisała występowanie w obrębie desmosomów trzech grup glikoprotein [9, 30, 31] wyróżniając: desmogleinę I (obejmującą trzy pokrewne substancje o m. cz. 150–165 kDa; desmogleinę Ia, Ib, Ic), desmogleinę II (składającą się z dwóch substancji: II a – m. cz. 115 kDa, II b – m. cz. 100 kDa) oraz desmogleinę III m. cz. 22 kDa. Inni autorzy [2, 10, 24] wskazują na obecność czterech grup glikoprotein: desmogleina I – m. cz. 165 kDa, II – m. cz. 120 kDa, III – 100 kDa, IV – 22 kDa. Różnice w ruchliwości elektroforetycznej, opisywane przez różnych autorów dla tych samych desmoglein, traktowane są jako odbicie różnic tkankowych i gatunkowych, zwłaszcza że heterogenność desmoglein izolowanych z różnych źródeł dotyczy nie tylko różnej masy cząsteczkowej tych glikoprotein, ale wiąże się z różnicami w ich reaktywności immunologicznej [9, 31].

Nowsze i szczegółowe badania Schmelz i wsp. [13, 27, 28] nad desmogleiną I izolowaną z desmosomów różnych nabłonek, a także mięśnia sercowego bydłęcego, szczura i

człowieka wykazują, iż substancja ta ma taką samą masę cząsteczkową wynoszącą 165 kDa. Czy zaś istnieją różnice w stopniu glikolizacji lub sekwencji aminokwasów pomiędzy desmogleiną I pochodzącą z różnych tkanek i gatunków, nie jest całkowicie jasne [24, 27]. Aktualnie przyjmuje się, iż desmogleinę I można uznać za substancję obecną we wszystkich desmosomach niezależnie od ich pochodzenia histologicznego [5, 7, 11, 19]. Nie wykazano także krzyżowej reakcji między desmogleiną I i II. Odnośnie desmoglein II i III ustalony jest pogląd, że wykazują one znaczne różnice tkankowe i gatunkowe.

Opisano, że przeciwciała monoklonalne przeciwko desmogleinom II i III izolowanym z desmosomów pyska bydłowego nie reagowały z desmogleinami II/III nabłonka przełyku i rogówki [9, 31]. Glikoproteinom tym przypisuje się rolę molekuł adhezyjnych [2, 13, 20, 24, 25] i wobec tego ich specyfika tkankowa i gatunkowa warunkowałaby zróżnicowaną adhezję cechującą różne tkanki. W związku z tą funkcją desmoglein II/III istnieją propozycje, aby nazwać je **desmokollinami**; desmogleinę II – desmokolliną I, a desmogleinę III – desmokolliną II [20, 30].

Jeżeli zaś chodzi o lokalizację opisywanych glikoprotein w obrębie desmosomów, to desmogleiny I i II należy uważać za transbłonowe glikozyłowane białka, których część białkowa zlokalizowana jest w tarczce, natomiast część z łańcuchami oligosacharydowymi znajduje się w przestrzeni międzykomórkowej ponad powierzchnią błony plazmatycznej [30]. Lokalizacja desmoplakin III/IV w obrębie desmosomów nie została jeszcze ustalona (tab. 1).

TABELA 1. Główne składniki desmosomów nabłonków wielowarstwowych i ich lokalizacja

Rodzaj substancji	M. cz. w kDa	Lokalizacja		
		tarczka	przestrzeń międzykomórkowa	mikrofilamenty
Białka				
Desmoplakina I	240	+	-	+
Desmoplakina II	210	+	-	+
Desmoplakina III	81	+	-	-
Desmoplakina IV	77	?	-	?
Desmokalmina	240	+	-	+
Glikoproteiny				
Desmogleina I	165	+	+	-
Desmogleina II (desmokollina I)	120	+	+	-
Desmogleina III (desmokollina II)	100	?	?	-
Desmogleina IV	22	?	?	-

MOLEKULARNA ORGANIZACJA DESMOSOMU

Pomimo wzmiankowanych rozbieżności co do lokalizacji pewnych składowych desmosomu i braku informacji o rozmieszczeniu innych, obserwuje się w literaturze dążenie badaczy do stworzenia obrazu molekularnego uporządkowania głównych komponent białkowych i glikoproteinowych w obrębie desmosomu.

Model molekularnej organizacji desmosomu punktowego jest przedstawiony na rysunku 2.

Steinberg i wsp. [30] badając metodą immunohistochemiczną lokalizację cząstek złota w ultracienkich skrawkach desmosomów stwierdzili, iż w obrębie tarczki znajdują się desmoplakiny I, II i III z tym, że desmoplakina III lokalizuje się wyłącznie w tarczce, natomiast desmoplakiny I i II sięgają do cytoplazmy poza region tarczki, gdzie łączą się z filamentami pośrednimi, które jak wynika z diagramu, nie wchodzi w obszar tarczki, a tylko przylegają do niej. Natomiast desmogleiny I i II znajdują się w obrębie tarczki, łączą ją z błoną plazmatyczną i jako glikozylowane białka transbłonowe przechodzą ponad fosfolipidową płaszczyznę błony do przestrzeni międzykomórkowej; jak już wspomniano uprzednio, oligosacharydowe łańcuchy I i II znajdują się wyłącznie w przestrzeni międzykomórkowej.

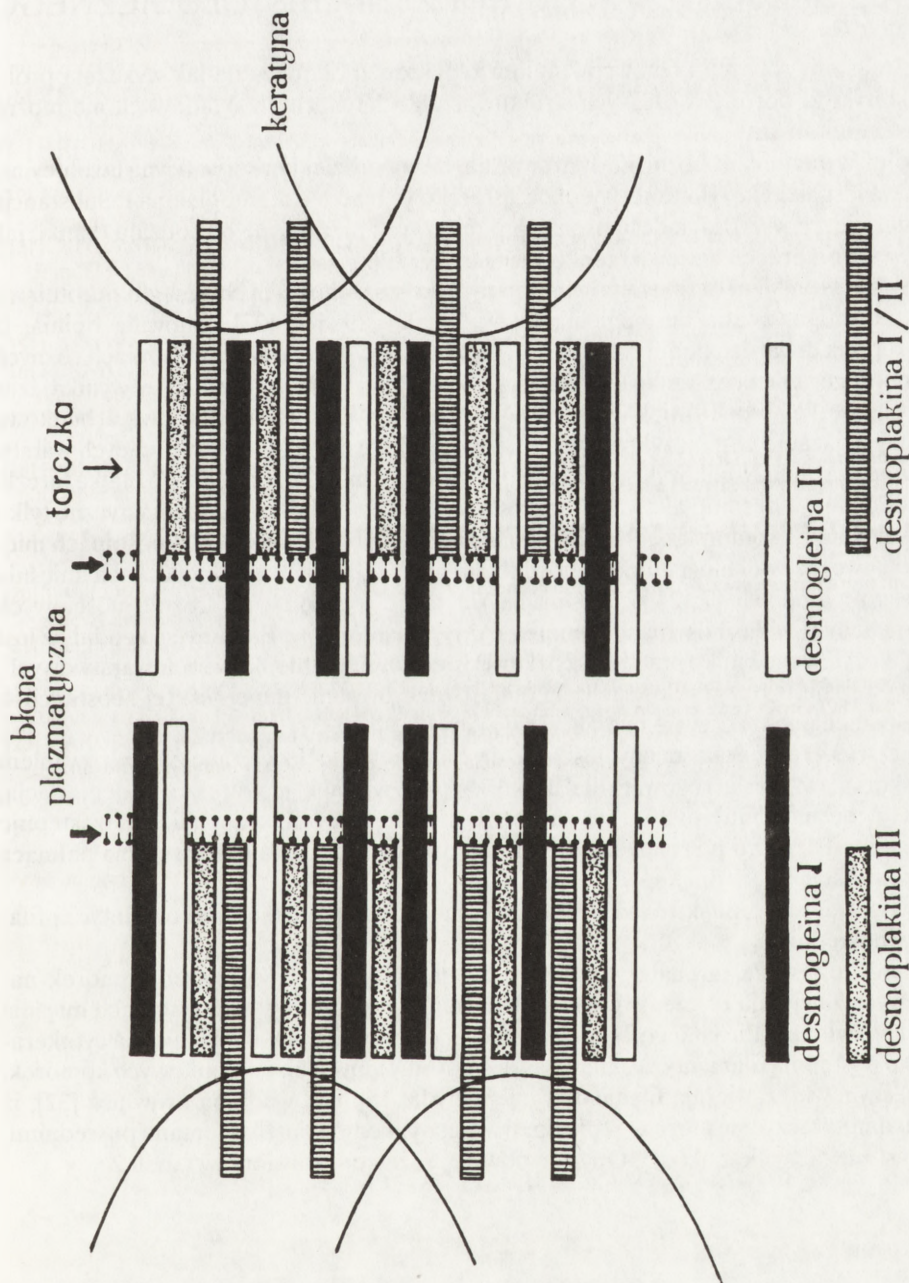
FILAMENTY POŚREDNIE DESMOSOMÓW PUNKTOWYCH

Filamenty pośrednie (IF – *intermediate filaments*) są stałymi elementami składowymi wszystkich desmosomów [3, 8, 12] według pewnych autorów "zakotwiczone" w tarczках desmosomalnych [11, 27], według innych łączącymi się z tarczками za pomocą biochemicznych składowych desmosomów [8, 30, 32].

Jednakże w odróżnieniu od połączeń niedesmosomalnych, gdzie w mikrofilamentach mogą występować białka, takie jak α -aktylina czy wikulina oraz glikoproteina, zwana uwomoruliną [14, 27], cechą desmosomalnych filamentów pośrednich jest brak wyżej wymienionych substancji, natomiast ich skład molekularny zależy od pochodzenia histologicznego desmosomów. Filamenty keratynowe (cytokeratynowe) występują w desmosomach izolowanych z komórek nabłonkowych [4, 5, 8]. Desmina jest wykrywana w desmosomach komórek mięśnia sercowego, włókien Purkiniego z układu przewodzącego oraz komórek mięśnia sercowego w hodowlach [7, 15]. Wimentyna jest typową składową desmosomów komórek pączyńki oraz nowotworów wywodzących się z niej [8, 15].

Jak się okazuje, filamenty pośrednie są nie tylko morfologicznym elementem składowym desmosomu.

Jones i wsp. [12] postulują, że w czasie morfogenezy desmosomów ich wędrówka w kierunku błony plazmatycznej poprzedza wędrówkę specyficznych białek i glikoprotein wchodzących w skład tarczki; zatem IF są składnikami inicjującymi morfogenezę desmosomów. W filamentach desmosomów wątroby, nabłonka wielowarstwowego płaskiego języka oraz mięśnia sercowego opisywano obecność plektyny, polipeptydu o m. cz. 300 kDa [34]. Białko to występuje również w cytoskielecie komórek i tkanek nie tworzących desmosomów (tab. 1).



Rys. 2. Molekularna organizacja białek i glikoprotein w obrębie desmosomu punktowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego (wg Steinberga i wsp. [30] nieco zmodyfikowane)

RÓŻNICE W SKŁADZIE DESMOSOMÓW W ZALEŻNOŚCI OD ICH POCHODZENIA HISTOLOGICZNEGO

Desmosomy różnych kręgowców są morfologicznie podobne, ale jak wykazują próby charakterystyki porównawczej tych struktur, ich biochemicznych składowych nie można uważać za identyczne.

Jak już wspomniano, różni autorzy uważają, iż najbardziej konserwatywną ewolucyjnie składową jest nieglikozylowane, wysokocząsteczkowe białko – desmoplakina I. Substancja ta występuje we wszystkich desmosomach punktowych niezależnie od rodzaju tkanki, jak również w komórkach hodowli tkankowych [4, 5, 7, 19].

Innym składnikiem desmosomów zaliczonym do "wszechobecnych" jest glikoproteina o m. cz. 165 kDa, zwana desmogleiną I [27, 28]. Do 1986 r. [27] panowała opinia, iż glikoproteina ta bardzo podobna, jeśli nie identyczna, występuje w desmosomach różnych komórek tego samego gatunku. Jednakże z badań Penn i wsp. [24] z 1987 r. wynika, iż w desmogleinie I nabłonka wielowarstwowego pomiędzy częścią cukrowcą a białkową występuje wiązanie O-glikozyłowe, zaś w desmogleinie nabłonek nie tworzących warstw występuje wiązanie N-glikozyłowe. Dalsze opisywane różnice dotyczą innego białka tarczki desmosomalnej – desmoplakiny II. Podkreśla się, że jest to białko charakterystyczne tylko dla desmosomów komórek nabłonkowych, nie występuje natomiast w desmosomach mięśnia sercowego, włóknach Purkiniego układu przewodzącego i w komórkach mięśnia sercowego z hodowli [7, 24, 25]. Opisuje się także występowanie różnic ilościowych desmoplakiny II w desmosomach komórek różnych nabłonek. Badacze są zgodni, iż jest to nieglikozylowane białko przede wszystkim desmosomów nabłonek wielowarstwowch, gdzie występuje w dużych ilościach, natomiast zdecydowanie mniej jest tej substancji w desmosomach nabłonek nie tworzących warstw [3, 14, 19, 31].

King i wsp. [16] opisali zmiany ilościowe desmogleiny II i III związane z różnicowaniem się naskórka; w czasie rogowacenia naskórka (co związane jest zresztą z degradacją, rozpadem desmosomu) obniża się zawartość desmogleiny II, a jej miejsce zastępuje desmogleina III, która po rozpadzie desmosomów pozostaje jako glikoproteina pełniąca już tylko funkcję adhezyjną.

Najwyraźniejsze jednak różnice w składzie molekularnym desmosomów dotyczą filamentów pośrednich.

Podkreślić jeszcze raz należy, iż wszystkie desmosomy prawidłowych komórek nabłonkowych zawierają filamenty cytokeratynowe [3]. Natomiast w desmosomach mięśnia sercowego, włókien Purkiniego i komórek mięśnia sercowego w hodowli nie ma cytokeratyn, tylko występują filamenty desminy, zaś desmosomy innych nienabłonkowych komórek, np. pajęczynówki, zawierają filamenty wimentyny [8, 15]. Udowodniono również [32], iż desmokalmina łączyć się może ze wszystkimi wyżej wymienionymi filamentami pośrednimi, natomiast nie łączy się z aktyną. Opisane powyżej różnice zestawiono w tabeli 2.

TABELA 2. Różnice w budowie molekularnej desmosomów w zależności od ich pochodzenia histologicznego

Biochemiczne składniki desmosomów	Desmosomy		
	nabłonków jednowarstwowych i kom. hodowli	wielowarstwowych	mięśnia sercowego pajęczynówki
Białka			
Desmoplakina I	+	+	+
Desmoplakina II	+	+++	-
Glikoproteiny			
Desmogleina I	+	+	+
Desmogleina II	+	+	+
Desmogleina III	+	++	+
Filamenty pośrednie			
Cytokeratyny	+	+	-
Desmina	-	-	+
Wimentyna	-	-	-

DESMOSOMALNE BIAŁKA I FILAMENTY POŚREDNIE W IDENTYFIKACJI NOWOTWORÓW

Możliwość wykrywania przy użyciu specyficznych przeciwciał białek desmosomalnych i filamentów pośrednich wykorzystywana jest obecnie jako metoda w diagnostyce różnicowej nowotworów. Informacje umieszczone w poprzednim podrozdziale wskazują na istnienie naturalnych różnic w składzie molekularnym desmosomów związanych z ich pochodzeniem.

Wiadomo, że wraz z transformacją nowotworową różnice te potęgują się, desmosomy zatracają swoją charakterystyczną strukturę, obserwowane są zmiany w cytoszkieletcie komórkowym [1, 33]. Zmienia się również morfologia komórek, wobec tego przy ocenie obrazu mikroskopowego nowotworu niejednokrotnie pojawiają się wątpliwości diagnostyczne. W takich przypadkach wykrycie desmoplakin i określenie rodzaju filamentów pośrednich według wielu autorów staje się ogromnie przydatne w identyfikacji nowotworów [15, 17, 18]. Stwierdzono również na przykład, iż raki skóry wykazują reakcję pozytywną na desmoplakiny i cytokeratyny, podczas gdy czerniak, który wywodzi się z komórek pochodzenia ektodermalnego i rosnąc może wykazywać nabłonkowo-podobny układ komórek przypominający obrazy niezróżnicowanego raka skóry, jest zawsze "desmoplakino-negatywny" i nie wykazuje obecności cytokeratyn, tylko obecność wimentyny [18].

Wydaje się, że powyższy przykład jest dobrą ilustracją możliwości, jakie stwarza dla diagnostyki różnicowej nowotworów traktowanie składowych desmosomalnych jako markerów. Wybrane przykłady ilustrujące opisane powyżej możliwości zestawiono w tabeli 3.

TABELA 3. Wybrane przykłady składników desmosomalnych jako markery różnego typu nowotworów

Rodzaj nowotworu	Desmoplakiny	Cytokreatyny	Wimentyna	Desmina
Rak podstawno-komórkowy skóry	+	+	-	-
Rak płasko-nabłonkowy skóry	+	+	-	-
Oponiak	+	-	+	-
Czerniak	-	-	+	-
Mięśniak gładko-komórkowy mięsakowy (<i>leiomyosarcoma</i>)	-	-	±	+
Mięśniak poprzecznie prążkowany mięsakowy (<i>rhabdomyosarcoma</i>)	-	-	+	+

LITERATURA

- [1] BEN ZEEV A. The cytoskeleton in cancer cell. *Biochem Biophys Acta* 1984; **780**: 197-212.
- [2] BLASCHUK O, MANTEUFFEL R, STEINBERG M. Purification of desmoglein II: a method for the preparation and fractionation of desmosomal components. *Biochem Biophys Acta* 1986; **883**: 426-431.
- [3] BOLOBNA M, ALLEN R, DULBECCO R. Organization of cytokeratin bundles by desmosomes in rat mammary cells. *J Cell Biol* 1986; **102**: 560-567.
- [4] COWIN P, GARROD D. Antibodies to epithelial desmosomes show wide tissue and species cross-reactivity. *Nature* 1983; **302**: 148-150.
- [5] COWIN P, KAPPRELL H, FRANKE W. The complement of desmosomal plaque proteins in different all types. *J Cell Biol* 1985; **101**: 1442-1454.
- [6] COWIN P, KAPPRELL H, FRANKE W, TAMKUN J, HYNES R. Plakoglobin: A protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell* 1986; **46**: 1063-1073.
- [7] FRANKE W, MOLL R, SCHILLER D, SCHMID E, KARTENBECK J, MUELLER H. Desmoplakins of epithelial and myocardial desmosomes are immunologically and biochemically related. *Differentiation* 1982; **23**: 115-127.
- [8] FRANKE W, COWIN P, KAPPRELL H. The desmosomal plaque and the cytoskeleton. *Ciba Found* 1987; **125**: 26-44.
- [9] GIUDICE G, COHEN S, PATEL N, STEINBERG M. Immunological comparison of desmosomal components from several bovine tissue. *J Cell Biochem* 1984; **26**: 35-45.
- [10] GORBSKY G, STEINBERG M. Isolation of the intercellular glycoproteins of desmosomes. *J Cell Biol* 1981; **90**: 243-248.
- [11] GORBSKY G, COHEN S, SHIDA H, GIUDICE G, STEINBERG M. Isolation of the non-glycosylated proteins of desmosomes and immunolocalization of the third plaque protein: Desmoplakin III. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 810-814.
- [12] JONES C, GOLDMAN P. Intermediate filaments and the initiation of desmosome assembly. *J Cell Biol* 1985; **101**: 506-517.
- [13] JONES JC, YOKOO KM, GOLDMAN RD. A cell surface desmosome-associated component: identification of a tissue-specific cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7282-7286.
- [14] KAPPRELL H, OWARIBE K, FRANKE W. Identification of a basic protein of Mr 75 000 as an accessory desmosomal plaque protein in stratified and complex epithelia. *J Cell Biol* 1988; **106**: 1679-1691.
- [15] KARTENBECK J, SCHWECHHEIMERK, MOLL R, FRANKE W. Attachment of vimentin filaments to desmosomal plaques in human meningioma cells and arachnoidal tissue. *J Cell Biol* 1984; **98**: 1072-1081.
- [16] KING J, TABIOWO A, FREYR R. Evidence that major 78-44 kD concanavalin A-binding glycopeptides in pig epidermis arise from the degradation of desmosomal glycoproteins during terminal differentiation. *J Cell Biol* 1987; **105**: 3053-3063.

- [17] MOLL R, FRANKE W, SCHILLER D, GEIGER B, KREPLER R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; **31**: 11–24.
- [18] MOLL R, COWIN P, KAPPRELL H, FRANKE W. Biology of disease. Desmosomal proteins: A new markers for identification and classification of tumors. *Lab Invest* 1986; **54**: 4–25.
- [19] MUELLER H, FRANKE W. Biochemical and immunological characterization of desmoplakins I and II, the major polypeptides of the desmosomal plaque. *J Mol Biol* 1983; **163**: 647–671.
- [20] OBRINK B. Epithelial cell adhesion molecules. *Exp Cell Res* 1986; **136**: 1–21.
- [21] O'KEEFE E, ERICKSON H, BENNETT V. Desmoplakin I and desmoplakin II. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1989; **264**: 8310–8313.
- [22] PASDAR M, NELSON W. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I Biochemical analysis. *J Cell Biol* 1988; **106**: 687–695.
- [23] PASDAR M, NELSON W. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. II Morphological analysis. *J Cell Biol* 1988; **106**: 687–695.
- [24] PENN E, HOBSON CH, REES D, MAGEE A. Structure and assembly of desmosome junctions: biosynthesis, processing and transport of the major protein and glycoprotein components in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 1987; **105**: 57–68.
- [25] PENN E, BURDETT I, HOBSON CH, MAGEE A. Structure and assembly of desmosome junctions: biosynthesis and turnover of the major desmosome components of Madin-Darby canine kidney cells in low calcium medium. *J Cell Biol* 1987; **105**: 2327–2334.
- [26] SHEU H-M, KITAJIMA Y, YAOITA H. Involvement of protein kinase C in translation of desmoplakins from cytosol to plasma membrane during desmosome formation in human squamous cell carcinoma cells grown in low to normal calcium concentration. *Exp Cell Res* 1989; **185**: 176–190.
- [27] SCHMELZ M, DUDEN R, COWIN P, FRANKE W. A constitutive transmembrane glycoprotein of Mr 165 000 (desmoglein) in epidermal and non-epidermal desmosomes. I Biochemical identification of the polypeptide. *Eur J Cell Biol* 1986; **42**: 177–183.
- [28] SCHMELZ M, DUDEN R, COWIN P, FRANKE W. A constitutive transmembrane glycoprotein of Mr 165 000 (desmoglein) in epidermal and non-epidermal desmosomes. II Immunolocalization and microinjection studies. *Eur J Cell Biol* 1986; **42**: 184–199.
- [29] STAEHELIN A, HULL B. Junctions between living cells. *Sci Am* 1978; **238**: 140–154.
- [30] STEINBERG M, SHIDA H, GIUDICE G, SHIDA M, PATEL N, BLASCHUK O. On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. *Ciba Found Symp* 1987; **125**: 3–25.
- [31] SUHRBIER A, GARROD D. An investigation of the molecular components of desmosomes in epithelial cells of five vertebrates. *J Cell Sci* 1986; **81**: 223–242.
- [32] TSUKITA S, TSUKITA S. Desmocalmin: a calmodulin-binding high molecular weight protein isolated from desmosomes. *J Cell Biol* 1985; **101**: 2070–2080.
- [33] WEINSTEIN R, PAULI B. Cell junctions and the biological behaviour of cancer. *Ciba Found Symp* 1987; **125**: 240–254.
- [34] WICHE G, KREPLER U, ARTLIEB R, DENK P. Occurrence and immunolocalization of plectin in tissue. *J Cell Biol* 1983; **97**: 887–901.

Otrzymano 05.09.1990 r.

Przyjęto 18.09.1990 r.

Adres autorek: 80-210 Gdańsk, ul. Dębinki 1

REGULACJA CYKLU MITOTYCZNEGO*

REGULATION OF THE MITOTIC CYCLE

Jerzy KAWIAK

Zakład Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

Streszczenie. Czynniki MPF (*Maturation-Promoting Factor*), odkryty w dojrzewających oocytach żaby, okazał się powszechnie występującym w komórkach kompleksem białkowym koniecznym do rozpoczęcia mitozy. Składnik MPF, białko p34^{cdc2} jest kinazą białkową, której aktywność reguluje rozpoczęcie mitozy. Innym składnikiem MPF jest kinaza białkowa nazywana cyklina. W komórkach drożdży aktywność kompleksu jest regulowana produktami genów *cdc25*⁺ (p67) i *wee 1*⁺. W artykule wspomniano też o udziale p34^{cdc2} w regulacji startu replikacji DNA podczas fazy G1 cyklu mitotycznego oraz reorganizacji cytoszkieletu podczas mitozy.

Summary. Maturation-promoting factor (MPF) described in maturing frog oocytes appeared to be a protein complex present in different cells and initiating mitosis. Component of MPF, p34^{cdc2} is the protein kinase regulating start to mitosis. Protein kinase cyclin is another component of MPF. In yeast cells activity of the complex is regulated by gene products of *cdc25*⁺ (p67) and *wee 1*⁺. The participation of p34^{cdc2} in the regulation of start to DNA replication in G1 phase of the cell cycle and in reorganization of cytoskeleton during mitosis is mentioned as well.

WSTĘP

W 1971 r. Masui i Markert [22] oraz niezależnie od nich Smith i Ecker [39] odkryli, że pewien chemiczny czynnik wywołuje mejozę oocytów żaby (u *Rana pipiens* i gat. *Xenopus*). Mejoza jest przejawem dojrzewania tych komórek. Czynniki ten pojawiał się w cytoplazmie oocytów, gdy wznawiały mejozę pod wpływem progesteronu. Nie udało się wprowadzić bliżej określić chemicznej natury tego czynnika, ale można było obserwować skutki jego działania w doświadczeniu, w którym mikropipetą wstrzykiwano nieco cytoplazmy pobranej z dojrzewającego oocytu do oocytu niepobudzonego do dojrzewania. Oocyt, który otrzymał "zastrzyk" cytoplazmy, zaczynał dojrzewać. Po ok. 4 godzinach jego otoczka jądrowa podlegała fragmentacji i pojawiały się chromosomy, które skracały się i grubiały

*Opracowano wykorzystując między innymi części artykułu: Pelech S. When cell divide. *The Sciences* July/August 1990; s. 23–28.

(proces ten nazywa się kondensacją chromosomów), jak zwykle na początku podziału komórki. Badacze nazwali wyżej opisany składnik cytoplazmy czynnikiem wywołującym dojrzewanie (ang. *Maturation-Promoting Factor* – MPF).

Jeżeli na oocyty podziela się progesteronem, to trzeba aż 8 godzin, by rozpoczęła się mejoza, czyli dwa razy dłuższego czasu niż po wstrzyknięciu MPF pochodzącego z oocytu w mejozie. Stąd wydaje się, że MPF jest bezpośrednio działającym, wywołującym mejozę czynnikiem, który jest aktywowany progesteronem. Wkrótce też przekonano się, że MPF żaby wywołuje również mitozę, a nie tylko mejozę. W często dzielących się komórkach zarodka żaby aktywność MPF była mierzona zdolnością pobranej z nich cytoplazmy do wywołania podziałów dojrzewania po wstrzyknięciu jej do oocytów. Aktywność MPF przy każdym podziale komórki gwałtownie rosła tuż przed mitozą, a potem obniżała się podczas pojawiania się komórek potomnych.

Podobną aktywność oscylacyjną obserwowano również w komórkach innych organizmów: drożdży, rozgwiazd, jeżowców i ssaków. Ponadto okazało się, że ten niezidentyfikowany czynnik działał bardzo podobnie w tych różnych organizmach. Na przykład MPF żaby wywoływał mejozę w oocytach rozgwiazdy, a ludzki MPF działał w komórkach żaby. Widocznie jest on występującą powszechnie w dzielących się komórkach substancją, która prawdopodobnie pojawiła się w ewolucji istot żywych bardzo wcześnie.

Jeszcze niedawno molekularne podstawy tych regulacji cyklu mitotycznego nie były znane. Opracowano jednak nowy sposób testowania aktywności MPF [21], bardziej wygodny i czuły, co umożliwiło oczyszczenie MPF zawartego w ekstraktach jaj żaby zawierających setki innych białek. Zamiast wstrzykiwania cytoplazmy badanej komórki do oocytu żaby i czekania na rozpoczęcie podziału, do badanego wyciągu dodawano izolowane jądra plemników bądź komórek wątroby i notowano rozpoczęcie rozpadu otoczki jądrowej. Tym sposobem w końcu ustalono, że aktywność MPF zależy od molekularnego kompleksu co najmniej dwóch białek. Aby odpowiedzieć na pytanie, jakie to są białka, przenieśmy się do dziedziny bardzo odległej od badań oocytów żaby, do badania genów kontrolujących podziały komórek drożdży, organizmu jednokomórkowego.

GENY REGULUJĄCE PODZIAŁY KOMÓREK DROŹDŹY

Oocyty były wygodne do badania biochemicznych podstaw cyklu komórkowego, a komórki drożdży okazały się znakomite do badania genów kontrolujących procesy biochemiczne. W prostym organizmie drożdży łatwo jest manipulować genami, a ponieważ cykl komórkowy trwa w komórce drożdży krótko, wyniki zmian genetycznych można stosunkowo szybko obserwować w kolejnych generacjach komórek. Komórki drożdży dzielą się przez pączkowanie; w zgrubiałym miejscu ściany komórkowej pojawia się wyniosłość, która rośnie i w końcu komórka potomna oddziela się od komórki macierzystej. Podział jądra jest prostszy niż u większości *Eucaryota*; nie jest to typowa mitozą, ale diploidalne komplety chromosomów po duplikacji zostają rozdzielone między komórki: macierzystą i potomną.

Wykorzystano szczepy drożdży, które przestają rosnąć po ogrzaniu do określonej temperatury. Te szczepy drożdży mają defektywne geny, których produkty białkowe funkcjonują normalnie w niższej temperaturze, temperaturze "permissywnej", ale nie działają w temperaturze podniesionej zaledwie o kilka stopni. U niektórych szczepów drożdży

podniesienie temperatury zatrzymuje wzrost w tym samym okresie cyklu komórkowego, niezależnie od tego, kiedy podczas cyklu podwyższono temperaturę. Zmieniony gen w określonym szczepie drożdży prawdopodobnie pełni określoną funkcję w cyklu. Wprowadzając fragmenty DNA z komórek prawidłowych do komórek mutantów i notując, który fragment znosi wrażliwość komórek na temperaturę, można było ustalić, jakie odcinki DNA zawierają określone geny.

Jednym z wielu genów kontrolujących podział komórki odkrytych tym sposobem u *Schizosaccharomyces pombe*, który zwrócił szczególną uwagę badaczy, jest gen oznaczony *cdc2* (*cell-division-control* = *cdc*) [2]. Jego odpowiednik u *Saccharomyces cerevisiae* oznaczono *CDC 28*. Okazało się, że gen *cdc 2* ma szczególne znaczenie w dwóch okresach cyklu komórkowego, niezależnie od chwili podniesienia temperatury. Jeżeli mutant wrażliwego na temperaturę ogrzeje się ponad temperaturę permissywną dość wcześnie w cyklu komórkowym, podczas fazy G1, to komórki drożdży nie mogą rozpocząć fazy syntezy DNA (fazy S); jeżeli drożdże były ogrzane później, w fazie G2, to cykl komórkowy zatrzymywał się tuż przed podziałem komórki.

Po wykryciu genu *cdc2* można było "narzędziami" biologii molekularnej określić sekwencję jego zasad, a tym samym odpowiadające temu sekwencje aminokwasów kodowanego białka. Fragmenty tego białka (peptydy) można było zsyntetyzować sztucznie i potem immunizować nimi zwierzę laboratoryjne celem uzyskania przeciwciał przeciw determinancie tego białka. Przeciwciała mogły teraz być użyte jako czuły odczynnik dla wykrywania poszukiwanego białka [1, 18]. Używając przeciwciał wiążących białko będące produktem genu *cdc2* wykryto, że występuje ono w komórkach wielu organizmów: mięczaków, żab i ludzi. Przekonano się, że to białko, podobnie jak MPF, jest substancją występującą powszechnie.

Przeciwnie niż MPF, produkt genu *cdc2* komórek drożdży jest białkiem o poznanej budowie, co pozwala określić jego funkcję podczas podziału komórki. Jest to kinaza białkowa serynowa. Kinazy białkowe są białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnałów w komórce; włączają bądź wyłączają funkcje białek przez ich fosforylowanie. Kinaza białkowa może działać na jedną bądź kilka substancji w komórce albo może aktywować inne kinazy białkowe. Tak więc produkt genu *cdc2* działa pośrednio albo bezpośrednio modulując aktywność innych białek.

KOMPLEKS BIAŁEK MPF

Pod koniec 1988 roku stwierdzono, że produkt białkowy genu *cdc2* jest jednym ze składników MPF [11, 13]. Okazało się, że przeciwciała skierowane przeciw produktowi genu *cdc2* drożdży wiążą się z jedną z podjednostek MPF oocytów żaby i rozgwieżdzy. Podjednostka ta jest białkiem o masie cząsteczkowej 34 000 oznaczanym jako $p34^{cdc2}$. W ten sposób wyniki genetycznych badań drożdży można było powiązać z wynikami badań MPF. Znalezione też ludzki homolog produktu genu *cdc2* [20].

Podczas gdy jedni badacze śledzili wzrost i spadek aktywności MPF w oocytach, drudzy zajmowali się innym sygnałem oscylującym w trakcie cyklu mitotycznego. W jajach jeźowców albo jajach małża rodzaju *Spisula* po zapłodnieniu i rozpoczęciu rozwoju pojawiała się białko, które potem znikało podczas podziału każdej komórki. Białko to gromadziło

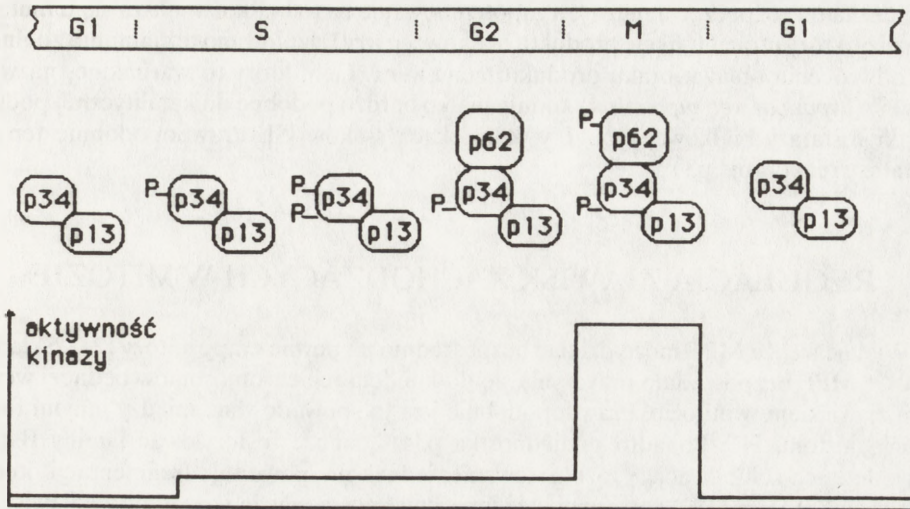
się stopniowo od początku cyklu mitotycznego i podczas mitozy, a potem nagle zniknęło przed zakończeniem podziału. Prekursor tego białka izolowany z jaj małża rodzaju *Spisula* wywoływał mejozę po wstrzyknięciu go do oocytów żaby.

Wkrótce odkryto drugi gen kontrolujący podziały komórek drożdży, nazwany *cdc 13* [4]. Podobnie jak mutanty *cdc2*, drożdże z wrażliwym na temperaturę genem *cdc13* odpowiadają na podwyższenie temperatury przerwaniem cyklu tuż przed mitozą. Jednak produkt tego genu nie działa sam, ale łącznie z produktem *cdc2*. Stwierdzono, że gdy wyciągi komórek sprawdza się przeciwciałami skierowanymi przeciw produktowi *cdc2*, to przeciwciała wiążą się nie tylko z produktem białkowym *cdc2*, ale też z wieloma innymi białkami, w tym również z produktem białkowym genu *cdc13*. Stąd przypuszczano, że prawdopodobnie produkt *cdc13* tworzy kompleks z produktem *cdc2*. Okazało się, że tak jest istotnie oraz że produkt *cdc2* jest kinazą białkową, która fosforyluje produkt *cdc13* w tym kompleksie u drożdży.

Zauważono podobieństwa wielkości i chemicznej budowy białka będącego produktem genu *cdc13* i cyklin znajdujących w komórkach innych organizmów [26, 30]. Cykliny są grupą białek o M_r 50–60 kDa. Zauważono, posługując się przeciwciałami, że cykliny podobnie jak produkt *cdc13* wiążą się z białkiem $p34^{cdc2}$ w kompleks. Widocznie cykliny i produkt białkowy genu *cdc13* są odpowiednikami. Cykliny, a dotyczy to białka drożdży i podobnych cząsteczek odkrytych w komórkach wielu innych organizmów, są drugą podjednostką MPF.

To sprostowanie, jak i inne dotyczące zachowania składników MPF w oczyszczonych wyciągach i w dzielących się komórkach, pozwoliło na bliższe określenie sposobu działania całego układu regulacji cyklu komórkowego [9]. Zaraz po podziale komórki poziom cyklin (białek p50–p60) jest niski, ale białka te są syntetyzowane stale. Gdy osiągną poziom krytyczny, łączą się z $p34^{cdc2}$ [38] i tworzą z nim kompleks (jedna cząsteczka cykliny i jedna $p34^{cdc2}$) [10, 19]. Białko $p34^{cdc2}$ ma już uprzednio dołączoną komponentę regulatorową, tj. białko p13 [7] kodowane przez gen *suc1⁺* [15], które prawdopodobnie ułatwia oddziaływanie kompleksu z innymi białkami. Wtedy $p34^{cdc2}$ jest aktywowane przez defosforylację jednej z jego tyrozyn [14, 25]. Aktywowane $p34^{cdc2}$ fosforyluje cyklinę. Ta i inne jeszcze przemiany biochemiczne doprowadzają do aktywacji całego kompleksu MPF, po czym rozpoczyna się mitoz. Funkcja cykliny jest potrzebna w fazie G2 do rozpoczęcia mitozy, ale bierze ona też udział w końcowym etapie fazy G1 rozpoczynającym replikację DNA [3,40,41], gdy działa kompleks $p34^{cdc2}$ z łańcuchem p13 (rys. 1).

W trakcie podziału, poziom MPF w cytoplazmie spada gwałtownie. Właściwie to poziom białka $p34^{cdc2}$ pozostaje stały, ale spada poziom cyklin. Komórka wyłącza aktywność MPF rozkładając cykliny [10]. Co by było, gdyby nie zostały zniszczone? Aby to sprawdzić, dodawano duże stężenia inhibitorów proteinaz do środowiska i stwierdzono wtedy zatrzymanie mejozy oocytów rozwiazdy i stabilizację cykliny. Zmieniono też gen cykliny w oocytach żaby rodzaju *Xenopus* na taki, który jest oporny na degradację [27]. Aktywność MPF w tych komórkach nie spadała, a rozpoczęty podział komórki był zatrzymany w metafazie mitozy. Tak więc rozpad cyklin jest konieczny dla normalnego przebiegu mitozy.



Rys. 1. Zmiany kompleksu białek MPF w cyklu mitotycznym i towarzyszące temu zmiany aktywności kinazy białkowej $p34^{cdc2}$. W fazie G1 $p34^{cdc2}$ pozostaje w kompleksie z p13. W fazie S $p34^{cdc2}$ jest fosforylowane, prawdopodobnie w kilku miejscach. W fazie G2, tuż przed mitozą dołącza do kompleksu p62 (cykliny). Następuje defosforylacja reszty tyrozyny w $p34^{cdc2}$, co aktywuje tę kinazę białkową, która wtedy fosforyluje cyklinę. Podczas podziału następuje degradacja cykliny, a po podziale rozpoczyna się faza G1 cyklu (wg [9], zmienione)

BIAŁKA REGULUJĄCE AKTYWNOŚĆ MPF

MPF można uznać za istotny składnik regulacji cyklu mitotycznego, ale nie jedyny. Wiele części tego mechanizmu jest słabiej poznanych. Na przykład u drożdży dla rozpoczęcia podziału komórki jest jeszcze konieczny czynnik kodowany przez gen $cdc25^+$ [36] będący aktywatorem $p34^{cdc2}$. Gen $cdc25^+$ koduje białko p67, a jego większa ekspresja powoduje wcześniejsze rozpoczęcie podziału wtedy, gdy komórki nie "dorosły" jeszcze do zwykłej wielkości. Mutacje, które upośledzają inny gen nazwany $wee1^+$, skracają cykl komórkowy tak, że podział następuje wcześniej i powstają poronne komórki potomne [35, 37]. Funkcją prawidłowego białka kodowanego genem $wee1^+$ jest opóźnienie podziału, aż komórka "dorośnie". Jest to więc funkcja przeciwna funkcji białka p67. Produkt jeszcze innego genu, kodowany genem nazwanym $nim1^+$, hamuje aktywność produktu genu $wee1$. Czas rozpoczęcia podziału komórki zależy więc od oddziaływania regulatorów dodatnich i ujemnych na kinazę $p34^{cdc2}$.

Z wyników dalszych badań można było wnioskować, że produkt genu $wee1$ jest również kinazą białkową przenoszącą grupę fosforanową na $p34^{cdc2}$, którego aktywność w ten sposób zostaje wyłączona do czasu, gdy komórka drożdży osiągnie określoną wielkość. Wtedy białko kodowane przez gen $nim1^+$ inaktywuje produkt białkowy $wee1$, prawdopodobnie znowu przez jego fosforylację. W ten sposób staje się możliwa reaktywacja $p34^{cdc2}$, co zachodzi przez jego defosforylację. Jak wspomniano, u drożdży produkt genu $cdc25^+$ (p67) i produkt genu $wee1^+$ oddziałują z $p34^{cdc2}$ biorąc udział w regulacji podziału komórki, pierwszy jako aktywator, a drugi – inhibitor. Normalnie aktywność p67 jest

konieczna do rozpoczęcia mitozy, a zapotrzebowanie na to białko zwiększa się u mutantu drożdży, który utracił funkcję produktu białkowego *wee1*. Izolowano też mutantu zdolnego do odwrócenia objawu braku produktu genu *wee1*. Gen, który to warunkuje, nazwany *bws1⁺* (*bypass of wee suppression*) koduje białko bardzo podobne do katalitycznej podjednostki fosfatazy białkowej typu 1 w komórkach ssaków [5]. Prawdopodobnie ten typ fosfatazy reaktykuje $p34^{cdc2}$.

REGULACJA ZJAWISK ZACHODZĄCYCH W MITOZIE

Wydaje się, że MPF może działać bezpośrednio na pewne etapy mitozy [24]. Składnik $p34^{cdc2}$ MPF bezpośrednio przyczynia się do kondensacji chromosomów będącej wczesnym zjawiskiem w mitozie. Prawdopodobnie jest to spowodowane między innymi fosforylacją histonu H1. Ponadto podjednostka $p34^{cdc2}$ może fosforylować laminy B oraz powoduje ich solubilizację i rozmontowanie; jednak nie powoduje fragmentacji otoczki jądrowej. Kinaza $p34^{cdc2}$ fosforyluje też inne substraty, co może wiązać się ze zjawiskami komórkowymi rozpoczynającymi mitozę (tab. 1). W regulacjach tych bierze również udział fosfataza fosfoprotein typu 1, na przykład podczas rozdzielania się chromosomów w trakcie mitozy [8, 28].

Tabela 1. Potencjalne substraty kinazy $p34^{cdc2}$ i związane z nimi zjawiska w komórce (wg [24], zmienione)

Substrat kinazy $p34^{cdc2}$	Miejsce ^x fosforylacji	Możliwa funkcja białka podczas mitozy
Lamina B	+	rozmontowanie lamin jądra komórki
Histon H1	+	kondensacja chromosomów
$pp60^{c-src}$	+	przekształcenie cytoszkieletu, wzrost aktywności kinazy tyrozynowej $pp60^{c-src}$
NO38, nukleolina	+	rozmontowanie struktury jąderka
Cyklina B	NW	regulacja aktywności $p34^{cdc2}$

^xTo samo miejsce w cząsteczce jest fosforylowane podczas mitozy *in vivo* co *in vitro*; NW – nie wiadomo.

Białko $p34^{cdc2}$ wykryto też w centrosomach [33]. Jest to tym ciekawsze, że u wczesnych zarodków muchy *Drosophila* można zahamować syntezę DNA i podział jądra bez zatrzymania replikacji centrosomu [31]. W tych warunkach centrosomy wpływają na reorganizację tubuliny, aktyny i pobliskiej błony komórkowej. Tak więc same centrosomy mogą kierować reorganizacją korowego cytoszkieletu komórki, niezależnie od zjawisk związanych ze zmianami zachodzącymi w jądrze i w chromosomach podczas mitozy i być może kieruje tym białko $p34^{cdc2}$ centrosomów.

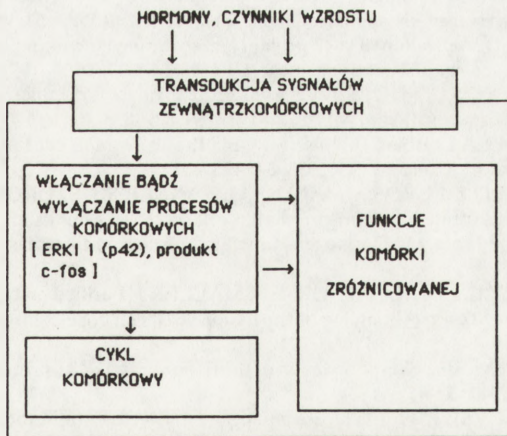
WŁĄCZANIE I WYŁĄCZANIE PROCESÓW KOMÓRKOWYCH

Warto zastanowić się, co wprawia cykl komórkowy w ruch? Co go przyspiesza lub zwalnia? Wiemy, że komórki wczesnego zarodka dzielą się często i nie wymagają zewnętrznego pobudzenia, podczas gdy komórki dojrzałe nie dzielą się bądź dzielą się z okreś-

loną częstością zależną od sygnałów z zewnątrz. Sygnały te nazywamy czynnikami wzrostu i mogą one powodować podziały komórek spoczynkowych albo częstsze podziały komórek dzielących się rzadko.

Jak taki sygnał dociera do MPF? Jak z kolei zostają włączone złożone zdarzenia mitozy: rozpad otoczki jądrowej, kondensacja chromosomów, wędrówka chromosomów do przeciwnych biegunów komórki? Nie wiemy obecnie, jak sygnał czynnika wzrostu jest przekazywany do mechanizmu regulującego cykl komórkowy, ale zdajemy sobie sprawę, że jest to bardziej złożone, niż opisane tutaj molekularne procesy. Pewne jest, że podstawowym elementem tych zjawisk są kaskady kinaz białkowych. Takie kaskady są przekazywanymi sygnału na dalszą odległość w komórce; między innymi powodują wzmocnienie sygnału czynnika wzrostu. Oscylator MPF jest otoczony złożoną siecią przeplatających się kaskad kinaz białkowych.

Przykładem tych złożonych zależności może być kinaza serynowo/treoninowa MAP 2 (kinaza fosforylująca białko 2 związane z mikrotubulami) fosforylowana na tyrozynie *in vivo* pod wpływem insuliny [32]. Została ona opisana też jako białko ERKI 1 (*extracellular signal-regulated kinase 1*; fosfoproteina pp42) [6]. Kinaza ta może być regulatorem kaskad kinaz białkowych zależnych od insuliny i bezpośrednim substratem dla kinazy tyrozynowej receptora insuliny. Jest interesujące, że aktywność kinazy MAP 2 gwałtownie rośnie nie tylko pod wpływem insuliny, ale również sygnałów zewnątrzkomórkowych wywołujących proliferację bądź różnicowanie komórek. Aktywność ta i zawartość fosfotyrozyny w pp42 rosną pod wpływem naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), czynnika wzrostu pochodzącego z płytek (PDGF), czynnika wzrostu fibroblastów (FGF) i estrów forboli [16, 34]. Aktywność kinazy MAP 2 rośnie również w postmitotycznych komórkach chromafinowych nadnerczy w odpowiedzi na sygnały powodujące sekrecję katecholamin [12] oraz w komórkach PC 12 różnicujących się w odpowiedzi na czynnik wzrostu neuronów [23]. Przypuszczalnie kinaza MAP 2 w różnych komórkach bierze udział w przekazywaniu sygnałów do różnych przedziałów czynnościowych komórki (rys. 2).



Rys. 2. Przedziały funkcjonalne w komórce o określonym stopniu zróżnicowania; przedziały transdukcji sygnałów, włączenia bądź wyłączenia (zahamowania) procesów komórkowych: cyklu komórkowego i/albo funkcji komórki zróżnicowanej

Wśród białek oddziałujących z komórkowym regulatorem cyklu mitotycznego są produkty genów, które w zmutowanej formie występują w komórce nowotworowej. Niektóre z nich przypominają czynniki wzrostu albo ich receptor, będący kinazą białkową. Zmutowane geny czynnika wzrostu mogą mieć niezwykle wysoką ekspresję, stymulując nadmierne podziały sąsiednich komórek bądź własne podziały. Podobnie, receptor będący produktem zmutowanego genu może być na stałe włączony, aktywując tym sposobem kaskadę kinaz nawet, gdy nie działa czynnik wzrostu. Takie białka często są kinazami białkowymi tyrozynowymi [17]. Jednak zarówno czynniki wzrostu, jak i ich receptory znajdują się z dala od cząsteczek bezpośrednio zaangażowanych w przebiegu cyklu mitotycznego. Szukanie powiązań tych dwóch układów [6, 29, 41] jest najbliższym zadaniem biologów. Wiele już uczyniono, aby powiązania te bliżej określić, ale daleko jeszcze do ich pełnego poznania.

LITERATURA

- [1] ARION D, MEIJER L, BRIZUELA L, BEACH D. *cdc2* Is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 1988; **55**: 371–378.
- [2] BEACH D, NURSE P. Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 1982; **300**: 706–709.
- [3] BOOHER R, BEACH D. Interaction between *cdc13*⁺ and *cdc2*⁺ in the control of mitosis in fission yeast: dissociation of the G1 and G2 roles of *cdc2*⁺ protein kinase. *EMBO J* 1987; **6**: 3441–3447.
- [4] BOOHER R, BEACH D. Involvement of *cdc13*⁺ in mitotic control in *Schizosaccharomyces pombe*: possible interaction of the gene product with microtubules. *EMBO J* 1988; **7**: 2321–2327.
- [5] BOOHER R, BEACH D. Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bws1*⁺ in fission yeast mitotic control. *Cell* 1989; **57**: 1009–1016.
- [6] BOULTON TG, YANCOPOULOS GD, GREGORY JS, SLAUGHTER C, MOOMAW C, HSU J, COBB MH. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 1990; **249**: 64–67.
- [7] BRIZUELA L, BEACH D. *p13^{suc1}* acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the *p34^{cdc2}* protein kinase. *EMBO J* 1987; **6**: 3507–3514.
- [8] DOONAN JH, MORRIS NR. The *bimG* gene of *Aspergillus nidulans*, required for completion of anaphase, encodes a homolog of mammalian phosphoprotein phosphatase 1. *Cell* 1989; **57**: 987–996.
- [9] DRAETTA G, BEACH D. Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell-cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. *Cell* 1988; **54**: 17–26.
- [10] DRAETTA G, LUCA F, WESTENDORF J et al. *cdc2* Protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989; **56**: 829–838.
- [11] DUNPHY WG, BRIZUELA L, BEACH D, NEWPORT J. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 1988; **54**: 423–431.
- [12] ELY CM, ODDIE KM, LITZ JS, ROSSOMANDO AJ, KANNER SB, STURGILL TW, PERSONS SJ. A 42-kD tyrosine kinase substrate linked to chromaffin cell secretion exhibits an associated MAP kinase activity and is highly related to a 42 kD mitogen-stimulated protein in fibroblasts. *J Cell Biol* 1990; **110**: 731–742.
- [13] GAUTIER J, NORBURY C, LOHKA M, NURSE P, MALLER J. Purified maturation-promoting factor contains the product of the *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*⁺. *Cell* 1988; **54**: 433–439.
- [14] GOULD KL, NURSE P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2*⁺ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* 1989; **342**: 39–45.
- [15] HAYLES J, AVES S, NURSE P. *suc1* Is an essential gene involved in both the cell cycle and growth in fission yeast. *EMBO J* 1986; **5**: 3373–3379.
- [16] HOSHI M, NISHIDA E, SAKAI H. Activation of a Ca^{2+} -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1988; **263**: 5396–5401.

- [17] HUNTER T, COOPER JA. Viral oncogenes and tyrosine phosphorylation. [w] The Enzymes, Boyer PD, Krebs EG (red.), Acad Press Inc, New York, London, Tokyo, Toronto 1986; 17 p.A: 191-246.
- [18] LABBE JC, LEE MG, NURSE P, PICARD A, DOREE M. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2*⁺. *Nature* 1988; **335**: 251-254.
- [19] LABBE JC, PICARD A, PEAUCELLIER G et al. Purification of MPF from starfish: Identification as the H1 histone kinase p34^{cdc2} and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* 1989; **57**: 253-263.
- [20] LEE MG, NURSE P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control *cdc2*. *Nature* 1987; **327**: 31-35.
- [21] LOHKA MJ, MALLER JL. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation and spindle formation in cell-free extracts. *J Cell Biol* 1985; **101**: 518-523.
- [22] MASUI Y, MARKERT C. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 1971; **177**: 129-145.
- [23] MIYASAKA T, CHAO MV, SHERLINE P, SALTIEL AR. Nerve growth factor stimulates a protein kinase in PC-12 cells that phosphorylates microtubule-associated protein-2. *J Biol Chem* 1990; **265**: 4730-4735.
- [24] MORENO S, NURSE P. Substrates for p34^{cdc2}: in vivo veritas? *Cell* 1990; **61**: 549-551.
- [25] MORLA AO, DRAETTA G, BEACH D, WANG JY. Reversible tyrosine phosphorylation of *cdc2*: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell* 1989; **58**: 193-203.
- [26] MURRAY AM, KIRSCHNER MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; **339**: 275-280.
- [27] MURRAY AM, SOLOMON MJ, KIRSCHNER MW. The role of cyclin and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 1989; **339**: 280-286.
- [28] OHKURA H, KINOSHITA N, MIYATANI S et al. The fission yeast *dis2*⁺ gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases. *Cell* 1989; **57**: 997-1007.
- [29] OHNO H, TAKIMOTO G, McKEITHAN TW. The candidate pro-oncogene *bcl-3* is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 1990; **60**: 991-997.
- [30] PINES J, HUNTER T. Isolation of a human cyclin cDNA: Evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34^{cdc2}. *Cell* 1989; **58**: 833-846.
- [31] RAFF JW, GLOVER DM. Centrosomes, and not nuclei, initiate pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 1989; **57**: 611-619.
- [32] RAY BL, STURGILL TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3753-3757.
- [33] RIABOWOL K, DRAETTA G, BRIZUELA L, VANDRE D, BEACH D. The *cdc2* kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell* 1989; **57**: 393-401.
- [34] ROSSOMANDO AJ, PAYNE DM, WEBER MJ, STURGILL TW. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 6940-6943.
- [35] RUSSEL P, MORENO S, REED SI. Conservation of mitotic controls in fission and budding yeasts. *Cell* 1989; **57**: 295-303.
- [36] RUSSEL P, NURSE P. *cdc25*⁺ Functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* 1986; **45**: 145-153.
- [37] RUSSEL P, NURSE P. Negative regulation of mitosis by *wee1*⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* 1987; **49**: 559-567.
- [38] SIMANIS V, NURSE P. The cell cycle control gene *cdc2*⁺ of fission yeast encodes a protein kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* 1986; **45**: 261-268.
- [39] SMITH LD, ECKER RE. The interaction of steroids with *Rana pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* 1971; **25**: 232-247.
- [40] D'URSO G, MARRACCINO RL, MARSHAK DR, ROBERTS JM. Cell cycle control of DNA replication by a homologue from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science* 1990; **250**: 786-791.
- [41] FURUKAWA Y, PIWNICA-WORMS H, ERNST TJ, KANAKURA Y, GRIFFIN JD. *cdc2* Gene expression at the G₁ to S transition in human T lymphocytes. *Science* 1990; **250**: 805-808.

Otrzymano: 10 września 1990 r.

Przyjęto: 26 października 1990 r.

Adres autora: ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

BUDOWA I FUNKCJA MEZOTELIUM SSAKÓW

STRUCTURE AND FUNCTION OF MAMMALS MESOTHELIUM

Krystyna CZYŻEWSKA

Katedra i Zakład Patofizjologii Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Streszczenie. Mezotelium stanowi strukturę wywodzącą się z mezodermy. Charakteryzuje się heterogennością topograficzną w odniesieniu do kształtu komórek, mikrokosmków i pęcherzyków pinocytarnych. Podczas dializy i zapalenia otrzewnej komórki mezotelialne ulegają zmianom. Polegają one na pogrubieniu i zaniku mikrokosmków, obkurczeniu komórek i poszerzeniu przestrzeni międzykomórkowych, hiperplazji struktur cytoplazmatycznych, wakuolizacji, a w końcu obumieraniu. Wskazuje się na trzy funkcje mezotelium: ochronną, syntetyzująco-sekrecyjną oraz transportową. Funkcja ochronna polega na zmniejszaniu tarcia między narządami, zabezpieczeniu przed wnikaniem i szerzeniem się infekcji, rozplemem komórek, a także powstawaniem fibrynogeny. Funkcja syntetyzująco-sekrecyjna odnosi się do fosfolipidów, eikozanoidów, inhibitora fibrynolizy, proteoglikanów, kolagenu, elastyny i czynników wzrostu oraz enzymów związanych z metabolizmem białek, puryn i hormonów. Funkcja transportowa obejmuje selektywną regulację wydalania i absorpcji cząsteczek pomiędzy krążeniem i jamami ciała podczas procesu dializy otrzewnowej i dootrzewnowej farmakoterapii.

Summary. Embriologically mesothelium is derived from mesoderm. The cells characterize of topographic heterogeneity in relation to the shape, microvilli and vesicles. Definite ultrastructural changes in the mesothelium occur after exposure to dialysis fluid and peritonitis. There are: a reduction and subsequent disappearance of microvilli, separation of the cells accompanied by widening of the cellular junctions, hyperplasia of the cytoplasmatic organelles, hypervacuolarization and cellular necrosis. The mesothelium performs three function: protective, synthetic-secretory and transport. The first one is to provide a frictionless, the protection of infection, cells invasion, fibrous formations and adhesions. Synthetic and secretion function ranges from phospholipids, eicosanoids, elastin, collagen, proteoglycans, fibrynolysis inhibitor, growth factors to enzymes connected with proteins, purines and hormones metabolism. Transport function comprises selective regulation of the molecules excretion and absorption between circulation and body cavities during peritoneal dialysis and intraperitoneal pharmacotherapy.

WPROWADZENIE

Komórki mezotelialne stanowią zewnętrzną warstwę błony otrzewnowej, która wyściela jamy ciała (opłucnową, osierdziową i otrzewnową), a także pokrywa narządy wewnętrzne

(płuca, serce, jajniki i trzewia). Ogólnie przyjmuje się, iż otrzewna tworzy nieadhezyjną powierzchnię dla narządów wewnętrznych, a także stanowi selektywną barierę regulującą transport wody i rozpuszczonych w niej jonów i cząsteczek [7, 55, 58, 92, 98]. Postęp w technice dializy otrzewnowej i powszechność stosowania tego zabiegu, głównie u chorych z zaawansowaną niewydolnością nerek przyczyniły się do lepszego zrozumienia funkcji mezotelium [44, 77]. Początkowo sądzono, że decydujące znaczenie dla efektywnej dializy ma układ kapilar. Ostatnio zainteresowano się mezotelium. Zwraca się uwagę na funkcję mezotelium w warunkach patologicznych (np. podczas dializy otrzewnowej, dootrzewnowej farmakoterapii, 20), a także fizjologicznych, związanych np. z możliwościami sekrecyjnymi tego nabłonka [27, 30, 31, 35]. Sugeruje się nawet, iż mezotelium *in vitro* może być wykorzystane jako model badawczy procesów transportowych zachodzących w złożonych układach błonowych [6, 16–19, 40]. Mezotelium w hodowli *in vitro* służy ponadto do analizy inwazji i regulacji wzrostu komórek nowotworowych, toksyczności niektórych związków chemicznych, procesów regeneracyjnych, metabolizmu prostaglandyn oraz tkanki łącznej [1, 5, 11, 29, 50, 51, 67, 95]. Biorąc powyższe pod uwagę podjęto próbę przeglądu dotąd opublikowanych wyników w zakresie struktury i funkcji mezotelium głównie u ssaków.

TOPOGRAFICZNE ZRÓŻNICOWANIE STRUKTURY MEZOTELIUM W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

Przyjmuje się, iż mezotelium wywodzi się z mezodermy [13, 35, 69, 98]. Jego budowa ultrastrukturalna w przypadku ssaków była przedmiotem wielu opracowań. W skrócie przedstawia się ona następująco. Mezotelium *in vivo* wygląda najczęściej jak pojedyncza warstwa wydłużonych (do 40 μm), wielokątnych, dachówkowato na siebie zachodzących komórek [33, 38, 39, 46]. Grubość ich wynosi 2,5–3,0 μm [82]. Granice między nimi są kręte i występują trzy typy połączeń międzykomórkowych. Połączenia typu ścisłego (*tight junction*) zlokalizowane są w części apikalnej. Poniżej, znajdują się dobrze rozwinięte desmosomy, a także w niektórych przypadkach *zonula adherens* [33, 58, 81, 82]. Część luminalna mezotelium pokryta jest mikrokosmkami. Na powierzchni niektórych komórek stwierdzono obecność receptorów dla hormonów (estrogenów i progesteronu) [52, 79], a także czynników wzrostu (TGF i PDGF) [41, 42]. Zarówno połączenia międzykomórkowe, jak i część luminalna charakteryzują się występowaniem ładunków elektrycznych [48, 59]. Cytoszkielek komórek jest dobrze rozwinięty. Stwierdzono obecność wimentyny i aktyny, prostych nabłonkowych keratyn oraz cytokeratyn [13, 29, 82, 90]. W centralnej części komórek mezotelialnych znajduje się owalne lub nerkowate jądro oraz wydatte jąderka [33, 35]. Widoczny też jest dobrze rozwinięty aparat Golgiego, mitochondria oraz dużo wolnych rybosomów. W cytoplazmie, zarówno wzdłuż wewnętrznej, jak i zewnętrznej granicy komórek oraz w strefach połączeń międzykomórkowych i mikrokosmkach, stwierdza się obecność gładkich i opłaszczonych pęcherzyków mikropinocytarnych [46, 51, 82]. Otoczone są one cienką, jednowarstwową błoną. Kształt ich jest okrągły lub podłużny. Występują pojedynczo lub układają się w grona, a część z nich łączy się w kanały śródkomórkowe [35, 46]. Mezotelium leży na ciągłej, pojedynczej, homogennej błonie podstawnej, w której stwierdza się obecność ładunków elektrycznych [45, 46].

Analiza danych dotyczących struktury mezotelium w okresie postembrionalnym wskazuje przede wszystkim na istnienie heterogenności określanej jako topograficzna. Stwierdzono bowiem wiele odrębności w budowie mezotelium pokrywającym różne narządy wewnętrzne oraz wyściełającym różne jamy ciała, a także pochodzącym z płynu otrzewnowego (tzw. komórki "wolne"). Odrębności te dotyczą kształtu i ilości komórek na jednostkę powierzchni, mikrokosmków, a także pęcherzyków pinocytarnych.

KSZTAŁT KOMÓREK MEZOTELIALNYCH

Topograficzne zróżnicowanie kształtu wyraża się istnieniem trzech typów komórek. Pierwszym, występującym najczęściej jest typ komórek płaskich. Pokrywają one większość narządów wewnętrznych, a także wyściełają jamy ciała [98]. Drugi typ stanowią komórki o kształcie cylindrycznym (kolumnowym). Zlokalizowane są one przede wszystkim w ujściach naczyń limfatycznych przepony, śródpiersia i sieci [33, 45]. Pokrywają ponadto jajniki [66]. Do trzeciego typu można zaliczyć okrągłe lub owalne komórki mezotelialne z płynu z jamy otrzewnowej [47, 91].

Zaobserwowano, iż komórki płaskie mają owalne jądro, z rozproszoną chromatyną i słabo zaznaczone jąderko. Ilość tych komórek przypadająca na jednostkę powierzchni jest większa w przypadku krezki niż otrzewnej ściennej [98], przy czym otrzewna ściana człowieka charakteryzuje się stałą liczbą tych komórek [23].

Z kolei komórki cylindryczne w porównaniu z płaskimi charakteryzują się lepiej rozwiniętymi: siateczką endoplazmatyczną i aparatem Golgiego, większym jądrem i bardziej wydatnym jąderkiem. Cechy te wskazują na większą aktywność metaboliczną komórek cylindrycznych. Przyjmuje się, iż funkcja komórek płaskich związana jest z błonowym transportem. Ze względu na to, iż mają one znaczny biosyntetyczny potencjał mogą w specyficznych warunkach stać się metabolicznie aktywne [98].

Ilość komórek owalnych (okrągłych) w płynie otrzewnowym wykazuje zróżnicowanie międzygatunkowe, a także uzależniona jest od wieku i płci dawcy. Zjawisko to może być związane ze stopniem nasilenia procesów regeneracyjnych. Komórki z płynu otrzewnowego mogą zmieniać kształt. Po umieszczeniu np. w hodowli in vitro stają się one wydłużone [98]. W przypadku niektórych gatunków przyjmują wygląd "kocich łbów" [53].

Można przypuścić, iż zróżnicowanie kształtu komórek mezotelialnych zależy od struktury szkieletu wewnątrzkomórkowego [90]. Zaobserwowano np. związane ze stadium wzrostu zmiany ilościowe cytoszkieletu. Przedstawiły się one następująco: prawidłowe komórki mezotelialne in vivo charakteryzowały się znaczną zawartością keratyn oraz stosunkowo mniejszą wimentyny [13, 15, 29]. In vitro natomiast, w szybko dzielących się komórkach, dochodziło do obniżenia ilości keratyn, a wzrostu wimentyny. W mezotelium wolno dzielącym się sytuacja jest odwrotna. Komórki mezotelialne in vitro mają więc, związaną ze stadium ich wzrostu, zdolność modulowania składu i w rezultacie formy szkieletu wewnątrzkomórkowego. Nie wykluczone jest, iż podobne zmiany zachodzą in vivo podczas procesu regeneracji, czy też hiperplazji [5]. Struktura szkieletu wewnątrzkomórkowego wykazuje ponadto zróżnicowanie międzygatunkowe. Wskazują na to porównawcze, immunocytochemiczne analizy in vitro mezotelium królika, szczura i człowieka. Stwierdzono różnice ilościowe antygenów keratyny, cytokeratyn (klony 8.12 i 4.62), wimentyny (13.2) oraz fibronektyny. Występowały ponadto różnice jakościowe. Antygen cytoke-

ratyny klonu 8.13 był np. obecny jedynie w przypadku komórek mezotelialnych szczura [51].

MIKROKOSMKI

Na wstępie należy zaznaczyć, iż nazywane mikrokosmkami wypustki cytoplazmatyczne komórek mezotelialnych ssaków różnią się strukturalnie i funkcjonalnie od mikrokosmków np. nabłonka jelita cienkiego [73]. W przypadku tego ostatniego są to zróżnicowane, lecz stabilne struktury. W przypadku mezotelium natomiast, podobnie jak w komórkach tkanki łącznej i układu siateczkowo-śródbłonkowego, są one labilne i dynamiczne. Struktura ich zmienia się bowiem pod wpływem cAMP, insuliny, uzależniona jest od fazy cyklu komórkowego oraz gęstości komórek w hodowli. O ile więc funkcja pierwszych, stabilnych polega na zwiększaniu powierzchni transportu, to funkcja mikrokosmków mezotelialnych jest złożona. Mogą one zarówno zwiększać powierzchnię wymiany, jak pełnić funkcję ochronną, a także oddziaływać na wzrost komórek np. poprzez regulowanie struktury cytoskieletu [63].

Zróżnicowanie topograficzne mikrokosmków ma zarówno ilościowy, jak i jakościowy charakter. Przyczyny tego zróżnicowania są złożone. Wiązą się zarówno z ochronną, jak i transportową funkcją mezotelium. Mogą też być efektem specyficznej narządowo adaptacji, jak też różnego stopnia dojrzałości mezotelium. Ostatnio przyjmuje się, iż zróżnicowanie topograficzne mikrokosmków wiązać należy przede wszystkim z ochronną funkcją mezotelium [2, 35, 47]. Ilość i kształt tych struktur są bowiem uzależnione od stopnia aktywności ruchowej narządu w jamie ciała. Takie zależności wystąpiły w przypadku mezotelium pokrywającego różne narządy szczura [2]. Wyodrębniono tam trzy grupy komórek mezotelialnych. Pierwszą, najuboższą w mikrokosmki, było mezotelium pokrywające nerki, pęcherz moczowy i ścianę brzucha (200–250 mikrokosmków/10 μm^2). Drugą grupę stanowiły komórki pokrywające wątrobę, jelito i żołądek (350–380). Trzecie z kolei, najbogatsze w mikrokosmki, było mezotelium pokrywające śledzionę, płuca i przeponę (450–600). Związane z funkcją ochronną, zróżnicowanie ilościowe mikrokosmków wykazały także badania porównawcze mezotelium ryb oraz ssaków. W przypadku tych pierwszych mezotelium całkowicie jest pozbawione omawianych struktur. Jednocześnie wiadomo, iż w związku z wodnym środowiskiem życia (sposobem oddychania), tarcie pomiędzy narządami ryb jest znacznie mniejsze niż u ssaków [35].

Zróżnicowanie ilościowe i jakościowe mikrokosmków może być także związane z funkcją transportową mezotelium. Polegałaby ona na zwiększaniu powierzchni wymiany cząsteczek przez komórki mezotelialne. Przemawia za tym obecność, w omawianych strukturach, pęcherzyków mikropinocytarnych [46]. Ponadto na powierzchni mezotelium krezki stwierdzono większą ilość mikrokosmków niż na powierzchni otrzewnej ściennej. Jednocześnie, stopień nasilenia procesów transportowych był wyższy w przypadku pierwszej z wymienionych struktur [46].

Heterogenność topograficzna mikrokosmków może być ponadto efektem specyficznej narządowo adaptacji funkcjonalnej. Przykładem jest mezotelium pokrywające jajniki ssaków [66]. Charakteryzowało się ono obecnością brodawek oraz dużą liczbą mikrokosmków (ok. 150/10 μm^2). Czasami pojawiały się tam dobrze rozwinięte, pojedyncze lub zgrupowane w kępki rzęski. Specyfiką tej struktury jest występowanie tzw. kosmatych wyrostków (*villous processes*). Gęstość oraz ich długość były uzależnione od wielkości jajników:

im większy narząd, tym uboższe wymienione struktury i odwrotnie [66]. Kosmate wyrostki nie występowały na powierzchni komórek mezotelialnych pokrywających inne narządy. Czasami pojawiały się w przypadku śledziony. Z powyższego wynika, iż charakterystyczne dla danego narządu czynniki lokalne mogą modulować morfologię powierzchniowych warstw komórek mezotelialnych. Podobnie wprowadzone np. do jamy otrzewnowej związki egzogenne wywołują zmiany ilości mikrokosmków. Zmiany takie wystąpiły po dootrzewnowym podaniu surowicy. Były one uzależnione od czasu jej działania. Po 2 minutach od wprowadzenia wystąpił trzykrotny wzrost ilości mikrokosmków, a po 30 minutach był on siedmiokrotny i utrzymywał się do 90 minuty, po czym ilość mikrokosmków się obniżyła [63].

Zróżnicowanie mikrokosmków może być w końcu związane ze stopniem dojrzałości mezotelium. Podczas rozwoju embrionalnego ich ilość bowiem wzrasta wraz z różnicowaniem się komórek [98]. Z kolei w rozwoju postembrionalnym pojedyncze komórki mezotelialne, nawet w obrębie jednego narządu (jamy ciała), wykazują różnice jakościowe w budowie mikrokosmków [82]. Liczba ich także jest zróżnicowana i zmienna. Występują miejsca o dużym zagęszczeniu mikrokosmków oraz obszary zupełnie ich pozbawione [46]. W przypadku komórek pokrywających narządy wewnętrzne i wyścielających jamy ciała obecność mikrokosmków ogranicza się do powierzchni luminalnej. W przypadku komórek okrągłych, pochodzących z płynu otrzewnowego, występują one na całej powierzchni [91]. Wydaje się więc, iż zróżnicowanie ilościowe i jakościowe mikrokosmków należy wiązać przede wszystkim z funkcjonalną adaptacją komórek mezotelialnych, w mniejszym zaś stopniu ze statyczną heterogennością topograficzną tej struktury.

PĘCHERZYKI PINOCYTARNE

Obecność pęcherzyków pinocytarnych stwierdzono w cytoplazmie zarówno w apikalnej, jak też podstawnej części komórek mezotelialnych. Kształt ich i wielkość nawet w obrębie pojedynczej komórki może być zróżnicowany. Większe pęcherzyki wypełnione są lipidami [51]. Struktury te mogą być okrągłe (średnica 150–400 nm) lub podłużne. Występują pojedynczo lub układają się w grona, a część ich łączy się w kanały śródkomórkowe [46, 63]. Niektóre z tych pęcherzyków otwierają się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [51]. Obecność ich wiąże się z zachodzącymi w mezotelium procesami endo- oraz egzocytozy. Endocytoza (pinocytoza) została stwierdzona w przypadku transportu makromolekuł [7, 46]. Egzocytoza z kolei może być związana m.in. z sekrecją pełniących funkcję ochronną fosfolipidów [34, 37]. Liczba pęcherzyków pinocytarnych uzależniona jest od lokalizacji topograficznej mezotelium. Zwykle przyjmuje się, iż w przypadku mezotelium otrzewnej ściennej jest znacznie mniej omawianych struktur w porównaniu z otrzewną krezki [9, 46]. Czasami stwierdza się ponadto miejsca w ogóle ich pozbawione (np. mezotelium pokrywające żołądek prosiaka) [73]. Zakłada się, iż zróżnicowanie to jest wynikiem odmienności procesów transportowych w różnych odcinkach otrzewnej [9, 55]. Odmienności te dotyczą w tym przypadku przezkomórkowej drogi transportu makrocząsteczek. Można więc przyjąć, iż w przypadku mezotelium otrzewnej ściennej transport pinocytarny ma miejsce nasilenie, niż w przypadku mezotelium krezki. Należy jednak dodać, iż ostatnie badania morfologiczne mezotelium otrzewnej ściennej zarówno człowieka [23], jak i zwierzęcej [51] wykazały znaczną (nie mniejszą niż w przypadku krezki) liczbę pęcherzyków pinocytarnych. Ponadto ilość podobnych struktur (dołączków) w obrębie mezotelium może ulec

znacznemu zwiększeniu np. poprzez stymulację dootrzewnowo podaną surowicą. Jak już wspomniano, analogiczne zmiany obserwowano w przypadku mikrokosmków [63].

STRUKTURA MEZOTELIUM W STANACH PATOLOGII

Analizy struktury mezotelium w stanach patologii dotyczyły głównie osób dializowanych otrzewnowo wskutek zaawansowanej niewydolności nerek oraz chorych z zapaleniem otrzewnej.

MEZOTELIUM PODCZAS DIALIZY OTRZEWNOWEJ

Badania porównawcze nie wykazały istotnych różnic jakościowych pomiędzy mezotelium pochodzącym od osób zdrowych oraz chorych na mocznicę, którzy wcześniej w ogóle nie byli poddawani zabiegom dializy otrzewnowej [33, 97]. U człowieka analiza mezotelium uzyskanego w drodze biopsji otrzewnej ściennej wykazała, iż samo wprowadzenie płynu dializacyjnego do jamy otrzewnowej wywołuje wiele zmian nasilających się wraz z upływem czasu. Zmiany te pojawiają się po kilku dniach od momentu podjęcia zabiegu dializy otrzewnowej i związane są przede wszystkim z wywołaną glukozą hipertonią płynu dializacyjnego [23, 40, 94]. Zaczynają się od uszkodzenia błony komórkowej polegającego na powolnym pogrubieniu, redukcji mikrokosmków, aż do stopniowego ich zaniku. Zmniejszenie liczby mikrokosmków nie zmieniało jednakże funkcji transportowych otrzewnej, mierzonych wielkością klirensów otrzewnowych związków drobnocząsteczkowych [23]. Obserwuje się ponadto obkurczanie komórek mezotelialnych oraz wzrost gęstości cytoplazmy [33]. Zmniejszenie objętości komórek wywołuje ich separację i brak kontaktu między nimi [23]. Nasilenie opisanego procesu prowadzić może do obniżenia ultrafiltracji, obserwowanego u niektórych osób dializowanych otrzewnowo. U osób poddawanych zabiegowi przez dłuższy czas (np. ciągłej ambulatoryjnej dializie otrzewnowej – CAPD), w części podstawnej cytoplazmy komórek mezotelialnych pojawiają się duże wakuole. Wywołują one oddzielenie się tych komórek od błony podstawnej. Obserwowano ponadto poszerzenie połączeń międzykomórkowych. Pęcherzyki pinocytarne powiększają się, ale ich liczba ulega zmniejszeniu [23].

Stosowana długookresowo dializa otrzewnowa zmienia także metabolizm komórek, czego wyrazem jest hiperplazja ich struktur cytoplazmatycznych [24, 29]. Zabieg ten stymuluje bowiem mezotelium do produkcji związków (fosfolipidów) niezbędnych do zachowania homeostazy otrzewnej, które w tym przypadku są ciągle usuwane wraz z płynem dializacyjnym [23, 26]. W rezultacie następuje kompensacyjne wzmoczenie ich produkcji [27]. Ze względu na to, podczas przewlekłej dializy otrzewnowej, obserwuje się rozwój szorstkiego retikulum endoplazmatycznego, jak też rozrost organelli wewnątrzkomórkowych [33]. Wewnątrz komórek mezotelialnych, uzyskanych podczas biopsji otrzewnej chorych dializowanych (CAPD), obserwowano ponadto ciała obce natury nieorganicznej różnych rozmiarów (od 2 do 50 μm). Obecność ich stwierdzano także we wszystkich częściach komórek, a także w submezotelialnej tkance łącznej. Pochodziły one prawdopodobnie z płynu dializacyjnego [23].

Przyjmuje się, iż omawiany zabieg wywołuje też zmiany w strukturach submezotelialnych. Obserwowano np. zwielokrotnienie błony podstawnej mezotelium, a także wzrost ilości włókien kolagenowych oraz aktywnych fibroblastów w tkance śródmiąższowej [24, 33]. Stwierdza się także dość często niewielki obrzęk tkanek submezotelialnych. Nie wykluczone jest jednak, iż zmiany te związane są ze stanem zapalnym błony otrzewnowej. U osób, u których podczas długookresowej dializy nie występowało zapalenie otrzewnej, tkanka łączna była niezmienniona [23].

W płynie dializacyjnym chorych wielokrotnie dializowanych otrzewnowo stwierdzono stopniowy wzrost liczby, a także obecność nietypowych komórek mezotelialnych [12]. Może to być związane z mutagennym działaniem płynu dializacyjnego podczas przewlekłej dializy otrzewnowej [51]. Nie należy też wykluczyć, iż zmiany te są wynikiem wzmożonej aktywności proliferacyjnej. Dializa otrzewnowa indukuje bowiem ciągłe uszkodzanie i stały proces regeneracji mezotelium [47]. W warunkach fizjologicznych wykazuje ono niską aktywność proliferacyjną. W ciągu dnia jedynie 1–3% ogólnej liczby komórek ulega podziałowi. Uszkodzenie mezotelium wywołuje wzrost liczby podziałów do 19% tak, iż regeneruje się ono w ciągu 7–10 dni [46, 47, 98]. W niektórych przypadkach np. eksperymentalnie wywołanej mocznicy, proliferacja naprawcza może być jednak zahamowana [47].

MEZOTELIUM W STANACH ZAPALENIA OTRZEWNEJ

Jak już wspomniano, zmiany strukturalne mezotelium, obserwowane w trakcie wykonywania dializ otrzewnowych w dużym stopniu są efektem osmotycznego działania płynu dializacyjnego. Równocześnie jednak zmiany te mogą być bardziej związane z liczbą epizodów zapaleń otrzewnej niż długością stosowania zabiegu. Zapalenie otrzewnej, jak wiadomo, stanowi przysłowiową piętę Achillesa ciągłej, ambulatoryjnej dializy otrzewnowej [14, 20, 36, 54]. Przedstawione poniżej dane dotyczą tkanki uzyskanej od chorych dializowanych, u których wystąpiło zapalenie otrzewnej, gdy w mezotelium zachodzą duże zmiany morfologiczne. Wczesne, obserwowane w pierwszych godzinach, są podobne do opisanych wcześniej zmian wywołanych działaniem płynu dializacyjnego. Polegają one na pogrubieniu i zaniku mikrokosmków, poszerzeniu przestrzeni międzykomórkowych i oddzieleniu komórek od błony podstawnej. Zmienia się także kształt komórek z dachówkowatego na cylindryczny, dochodzi do utraty ładunków elektroujemnych [48, 98].

Podobne zmiany morfologiczne mezotelium obserwowano w przypadku mechanicznego uszkodzenia otrzewnej zwierzęcej. Wówczas występowały także zaburzenia funkcjonalne, które polegały na wroście otrzewnowej absorpcji glukozy oraz usuwania białek. Ponadto obniżała się objętość płynu usuwanego do jamy otrzewnowej [97].

W następnym, późnym okresie dochodzi do intensywnego obumierania i zhuszczania się komórek mezotelialnych. Odklejające się komórki pociągają za sobą błonę podstawną. W efekcie pojawiają się duże powierzchnie pozbawione mezotelium [23]. Komórki, które pozostały, są pozbawione mikrokosmków, zawierają duże wakuole i nieliczne pęcherzyki pinocytarne. Pokryte są ponadto pęcherzami i bąblami. Granice cytoplazmatyczne zanikają, cytoplazma pozbawiona jest prawidłowych organelli, a występuje w niej materiał włókienkowy [33]. Otrzewna pozbawiona mezotelium pokrywa się warstwą włóknika o różnej grubości. Pod nim występują fibroblasty, a tkanka łączna infiltrowana jest makrofagami i innymi komórkami charakterystycznymi dla stanu zapalnego. Proces regeneracji

po zapaleniu otrzewnej przebiega bardzo powoli. Po kilku miesiącach (od 1 do 4) od momentu wystąpienia zapalenia otrzewnej mezotelium jeszcze nie występuje lub nieregularna jego gruba powierzchnia pokryta jest brodawkami. Brak jest również mikrokosmków. Opisane zmiany strukturalne wywołują zaburzenia ochronnej, syntetyzująco-sekrecyjnej i transportowej funkcji mezotelium [47, 58, 86]. Z uwagi na to, podjęto próby autoimplantacji komórek mezotelialnych u zwierząt doświadczalnych, a także u człowieka w przypadkach zapalenia otrzewnej [29].

FUNKCJE MEZOTELIUM W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH I PATOLOGICZNYCH

Do niedawna funkcje mezotelium analizowano głównie w kontekście dializy otrzewnowej, a więc stanie patologii człowieka. Ostatnio jednak coraz częściej zwraca się uwagę na funkcje tej struktury w warunkach fizjologicznych zarówno w organizmie człowieka, jak i zwierzęcym. Ogólnie rzecz biorąc mezotelium pełni trzy, ściśle ze sobą powiązane funkcje: ochronną, syntetyzująco-sekrecyjną oraz transportową, tj. wydalniczą oraz absorpcyjną. Jak dotąd, najlepiej poznana jest funkcja transportowa (wydalnicza), najmniej natomiast syntetyzująco-sekrecyjna.

FUNKCJA OCHRONNA

Funkcja ta polega na zmniejszeniu tarcia pomiędzy narządami, zabezpieczeniu przed wnikaniem i szerzeniem się infekcji, rozplemem komórek oraz formowaniem się włóknika [2, 61, 92, 96, 98].

Mezotelium wyścielające jamy ciała i pokrywające narządy wewnętrzne umożliwia wzajemne ich przemieszczanie wskutek znacznego ograniczenia tarcia. Funkcja ta jest wynikiem specyficznej adaptacji komórek mezotelialnych, polegającej na wytwarzaniu w ich części luminalnej mikrokosmków, a także wytwarzaniu i sekrecji związków obniżających napięcie powierzchniowe [2, 35]. Liczba mikrokosmków na powierzchni mezotelium ssaków jest więc uzależniona od aktywności ruchowej danego narządu w jamie ciała [2].

Związkami syntetyzowanymi przez mezotelium, pełniącymi funkcję ochronną są fosfolipidy, a głównym ich składnikiem fosfatydylocholina. Obniża ona napięcie powierzchniowe płynu i odpycha cząsteczki wody usytuowane na powierzchni komórek mezotelialnych [27]. W związku z takimi właściwościami zmniejsza tarcie pomiędzy narządami w jamie brzusznej, obniża wrażliwość na urazy i zmniejsza ryzyko wystąpienia zapalenia otrzewnej [49]. U osób dializowanych otrzewnowo, szczególnie w sposób ciągły (CAPD), fosfatydylocholina, a także inne fosfolipidy są ciągle usuwane wraz z wymianym płynem. Mechanizmy kompensacyjne (wzmószona synteza) nie są w stanie wyrównać tego ubytku. Dochodzi do obniżenia zawartości fosfolipidów, co zwiększa ryzyko wystąpienia zapalenia otrzewnej [8, 49, 62].

Należy także wspomnieć o zdolnościach fibrynolitycznych mezotelium. Wytwarza ono bowiem aktywator plazminogenu (typ tkankowy [96]), który warunkuje aktywność fibrynolityczną i zapobiega formowaniu się włóknika. Uszkodzenie ciągłości omawianej struktury, np. przez uraz bądź stan zapalny, ogranicza lub hamuje fibrynolizę, prawdopodobnie

poprzez obniżenie ilości wspomnianego aktywatora [92]. Prowadzi to do odkładania się włókniaka między trzewną i ścienną powierzchnią mezotelium i powstawania zrostów. Funkcja ochronna mezotelium przed inwazją komórek nowotworowych jest słabo poznana. Stwierdzono, iż wprowadzenie tych komórek do jamy otrzewnowej powoduje zmiany morfologiczne mezotelium. Następuje modyfikacja ich kształtu, kontaktów między nimi, odsłonięcia błony podstawnej. Podobnie w hodowli *in vitro* komórki nowotworowe wywołują dezorganizację pojedynczej warstwy mezotelium, retrakcję, odsłonięcie zewnątrzkomórkowego matriks. Dochodzi ponadto do tworzenia się wysepek komórek nowotworowych na powierzchni mezotelium oraz ich infiltracji w warstwę mezotelialną [1, 67]. Podobne zmiany występowały wskutek wprowadzenia do hodowli nowotworowego płynu wysiękowego (*tumor ascites fluid*). Zmiany te okazały się odwracalne, a odpowiedzialny za nie jest prawdopodobnie czynnik obecny we wspomnianym płynie [1, 67].

ZDOLNOŚCI SYNTETYCZNE I SEKRECYJNE

W ostatnich latach wykazano, iż komórki mezotelialne mają zdolność syntezy i sekrecji fosfolipidów związanych z ochronną, a także transportową funkcją tej struktury. Ponadto komórki te syntetyzują eikozanoidy, proteoglikany, czynniki regulujące wzrost, elastynę i kolagen oraz aktywator plazminogenu. Związki te biorą prawdopodobnie udział w regulacji przepływu krwi, procesu fibrylizacji oraz wzrostu, odpowiedzi na stan zapalny i tworzeniu się tkanki łącznej. Wreszcie w komórkach mezotelialnych wykazano obecność enzymów związanych z metabolizmem białek, puryn, niektórych hormonów, a także procesem fagocytozy.

W warunkach *in vitro* wykazano, iż mezotelium syntetyzuje fosfatydylocholinę, w ilościach podobnych do nabłonka płucnego [34, 35, 70]. Podobnie w badaniach morfologicznych stwierdzono istnienie ciał lamelarnych, zawierających fosfolipidy w części apikalnej oraz na powierzchni prawidłowych komórek mezotelialnych otrzewnej ściennej i krezki kilku gatunków zwierząt i człowieka. Identyczne struktury obserwowano w pneumocytach, strukturze młodszej filogenetycznie w porównaniu z mezotelium [37].

Fosfatydylocholina, jak już wspomniano, obniża napięcie powierzchniowe i odpycha cząsteczki wody usytuowane na powierzchni mezotelium [27]. Pełni więc funkcję ochronną. Nie zapobiega jednakże adhezji otrzewnowych makrofagów [78]. Ponadto, związek ten oddziałuje na czynności transportowe mezotelium otrzewnowego. Ze względu na to, iż poprzez dodatni ładunek choliny łączy się z anionami występującymi na powierzchni komórek mezotelialnych, zmniejsza grubość warstwy niemieszanego płynu na ich powierzchni [8]. W ten sposób, jak wykazały badania *in vitro*, zwiększa transport skierowany z naczyniowej do mezotelialnej strony błony otrzewnowej. Nie wpływa zaś na transport w kierunku przeciwnym. Jednocześnie stwierdzono *in vivo*, iż fosfatydylocholina obniża absorpcję wody i związków w niej rozpuszczonych z jamy otrzewnowej poprzez układ limfatyczny [62]. W efekcie, wymienione procesy powodują wzrost wypadkowej ultrafiltracji i wpływają dodatnio na efektywność dializy otrzewnowej.

Badania płynu z jamy otrzewnowej, chorych poddawanych zabiegom ciągłej dializy oraz supernatantu z hodowli komórek mezotelialnych, wykazały obecność fosfolipidów. Głównym ich składnikiem była fosfatydylocholina, której zawartość stanowiła 49–81% wszystkich fosfolipidów. W mniejszych ilościach występowały: sfingomielina, fosfatydyloetanoloamina, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna i lizofosfatydyloamina [26,

29, 30, 32, 49]. U wspomnianych chorych ilość tych związków była zróżnicowana. W przypadku osób z prawidłową ultrafiltracją poziom ich wynosił średnio 38,8 mg/l [30]. Z kolei u chorych z zaburzeniami ultrafiltracji, podobnie jak w przypadkach zapalenia otrzewnej, poziom fosfolipidów spadał poniżej 10 mg/l. U tych ostatnich podanie fosfatydylocholiny wywoływało wzrost ultrafiltracji [22, 30], nie zmieniało jednak transportu otrzewnowego u królików [28]. Przedstawione dane dowodzą, iż mezotelium otrzewnowe syntetyzuje i wydziela fosfolipidy związane, jak dotąd stwierdzono, z ochronną i transportową funkcją tej struktury. W ostatnich latach pojawiły się informacje o innych możliwościach. Jak już wspomniano, komórki mezotelialne syntetyzują eikozanoidy, związane prawdopodobnie z regulacją przepływu krwi [10, 80]. Wykazano, iż hodowane *in vitro* mezotelium, pokrywające osierdzie wołu, w obecności niespecyficznych agonistów (jonofor wapniowy), a także histaminy, bradykininy i tromboksanu, syntetyzowało prostacyklinę I₂ [31, 80]. Podobne zdolności syntetyczne wykazywały komórki mezotelialne, którymi pokryto dakronową protezę naczyniową zabezpieczając je przed agregacją płytek krwi [10, 42]. W hodowli mezotelium królika natomiast pojawiły się nieenzymatyczne produkty degradacji prostaglandyny I₆, których nie było w przypadku komórek osierdzia wołu [80]. Wskazuje to na istnienie odrębności międzygatunkowych. Ponadto hodowane *in vitro* mezotelium sieci królika, stymulowane jonoforem wapniowym, wytwarzało 6-ketoprostaglandynę F_{1α} oraz prostaglandynę E₂. Wydzielało ponadto składniki tkanki łącznej – proteoglikany, które zawierały siarczan chondroityny oraz siarczan heparanu, związane z odpowiedzią na stan zapalny oraz procesem krzepnięcia i fibrylizacji [88, 89].

Badania zależności ilościowych eikozanoidów, w dializatach z jamy otrzewnowej u człowieka, a także zwierząt, wykazały dominację prostaglandyny /PG/F_{1α}. W mniejszych ilościach występują PGE₂, PGF_{2α} i tromboksan /TX/B₂ [86]. Podkreślono, iż powszechnie stosowany płyn dializacyjny, zawierający mleczany, stymuluje, w większym stopniu niż bradykinina, syntezę prostacykliny I₂ [29]. Ponadto bakteryjne zapalenie otrzewnej wywołuje wzrost ilości wszystkich prostaglandyn i TXB₂ w płynie dializacyjnym. Stosunek naczyniorozszerzających PGE₂ i PGF_{1α} do naczyniokurczących PGF_{2α} i TXB₂ wzrasta wówczas z 6,6 do 10,5. Można więc sądzić, iż obserwowany, podczas zapalenia otrzewnej, wzrost przepływu krwi, a także zmiany właściwości transportowych mezotelium są związane ze wzmocnieniem syntezy prostaglandyn. Mechanizm tego procesu nie jest jednak znany. Sugeruje się, iż jest on związany z interakcją układu dopełniacza z kaskadą kwasu arachidonowego [86].

Z kolei glukokortykoidy hamują biosyntezę prostacykliny. Synteza tego związku, w przypadku hodowanych komórek mezotelialnych (zarówno stymulowanych, jak i nie stymulowanych bradykininą), obniżała się pod wpływem deksametazonu, który prawdopodobnie indukuje syntezę czynnika peptydowego podobnego do lipokortyny. Ten ostatni hamuje zaś wytwarzanie prostacykliny przez mezotelium [95].

Jak już wspomniano, mezotelium wykazuje zdolności fibrynolityczne. Obecność aktywatora plazminogenu wykazano bowiem zarówno *in vivo*, jak *in vitro* w zwierzęcych i ludzkich komórkach mezotelialnych [92, 96]. W przypadku tych ostatnich stwierdzono syntezę tkankowego typu tego aktywatora (t-PA) [96]. Jednocześnie wykryto obecność aktywatorów typu 1 i 2 inhibitora t-PA (PAI-1, PAI-2). Należy dodać, iż PAI-1 głównie był wydzielany do płynu hodowlanego, a duża część PAI-2 stwierdzona była w komórkach mezotelialnych. Nie wykazano obecności antygeny aktywatora plazminogenu typu urokinazy (U-PA). Wiadomo, iż spadek fibrynolitycznej aktywności mezotelium występuje w

zapaleniu, urazach i niedokrwieniu otrzewnej [92, 96]. Związane to jest m.in. z obniżeniem ilości t-PA. W badaniach *in vitro* wykazano, iż przyczyną tego obniżenia jest uwalniany przez makrofagi czynnik TNF (*tumor necrosis factor*). Powodował on zmniejszenie ilości t-PA i jednocześnie wzrost PAI-1 oraz PAI-2 w komórkach mezotelialnych. Wywoływał też zmiany morfologiczne mezotelium. Komórki przybierały kształt wrzecionowaty, a część z nich odrywała się od podłoża [96].

Mezotelium syntetyzuje ponadto elementy włókniste tkanki łącznej, tj. kolagen i elastynę. Ludzkie komórki mezotelialne *in vitro* wytwarzały I i III typ kalogenu. Nie produkowały natomiast IV i V typu tego związku. Należy nadmienić, iż I i III typ kalogenu syntetyzują zwykle komórki mezenchymalne, a IV i V jest charakterystyczny dla błony podstawnej. Jak dotąd, pozostaje niejasna zdolność komórek mezotelialnych do syntezy kolagenu śródmiaższowego [50]. Prawidłowe mezotelium opłucnej *in vitro* syntetyzowało ponadto elastynę [11]. W przypadku, wywołanego eksperymentalnie, zwłóknienia płuc obserwowano pojawienie się włókien tego związku na powierzchni opłucnej, co stanowiło prawdopodobnie odpowiedź komórek mezotelialnych na czynniki uszkadzające.

W badaniach *in vitro* wykazano także, iż prawidłowe mezotelium syntetyzuje i wydziela aktywną oraz nieaktywną postać TGF- β (*transforming growth factor* [43]). Mezotelium zmienione nowotworowo (*mesothelioma**) wytwarza TGF- β w mniejszych ilościach niż prawidłowe. Z kolei odwrotnie jest w przypadku czynnika PDGF (*platelet growth factor*). Komórki nowotworowe, wywodzące się z mezotelium [21], wytwarzały ponadto cytoplazmatyczne białko, które indukowało proliferację prawidłowego ludzkiego mezotelium *in vitro* [41]. Można więc przypuścić istnienie autokrynnej drogi regulacji wzrostu (poprzez PDGF) komórek *mesothelioma*.

O możliwościach syntetycznych świadczą też wyniki badań składu enzymatycznego komórek mezotelialnych. Wskazują one na udział tych komórek w metabolizmie białek i puryn, niektórych hormonów oraz w procesie transportu aktywnego i fagocytozy. W komórkach mezotelialnych wykazano bowiem obecność kwaśnych hydrolaz, niespecyficznej esterazy, oksydazy ksantynowej, ATP-azy oraz dehydrogenazy sterydowej. Aktywność niektórych enzymów wykazywała różnicowanie międzygatunkowe, a także topograficzne. Występowały ponadto różnice aktywności w przypadku komórek płaskich oraz cylindrycznych. Dla przykładu obecność kwaśnej fosfatazy, związanej prawdopodobnie z funkcją fagocytarną, stwierdzono w cytoplazmie mezotelium pokrywającego ścianę brzucha królika. W przypadku tego gatunku nie stwierdzono obecności fosfatazy zasadowej. Wykazano natomiast aktywność tej fosfatazy w mezotelium krezki kota [76]. Komórki mezotelialne zawierały także niespecyficzną esterazę, której obecności nie wykazano w mezotelium szczura. Wymienione enzymy mogą brać udział w metabolizmie białek usuwanych do jamy otrzewnej lub z niej absorbowanych. Przypuszcza się, iż przedstawione różnicowanie międzygatunkowe jest związane z odmiennym składem płynu znajdującego się w jamie otrzewnej. Aktywność kwaśnych hydrolaz, a także niespecyficznej esterazy uzależniona była ponadto od typu komórek mezotelialnych. W komórkach cylindrycznych była wyższa niż w komórkach dachówkowatych. Te dwa typy komórek wykazywały ponadto odrębności torów metabolicznych. W pierwszych dominowały mechanizmy oksydatywne, w drugich cykl pentozowy [98].

* Nowotworowa transformacja komórek mezotelialnych (*mesothelioma*) stanowi odrębny problem wykraczający poza zakres niniejszego opracowania.

Komórki mezotelialne niektórych struktur wykazywały ponadto obecność specyficznych enzymów. Dla przykładu mezotelium pokrywające przeponę szczura charakteryzowało się obecnością oksydazy ksantynowej. Miało więc zdolność syntezy kwasu moczowego. Wskazuje to na udział tych komórek w metabolizmie puryn [72]. Z kolei mezotelium pokrywające jajniki ssaków, charakteryzowało się obecnością dehydrogenazy 17-hydroksysteroidu. Sugeruje to powiązanie z metabolizmem steroidów [66].

W badaniach histochemicznych stwierdzono też obecność enzymów wiążących się z mechanizmem transportu aktywnego. Obserwowano np. w rejonach połączeń międzykomórkowych wysoką aktywność adenozynotrójfosfatazy. Uzyskano ponadto pozytywną reakcję na enzymy mitochondrialne: dehydrogenazę brusztynową i oksydazę cytochromową. Wskazuje to na obecność procesów oksydacyjnych, a wyzwolona tą drogą energia mogłaby być wykorzystywana m.in. w transporcie aktywnym [76].

FUNKCJA TRANSPORTOWA

Stosunkowo najczęściej analizowaną jest funkcja transportowa mezotelium. Liczne badania przeprowadzone zarówno *in vivo*, jak *in vitro* wykazały złożoność mechanizmów transportu mezotelialnego [7, 9, 16–19, 26, 56, 60, 71, 98]. Zachodzi on dyfuzyjną drogą międzykomórkową, a także przezkomórkową. W przypadku tej ostatniej nie wykluczona jest aktywna komponenta procesów transportowych [46, 56, 76]. Uzależnione są one od fizyko-chemicznej natury transportowanych cząsteczek, głównie ich wielkości oraz ładunku [6, 46, 60, 93]. Proces transportu mezotelialnego może być w szerokim zakresie modyfikowany różnymi czynnikami natury zarówno chemicznej (leki, hormony), jak i fizycznej (związki powierzchniowo, osmotycznie czynne) [6, 17, 18, 26, 55, 56]. Działanie tych czynników dotyczy przepuszczalności komórek mezotelialnych, szczelności połączeń międzykomórkowych i wszystkich rodzajów transportu przez- oraz międzykomórkowego.

Ze względu na możliwość wystąpienia zbiegunowania czynnościowego mezotelium (poprzez analogię do nabłonka nefronu), należy wyodrębnić dwie komponenty omawianego transportu. Pierwszą jest wydalanie cząsteczek np. z łożyska naczyniowego do jamy otrzewnowej. Drugą komponentę stanowi natomiast proces określony jako absorpcja, a więc transport skierowany z jamy otrzewnowej do łożyska naczyniowego. Należy podkreślić, iż badania jak dotąd koncentrowały się na czynności wydalniczej mezotelium w kontekście dializy otrzewnowej. Mezotelium można traktować bowiem jako część najbardziej prymitywnego organu wydalniczego [30]. Funkcja taka szczególnie jest widoczna w przypadku niektórych kręgowców niższych (np. ryb). Przestrzeń otrzewnowa tych ostatnich, wysłana komórkami mezotelialnymi, łączy się bezpośrednio, poprzez otwory brzuszne ze środowiskiem zewnętrznym lub pośrednio, przez połączenia przestrzeni brzusznej (nefrostoma) z układem wydalniczym [35]. W obydwu przypadkach mezotelium zabezpiecza jednokierunkowy przepływ płynu z organizmu do środowiska zewnętrznego. Wskazuje na to duża liczba otwartych pęcherzyków pinocytarnych na powierzchni luminalnej mezotelium ryb. Przestrzeń otrzewnowa u tych zwierząt, a ponadto coeloma, czy splanchnocel zwierząt niższych, pełnią więc funkcję głównego bądź pomocniczego narządu wydalniczego. Wysłana mezotelium jama otrzewnowa u człowieka i wyższych kręgowców jest analogią coelomy lub splanchnocelu. Stąd też w stadium embrionalnym pełni funkcję organu wydalniczego u wszystkich kręgowców. Jednocześnie można przypuścić, iż mezotelium u człowieka zachowało wydalniczą funkcję swoich przodków, np. zdolność jedno-

kierunkowego przepływu, która może być wykorzystana podczas procesu dializy otrzewnowej [35].

Jak już wspomniano, badania dotyczące funkcji transportowych mezotelium koncentrowały się przede wszystkim na zwiększeniu efektywności dializy otrzewnowej. W badaniach tych chodziło o określenie warunków, w których byłoby najlepsze usuwanie z ustroju związków toksycznych. Znacznie rzadziej natomiast analizowano funkcję absorpcyjną mezotelium, tj. transport cząsteczek skierowany z jamy otrzewnowej do łożyska naczyniowego [20, 93]. Znajomość tego ostatniego procesu nabiera większego znaczenia ze względu na coraz częściej stosowaną dootrzewnową terapię farmakologiczną, najczęściej obejmującą: antybiotyki [3, 14, 54, 64], insulinę [4, 74], leki przeciwnowotworowe [16, 17, 19, 57, 83] oraz związki o charakterze odżywcym [65, 68, 84, 85, 87]. Chociaż nie jest to metoda rutynowo stosowana w warunkach klinicznych, w niektórych okolicznościach może dawać wymierne korzyści. Do takich okoliczności można zaliczyć np. stany zapalne otrzewnej, występujące często u osób poddawanych dializie otrzewnowej [14, 64], a także przypadki wewnątrzotrzewnowego umiejscowienia guzów nowotworowych [57]. Po dootrzewnowym podaniu leków należy oczekiwać lepszego niż po podaniu parenteralnym efektu terapeutycznego, wskutek podwyższonego stężenia tych preparatów w bezpośrednim sąsiedztwie ogniska chorobowego. Jednocześnie zostaje ograniczone działanie środków farmakologicznych na zdrowe tkanki organizmu.

Do szczególnych okoliczności, zastosowania dootrzewnowej terapii, należy zaliczyć sytuacje, w których idzie o dostarczenie drogą otrzewnową substancji o charakterze odżywcym [84] czy też regulatorów metabolicznych (np. insuliny) [4]. Dotyczy to przede wszystkim chorych poddawanych ciągłej dializie otrzewnowej.

Dootrzewnowa terapia może wywołać także niekorzystne efekty. Wprowadzenie zbyt dużej dawki leku do jamy otrzewnowej, a przez to wytworzenie znacznego gradientu stężeń między dializatem a krwią, powoduje szybką jego absorpcję do krwiobiegu. Zjawisko to może prowadzić do intoksykacji ustroju, szczególnie w przypadku braku nerkowej eliminacji danego farmaceutyku np. wskutek niewydolności nerek. Należy wziąć także pod uwagę ewentualne zmiany w funkcjonowaniu otrzewnej (mezotelium), wywołane oddziaływaniem wysokich stężeń leków stosowanych dootrzewnowo [20, 75]. Jest to szczególnie istotne w przypadku chorych poddawanych zabiegom dializy otrzewnowej, z uwagi na krańcową niewydolność nerek. Zachowanie prawidłowej funkcji otrzewnej decyduje tu o efektywności zabiegu.

LITERATURA

- [1] AKEDO H, SHINKAI K, MUKAI M, MORI Y, TATEISHI R, TANAKA K, YAMAMOTO R, MORISHITA A. Interaction of rat ascites hepatoma cells with cultured mesothelial cell layers: a model for tumor invasion. *Cancer Res* 1986; **46**: 2416–2422.
- [2] ANDREWS PM, PORTER KR. The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *Anat Rec* 1973; **177**: 408–426.
- [3] BASTANI B, SPYKER DA, WESTERVELT JR FB. Peritoneal absorption of vancomycin during and after resolution of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Intern* 1988; **8**: 135–136.
- [4] BEARDSWORTH SF, AHMAD R, TERRY E, KARIM K. Intraperitoneal insulin: A protocol for administration during CAPD and review of published protocols. *Perit Dial Intern* 1988; **8**: 145–151.

- [5] BOLEN JW, HAMMAR SP, McNUTT MA. Serozal tissue: reactive tissue as a model for understanding mesotheliomas. *Ultrastruct Pathol* 1987; **11**: 251–262.
- [6] BRĘBOROWICZ A, JANECKI A, BRĘBOROWICZ G, KNAPOWSKI J. Monolayer mesothelium from the ileal rabbit's mesentery: An experimental model for study of peritoneal kinetics in vitro. *Perit Dial Bull* 1985; **5**: 96–100.
- [7] BRĘBOROWICZ A. Funkcja mezotelium jako bariery podczas dializy otrzewnowej. Rozprawa habilitacyjna Poznań 1986.
- [8] BRĘBOROWICZ A, SOMBOLOS K, RODELA H, OGLIVIE R, BORGMAN J, OREOPOULOS DG. Mechanism of phosphatidylcholine action during peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull* 1987; **7**: 6–9.
- [9] BRĘBOROWICZ A, RODELA H, KNAPOWSKI J, OREOPOULOS DG. Permeability of different parts of the peritoneal mesothelium to solutes: an in vitro study. *Perit Dial Intern* 1989; **9**: 135–141.
- [10] BULL H, PITTILO RM, DRURY J, POLLOCK JG, CLARKE JMF, WOLF N, MARSTON A, MACKIN SJ. Effects of autologous mesothelial cell seeding on prostacyclin production with dacron arterial prosthesis. *Br J Surg* 1988; **75**: 671.
- [11] CANTOR JO, WILLHITE M, BRAY BA, KELLER S, MANDL I, TURINO GM. Synthesis of crosslinked elastin by a mesothelial cell culture (42269). *Proceed Soc Exp Biol Med* 1986; **181**: 387–391.
- [12] CARLON G, GIUSTINA DD. A typical mesothelial cells in peritoneal dialysis fluid. *Acta Cytologica* 1983; **27**: 706–708.
- [13] CHUNG-WELCH N, PATTON WF, YEN-PATTON A, HECHTMAN HB, SHEPRO D. Phenotypic comparison between mesothelial and microvascular endothelial cell lineages using conventional endothelial cell markers, cytoskeletal protein markers and in vitro assays of angiogenic potential. *Differentiation* 1989; **42**: 44–53.
- [14] CHURCHIL DN, TAYLOR DW, VAS SI, SINGER J, BEECROFT ML, WU G, MANUEL A, PATON T, WALKER S, SMITH EKM, OREOPOULOS DG. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD): A randomized clinical trial of cotrimoxazole prophylaxis. *Perit Dial Intern* 1988; **8**: 125–128.
- [15] CONNELL ND, RHEINWALD JG. Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 1983; **34**: 245–253.
- [16] CZYŻEWSKA K, KNAPOWSKI J. Transperitoneal transport of methotrexate in vitro. *Archiv Immunol Therap Experinen* 1987; **35**: 161–167.
- [17] CZYŻEWSKA K, RAMLAU C, KNAPOWSKI J. Penetracja metotreksatu przez otrzewną. *Przegląd Lekarski* 1988; **5**: 421–427.
- [18] CZYŻEWSKA K, GRZEGORZEWSKA A, KNAPOWSKI J. Change in the transport of uric acid under the influence of pyrazinoic acid: in vitro study with human and rabbit peritoneum. *Perit Dial Intern* 1989; **9**: 303–306.
- [19] CZYŻEWSKA K, KNAPOWSKI J. Changes of peritoneal permeability in vitro due to the methotrexate influence. *Acta Med Pol w druku*.
- [20] CZYŻEWSKA K. Niektóre prawidłowości otrzewnowej absorpcji leków. *Postępy Hig Med Dośw w druku*.
- [21] DERVAN PA, TOBIN B, O'CONNOR M. Solitary (localized) fibrous mesothelioma: evidence against mesothelial cell origin. *Histopathology* 1986; **10**: 867–875.
- [22] DE VECCHI A, CASTELNOVO C, GUERRI L, SCALAMOGNA A. Phosphatidylcholine administration in CAPD patients with reduced ultrafiltration. *Perit Dial Intern* 1989; **9**: 207–210.
- [23] DI PAOLO N, SACCHI G, BUONCRISTIANI U, ROSSIP, GAGGIOTTI E, ALESSANDRINI C, IBBA L, PUCCI AM. The morphology of the peritoneum in CAPD patients. [w] *Frontiers in peritoneal dialysis*. Maher JF, Winchester JF, Red NY Field, Rich and Associates Inc, 1986, 11–19.
- [24] DI PAOLO N, SACCHI G, CAPOTONDO L, GAGGIOTTI E. The peritoneum is a living membrane. *Perit Dial Bull* 1987; **7**: 24.
- [25] DI PAOLO N, SACCHI G, DE MIA M, GAGGIOTTI E, CAPOTONDO L, ALESSANDRINI C. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1986; **44**: 204–211.
- [26] DI PAOLO N, BUONCRISTIANI U, CAPOTONDO L, GAGGIOTTI E, DE MIA M, ROSSI P, SANSONI E, BERNINI M. Phosphatidylcholine and peritoneal transport during peritoneal dialysis. *Nephron* 1986; **44**: 365–370.
- [27] DI PAOLO N, CAPOTONDO L, DE MIA M, ROSSIP, SANSONI E. Phosphatidylcholine: Physiological modulation of peritoneal transport. *Perit Dial Bull* 1987; **7**: 23.
- [28] DI PAOLO B, CHAKRABARTI E, MAHER JF. Phosphatidylcholine does not affect peritoneal transport of intact rabbits. *Perit Dial Intern* 1989; **9**: 211–213.

- [29] DI PAOLO N, SACCHI G, VANNI L, CORAZZI S, PALLINI V, ROSSI P, GAGGIOTTI E, BOUNCRISTIANI U. Implant of autologous mesothelial cells in animals and a peritoneal dialysis patients. *Int J Artif Organs* 1989; 12: 485–501.
- [30] DI PAOLO N. The peritoneal mesothelium: an excretory organ. *Perit Dial Intern* 1989; 9: 151–153.
- [31] DI PAOLO N, BOUNCRISTIANI U. Quantitative determination of prostaglandin I₂ production by mesothelial cells in culture. w druku.
- [32] DI PAOLO N, BOUNCRISTIANI U, CORAZZI E. Phospholipids and peritoneal dialysis. w druku.
- [33] DOBBIE JW, ZAKI MA. The ultrastructure of the parietal peritoneum in normal and uraemic man and in patients on CAPD. [w] *Frontiers in peritoneal dialysis*. Maher JF, Winchester JF (red) NY Field, Rich and Associates Inc 1986; 3–10.
- [34] DOBBIE JW, PAVLINA T, LLOYD J, JOHNSON R. Phosphatidylcholine synthesis by peritoneal mesothelium. Its implications for peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1988; 12: 31.
- [35] DOBBIE JW. From philosopher to fish: the comparative anatomy of the peritoneal cavity as an excretory organ and its significance for peritoneal dialysis in man. *Perit Dial Intern* 1988; 8: 3–6.
- [36] DOBBIE JW. Surgical peritonitis: its relevance to the pathogenesis of peritonitis in CAPD. *Perit Dial Intern* 1989; 8: 241–248.
- [37] DOBBIE JW, LLOYD JK. Mesothelium secretes lamellar bodies in a similar manner to type II pneumocyte secretion surfactant. *Perit Dial Intern* 1989; 9: 215–219.
- [38] DOBBIE JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif* 1989; 7: 74–85.
- [39] DOBBIE JW. New concepts in molecular biology and ultrastructural pathology of the peritoneum: their significance for peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 1990; 15: 97–109.
- [40] DOBBIE JW, PAVLINA T, LLOYD JK, HJILLE JT. In vitro systems for testing effects of dialysate composition on mesothelium. *Perit Dial Intern* 1990; 10 (suppl 1) : 51.
- [41] DONNA A, BETTA PG, COSIMI MF, ROBUTTI F, BELLINGERI D, MARCHESINI A. Putative mesothelial cell growth-promotive activity of a cytoplasmic protein expressed by the mesothelial cell. A preliminary report. *Exp Cell Biol* 1989; 57: 193–197.
- [42] FENTIE IH, ALLEN DJ, SCHENCK MH, DIDJO LJ. Comparative electron microscopic study of bovine porcine and human parietal pericardium as materials for cardiac valve bioprostheses. *J Submicrosc Cytol* 1986; 18: 53–65.
- [43] GERVIN BI, LECHNER JF, REDDEL RR, ROBERTS AB, ROBBINS KC, GABRIELSON EW, HARRIS CC. Comparison of production of transforming growth factor and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell line. *Cancer Res* 1987; 47: 6180–6184.
- [44] GOKAL R, LLOYD C, BAILLOD R, MARSH F, OGG C, OLIVER D, WARD M, WILKINSON R. Multicenter study on the outcome of patients on CAPD and hemodialysis. [w] *Frontiers in peritoneal dialysis*. Maher JF, Winchester JF (red) NY Field, Rich and Associates Inc 1986; 293–296.
- [45] GOTLOIB L, BAR-SELLA P, SHOSTAK A. Reduplicated basal lamina of small venules and mesothelium of human parietal peritoneum. Ultrastructural changes of reduplicated peritoneal basement membrane. *Perit Dial Bull* 1985; 5: 212–215.
- [46] GOTLOIB L, SHUSTACK A. Ultrastructural morphology of the peritoneum: New findings and speculations on transfer of solutes and water during peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull* 1987; 7: 119–129.
- [47] GOTLOIB L, SHUSTACK A, BAR-SELLA P, COHEN R. Continuous mesothelial injury and regeneration during long term peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull* 1987; 7: 148–155.
- [48] GOTLOIB L, SHUSTACK A, JAICHENKO J. Loss of mesothelial and microvascular fixed anionic charges during murine experimentally induced septic peritonitis. *Perit Dial Bull* 1987; suppl 7: 36.
- [49] GRAHAME GR, TORCHIA MG, DANKEWICH KA, FERGUSON IA. Surface-active material in peritoneal effluent of CAPD patients. *Perit Dial Bull* 1985; 5: 109–111.
- [50] HARVEY W, AMLOT RL. Collagen production by human mesothelial cells in vitro. *J Pathol* 1983; 139: 337–347.
- [51] HJELLE TJ, GOLIŃSKA BT, WATERS DC, STEIDLEY KR, MCCARROLL DR, DOBBIE JW. Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Intern* 1989; 9: 341–347.
- [52] JOENSUU TK, TUO HIMA PJ. Ontogeny of the estrogen receptor in the chick oviduct. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 293–296.
- [53] JUNQUEIRA LCU, JOAZEIRO PP, TOLEDO OMS, MONTES GS. A morphologic and histochemical study of the mesentery in the guinea pig. *Acta Anat* 1987; 129: 214–219.
- [54] KEANE WF, EVERETT ED, FINE RN, GOLPER TA, VAS SI, PATERSON PK. CAPD related peritonitis management and antibiotic therapy recommendations. Travenol Peritonitis Management Advisory Committee. *Perit Dial Bull* 1987; 7: 56–68.

- [55] KNAPOWSKI J. Patofizjologia procesu dializy otrzewnowej. *Przegląd Lek* 1987; **44**: 370–375.
- [56] KNAPOWSKI J, BRĘBOROWICZ A, CZYŻEWSKA K. Effect of furosemide on transperitoneal passage of uric acid – experimental studies. *Acta Med Pol.* W druku.
- [57] KNAPP RC, JOHN ES, BAST JR RC. A review of intraperitoneal therapy of human ovarian carcinoma. *Perit Dial Bull* 1983; **3**: 59–62.
- [58] KREDIET RT, BERKINSHAW K, BOESCHOTEN EW, ARISZ L. Clinical aspects of peritoneal permeability. *Neth J Med* 1985; **28**: 424–434.
- [59] LEAK LV. Distribution of cell surface charge on mesothelium and lymphatic endothelium. *Microvasc Res* 1986; **31**: 18–30.
- [60] LEYPOLDT JK, PARKER H, FRIGON RP, HENDERSON RW. Molecular size dependence of peritoneal transport. *J Lab Clin Med* 1987; **110**: 207–216.
- [61] LOUAGIE Y, LEGRAND MONSIEUR A, REMACLE C, MALDAQUE P, LAMBOTTE L, PONLOT R. Morphology and fibrolytic activity of canine autogenous mesothelium used as venous substitute. *Res Exp Med Berl* 1986; **186**: 239–247.
- [62] MACTIER RA, KHANNA R, TWARDOWSKI ZJ, MOORE H, NOLPH KD. Influence of phosphatidylcholine on lymphatic absorption during peritoneal dialysis in the rat. *Perit Dial Intern* 1988; **8**: 178–186.
- [63] MADISON LD, BERGSTROM-PORTER B, TORRES AR, SHELTON E. Regulation of surface topography of mouse cells. Formation of microvilli and vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol* 1979; **82**: 783–797.
- [64] MANUEL MA, PATON TW, CORNISH WR. Drugs and peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull* 1983; **3**: 117–125.
- [65] MITWALLI A, RODELLA H, BRANDES L, WANLESS I, WU G, OGILVIE R, SCHILLING M, DOBBIE JW, WILSON LS, OREOPOULOS DG. Is fat absorbed through the peritoneum? *Perit Dial Bull* 1985; **5**: 165–168.
- [66] NICOSIA SV, JOHNSON JH. Surface morphology of ovarian mesothelium (surface epithelium) and of other pelvic and extrapelvic mesothelial sites in the rabbit. *Int J Gynecol Pathol* 1984; **3**: 249–260.
- [67] NIEDBAŁA MJ, CRIKARD K, BERNACKI RJ. Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. *Exper Cell Res* 1985; **160**: 499–513.
- [68] OBIOLS FC, JUNYENT JM, RIERA SS, GIL MF. The use of peritoneal dialysis as a means of supplying nutrients. *Infusiontherapie* 1987; **14**: (suppl 1), 46–51.
- [69] OSTROWSKI K. Embriologia człowieka. PZWL Warszawa 1988; 55–61.
- [70] PAVLINA T, LLOYD J, JOHNSON R, DOBBIE JW. Phosphatidylcholine synthesis by rat peritoneum. *Kidney Int* 1988; **33**: 248.
- [71] PAYNE DK, KINASEWITZ, GOHZALEZ E. Comparative permeability of canine visceral and parietal pleura. *J Appl Physiol* 1988; **65**: 2558–2564.
- [72] PETERSON RD, BEATLY CH, BACEK RM. High-energy phosphate compounds of rat diaphragm and skeletal muscle fibers. *Am J Physiol* 1961; **200**: 182–186.
- [73] PFEIFFER CJ, PFEIFFER DC, MISRA HP. Enteric serosal surface in the piglet. A scanning and transmission electron microscopic study of the mesothelium. *J Submicrosc Cytol* 1987; **19**: 236–246.
- [74] PILI GF, FERRARA PR, CIVILLO R, COSSU E, ALTIERI P. Intraperitoneal human insulin in diabetic on CAPD. *Perit Dial Bull* 1985; **5**: 271.
- [75] PIRAINO B, BERNARDINI J, JOHNSTON J, SORKIN M. Chemical peritonitis due to intraperitoneal vancomycin. *Perit Dial Bull* 1987; suppl 7: 59.
- [76] RAFTERY AT. An enzyme histochemical study of mesothelial cells in rodents. *J Anat* 1973; **115**: 365–373.
- [77] REGISTRY REPORT. Demography of dialysis and transplantation in Europe 1984, Report from the European Dialysis and Transplant Association Registry. *Nephrol Dial Transpl* 1986; **1**: 1–8.
- [78] ROZGAJ, ANDERSSON R, SRINIVASU, AHREN B, BENGMARK S. Influence of phosphatidylcholine on intra-abdominal adhesion formation and peritoneal macrophages. *Nephron* 1990; **54**: 134–138.
- [79] SALOMAA S, PEKKI A, SANNISTO T, YLIKOMI T, TUOHIMAA P. Progesterone receptor is constitutively expressed in chicken intestinal mesothelium and smooth muscle. *J Steroid Biochem* 1989; **34**: 345–349.
- [80] SATOH K, PRESCOTT SM. Culture of mesothelium cells from bovine pericardium and characterization of their arachidonate metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1987; **930**: 283–296.
- [81] SETRAKIAN S, SAUNDERS BO, NICOSIA SV. Isolation and characterization of rabbit peritoneal mesothelial cells. *Acta Cytol* 1990; **34**: 92–99.
- [82] SLATER NJ, RAFTERY AT, COPE GH. The ultrastructure of human abdominal mesothelium. *J Anat* 1989; **167**: 47–56.

- [83] v d SLOOT JAP, DUBBELMAN R, v WIJK A, HEINTZ APM, AARTSEN E, FRANKLIN H, v d VIJGH W, ten BOKKEL HUININH WW, Mc VIE JG. Intraperitoneal chemotherapy for minimal residual ovarian cancer: experience with cisplatin and carboplatin. *Nephrology Dial Transplant* 1989; **4/8**: 754.
- [84] STABILE BE, BORZATTA M. Transperitoneal absorption of glucose and amino acids for nutritional support. *Arch Surg* 1987; **122**: 344–348.
- [85] STABILE BE, CALABRIA R. Intraperitoneal nutritional support: initial results in canine model. *J Surgical Res* 1987; **42**: 362–368.
- [86] STEINHÄUER HB, GÜNTER B, SCHOLLMEYER P. Stimulation of peritoneal synthesis of vasoactive prostaglandins during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur J Clin Invest* 1985; **15**: 1–5.
- [87] STONE MM, MULVIHILL SJ, LEVIN KJ, FONKALSRUD EW. Long-term total intraperitoneal nutrition in rabbit model. *J Pediatric Surgery* 1986; **21**: 267–270.
- [88] STYLIANOU E, DAVIES M, COLES GA, WILLIAMS JD. The isolation and culture of human mesothelial cells: characterization of cyclooxygenase products. *Perit Dial Bull* 1987; **7**: 74.
- [89] STYLIANOU E, THOMAS G, DAVIES M, COLES GA, WILLIAMS JD. The synthesis of proteoglycans by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Bull* 1987; **7**: 74.
- [90] SUGIMOTO K, FUJI S, ICHIKAWA Y, NAKAMURA I. Role of actin filaments in shape formation of mesenteric mesothelial cells of the bullfrog. *J Morphol* 1988; **198**: 321–329.
- [91] SUŁOWICZ W. Cytomorfologiczna, cytochemiczna i czynnościowa charakterystyka komórek z dializatu otrzewnowego chorych ze schyłkową niewydolnością nerek leczonych przerywanymi dializami otrzewnowymi Cz. II Charakterystyka morfologiczna komórek z płynów otrzewnowych. *Przegląd Lek* 1987; **44**: 539–549.
- [92] THOMPSON JN, PETERSON-BROWN S, HARBOURNE T, WHAWELL SA, KOLODIKI E, DUDLEY H. Reduced human peritoneal plasminogen activating activity: possible mechanism of adhesion formation. *Br J Surg* 1989; **76**: 382–384.
- [93] TORRES IJ, LITTERST CL, GUARINO AM. Transport of model compounds across the peritoneal membrane in the rat. *Pharmacology* 1978; **17**: 330–340.
- [94] VAN BROSWIJK H, VERBRUGH HA, BOS HJ, HEEZIUS ECJM, OE PL, van der MEULEN J, VERHOEF J. Cytotoxic effect of commercial continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) fluids and bacterial exoproducts on human mesothelial cells in vitro. *Perit Dial Intern* 1989; **9**: 197–202.
- [95] VAN de VELDE VJS, HERMAN AG, BULT H. Effects of dexamethasone on prostacyclin biosynthesis in rabbit mesothelial cells. *Prostaglandins* 1986; **32**: 169–177.
- [96] van HINSBERGH VW, KOOISTRA T, SCHEFFER MA, HAJO-van BOCKEL I, van MUIJEN GN. Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood* 1990; **75**: 1490–1497.
- [97] VERGER CH, LUGER A, MOORE HL, NOLPH KD. Acute changes with infectious peritonitis and mechanical injury. *Kidney Int* 1983; **23**: 823–831.
- [98] WHITAKER D, PAPADIMITRIOU JM, WALTERS MNI. The mesothelium and its reaction: a review. [w] *Critical Reviews in Toxicology*, CRC Press Inc, Boca Eaton, Florida 1982; **10**: 81–144.

Otrzymano: 6 lipca 1990

Przyjęto: 26 października 1990

Adres autorki: 60-781 Poznań, ul. Świeckiego 6

BADANIA MOLEKULARNO-GENETYCZNE W DIAGNOSTYCE CHŁONIAKÓW*

MOLECULAR GENETIC ANALYSES IN LYMPHOMA DIAGNOSIS

Jan LUBIŃSKI, Konrad PTASZYŃSKI

Zakład Genetyki i Patomorfologii, Instytut Patologii PAM

Streszczenie. Na podstawie badań własnych oraz danych z piśmiennictwa przedstawiono znaczenie molekularno-genetycznych analiz służących do wykrywania przemieszczenia genów immunoglobulinowych, genów receptorów limfocytów T, onkogenów *bcl-2*, *c-myc* i "locus" *bcl-1* w rozstrzyganiu takich problemów w diagnostyce chłoniaków, jak: 1) różnicowanie między chłoniakami i łagodnymi zmianami limfoproliferacyjnymi; 2) różnicowanie między chłoniakami a nowotworami złośliwymi spoza układu chłonnego; 3) klasyfikacja chłoniaków na wykazujące cechy limfocytów B i T; 4) wykrywanie "śladowych" ilości komórek nowotworowych.

Summary. The molecular genetic analyses for rearrangements of immunoglobulin genes, T cell receptor genes, oncogenes *bcl-2*, *c-myc* and *bcl-1* "locus" are presented in their application. The analyses are used in solving such problems in lymphoma diagnosis as: 1) differential diagnostic of lymphomas and benign lymphoproliferative disorders; 2) differential diagnostic of lymphomas and non-lymphoid malignant tumors; 3) classification of lymphomas into B and T cell tumors; 4) detection of small number of tumor cells.

WSTĘP

Geny immunoglobulinowe (*Ig*) i receptorów limfocytów T (*RLT*) zbudowane są z licznych odcinków DNA, które podczas różnicowania zostają przemieszczone [21, 31, 42]. Istnieje $> 10^6$ możliwości przemieszczenia genów *Ig* lub *RLT*. Struktura genów *Ig* lub *RLT* po przemieszczeniu stanowi wysoce specyficzny marker dla poszczególnych limfocytów lub wywodzących się z nich złośliwych komórek chłoniaków. Geny *Ig* i *RLT* występują we wszystkich typach ludzkich komórek, ale przemieszczenia genów *Ig* następują niemal wyłącznie w limfocytach B, a przemieszczenia genów *RLT* ograniczone są do limfocytów T [4, 6, 12, 16, 20]. Przemieszczenia genów *Ig* i/lub genów *RLT* można wykryć w blisko 100%

*Referat wygłoszony podczas konferencji biologii komórki 10.11.1990.

chłoniaków nieziarniczych (CHN) i wysokim odsetku w ziarnicy złośliwej (ZZ) [3, 5, 6, 15, 16, 20, 23, 26, 31, 32, 36, 41, 44]. Przemieszczenia genów *Ig* i *RLT* nie występują w nowotworach złośliwych spoza układu chłonnego [1, 2, 27, 33].

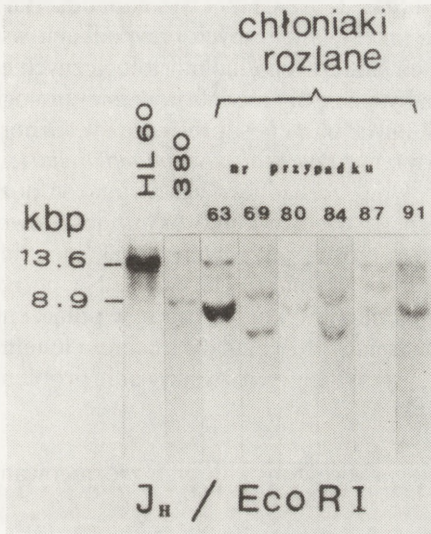
Inną charakterystyczną cechą wielu chłoniaków są przemieszczenia onkogenów lub innych istotnych w patogenezie chłoniaków odcinków DNA powstające w wyniku chromosomalnych translokacji [8, 40]. 80–90% chłoniaków grudkowych (CHG) i 30% ZZ wykazuje translokację *t*(14; 18) (q32; q21). Translokacja *t*(11; 14) (q13; q32) występuje w CHN z małych limfocytów B (CHNML-B), przewlekłej białaczce limfatycznej B komórkowej (PBL-B) i szpiczaku. 100% chłoniaków Burkitta wykazuje jedną z następujących translokacji *t*(8; 14) (q24; q32), *t*(8; 22) (q34; q11) lub *t*(2; 8) (p11; q24). Onkogeny *bcl-2* i *c-myc* są przemieszczone odpowiednio w CHG, ZZ i chłoniakach Burkitta. Odcinek DNA określany jako *bcl-1* przemieszczony jest w CHNML-B, PBL-B i szpiczakach wykazujących *t*(11; 14).

Wykazano, że molekularno-genetyczna ocena przemieszczeń: 1) genów *Ig* i *RLT* oraz 2) onkogenów i innych odcinków DNA mających znaczenie w rozwoju chłoniaków mogą zostać wykorzystane w praktycznej diagnostyce chłoniaków.

METODY

Standardową metodą wykrywania przemieszczeń genów jest obecnie technika Southerna [9, 29]. DNA do analizy wg Southerna należy izolować z tkanek świeżych nieutrwalonych lub zamrożonych. Na ogół niemożliwa jest ocena materiału utrwalonego w formalinie. Efektywne badanie można wykonać nawet z niewielkiej ilości materiału uzyskiwanego techniką punkcji cienkoigłowej. W metodzie Southerna izolowany DNA cięty jest enzymami restrykcyjnymi na fragmenty, które są rozdzielane, zależnie od ich wielkości, elektroforezą poziomą w żelu. Po przeniesieniu na błonę (bibułę) fragmenty DNA zawierające badany gen są wykrywane sondami molekularnymi wyznakowanymi izotopami lub znacznikami nieradioaktywnymi. Geny, które uległy przemieszczeniu, wykrywane są w odcinkach DNA o zmienionej długości. Na przykład: po pocięciu enzymem restrykcyjnym *Eco* RI nieprzemieszczany gen dla łańcucha ciężkiego *Ig* wykrywany jest w odcinkach DNA długości 13,6 kbp (rys. 1, linia komórkowa HL 60). Odcinki DNA o odmiennej długości zawierają gen dla łańcucha ciężkiego *Ig*, jeżeli występuje przemieszczanie tego genu (rys. 1, linia komórkowa 380 i przypadki chłoniaków rozlanych nr 63–91). Czułość metody Southerna umożliwia wykrycie przemieszczeń tylko wówczas, gdy identyczną strukturę ułożenia genów wykazuje co najmniej 10^4 komórek. W zmianach limfoproliferacyjnych przemieszczenia genów *Ig* lub *RLT* wykrywane są wówczas, gdy występują w nich klonalne rozrosty limfocytów. Tak więc wykrywanie genów w odcinkach DNA o zmienionej długości jest równoznaczne z wykryciem klonalnego wzrostu komórek. W odczynowych węzłach chłonnych klony limfocytów z przemieszczeniem genów *Ig* lub *RLT* występują, jednak nie są one wykrywane, ponieważ liczba limfocytów z identycznym ułożeniem genów jest zbyt mała, aby mogła być wykryta metodą Southerna. Wykrywanie klonalnego wzrostu komórek metodą Southerna ma dużą praktyczną wartość diagnostyczną. Technika ta umożliwia wykrycie klonów komórkowych nawet wtedy, gdy stanowią one mniej niż 5% komórek w biopsji. Ocena przemieszczeń genów jest bardziej efektywna od immunocytochemii w

ustaleniu klonalności, ponieważ za pomocą analizy DNA klonny komórkowe wykrywane są niezależnie od domieszki nienowotworowych limfocytów i jakichkolwiek komórek spoza tkanki limfatycznej [1, 4].



Rys. 1. DNA izolowane z linii komórkowych HL 60 i 380 oraz chłoniaków rozlanych pocięto enzymem restrykcyjnym Eco RI, poddano elektroforzezie, przeniesiono na błonę i hybridyzowano z sondą molekularną wykrywającą geny łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (*IgH*); w linii komórkowej HL 60 przemieszczenie tego genu nie występuje, dlatego też znakowany jest odcinek DNA długości 13,6 kbp; znakowanie odcinków DNA o odmienniej długości wskazujące na przemieszczenie genu *IgH* i klonalny rozrost komórek widoczne jest we wszystkich pozostałych przypadkach

Inną metodą przydatną diagnostycznie jest enzymatyczna amplifikacja DNA *in vitro* za pomocą metody łańcuchowej reakcji z polimerazą (PCR – *polymerase chain reaction*) [43]. PCR jest techniką o niezwykle wysokiej czułości. Fragmenty DNA długości do ok. 2 000 bp z charakterystycznymi dla danego nowotworu zmianami wynikającymi z mutacji punktowych, delecji lub translokacji mogą być zwielokrotniane przez PCR nawet 10^6 razy. Wykazano, że charakterystyczne dla komórek CHG sekwencje powstające w trakcie translokacji t(14; 18) (q32; q21) mogą być wykryte techniką PCR nawet wówczas, gdy występują one tylko w jednej spośród 10^5 ocenianych komórek [7, 22, 39]. Takie analizy można wykonywać nie tylko ze świeżego materiału, ale i z DNA izolowanego z biopsji utrwalanych w formalinie i zatapianych w parafinie [4]. Oceniane metodą PCR zmiany w strukturze DNA muszą być dobrze poznane na poziomie molekularnym. Stanowi to ograniczenie w praktycznym wykorzystaniu PCR do diagnostyki chłoniaków, ponieważ w wielu chłoniakach zmiany molekularne są zmienne i specyficzne tylko dla pojedynczego przypadku nowotworu.

ZASTOSOWANIE DIAGNOSTYCZNE

RÓŻNICOWANIE MIĘDZY CHŁONIAKAMI I NIENOWOTWOROWYMI ZMIANAMI LIMFOPROLIFERACYJNYMI

Analizy molekularno-genetyczne są przydatne w różnicowaniu między chłoniakami i nienowotworowymi rozrostami limfocytarnymi przez: 1) ocenę klonalnego wzrostu komór-

rek w zmianach limfoproliferacyjnych na podstawie badania przemieszczeń genów *Ig* i *RLT*; 2) wykrywanie przemieszczeń onkogenów, takich jak *bcl-2* czy *c-myc*.

Klonalny wzrost komórek jest wykrywany w blisko 100% CHN i wysokim odsetku ZZ [3, 5, 6, 15, 16, 20, 23, 26, 31, 32, 36, 41, 44], a także w nielicznych przypadkach wśród pacjentów ze zmianami limfoproliferacyjnymi bez klinicznych i/lub morfologicznych cech rozrostu złośliwego, takich jak wrodzone lub nabyte zespoły niedoborów immunologicznych, odczynowe węzły chłonne u chorych poddanych immunosupresji oraz w różnorodnych pozawęzłowych rozrostach limfocytarnych w tym w tzw. *benign lymphoepithelial lesion* związanym z zespołem Sjögrena (zmiany tego typu szczegółowo zestawiono w pozycji piśmiennictwa [26]). Tak więc wykrycie klonalnego wzrostu komórek nie jest równoznaczne z rozpoznaniem złośliwego charakteru rozrostu, jak również brak klonalnych przemieszczeń genów *Ig* lub *RLT* nie wyklucza rozpoznania chłoniaka. Na potrzeby diagnostyki badanie klonalnego wzrostu musi być zatem wykorzystywane w połączeniu z danymi klinicznymi i obrazem morfologicznym zmiany. Molekularna ocena klonalnego wzrostu stosowana według takich zasad okazała się przydatna w rozwiązywaniu problemów diagnostycznych, takich jak różnicowanie między:

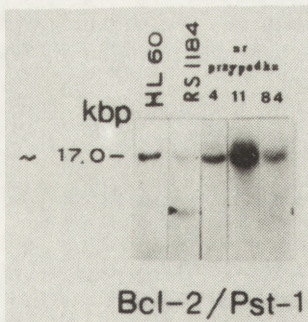
(1) CHN i odczynowymi węzłami chłonnymi,

(2) CHN i pozawęzłowymi naciekami nienowotworowymi z dobrze zróżnicowanych limfocytów,

(3) ZZ i odczynowymi węzłami chłonnymi [1, 4, 5, 6, 12, 16, 18, 20, 25, 26, 32, 33].

Mimo występowania w nielicznych przypadkach mikroskopowo-światlnych rozpoznania błędnie ujemnych wydaje się, że analizy molekularne nie są niezbędne w każdym przypadku rozpoznaniem badaniem morfologicznym jako nienowotworowa zmiana limfoproliferacyjna. Właściwe wydaje się natomiast stosowanie badań molekularnych w celu określenia klonalnego wzrostu w tych wszystkich przypadkach, w których dane kliniczne lub obraz morfologiczny budzą nawet najmniejsze podejrzenia złośliwego charakteru rozrostu limfocytarnego.

Molekularno-genetyczna ocena przemieszczeń onkogenów jest również przydatna w różnicowaniu między chłoniakami a nienowotworowymi zmianami limfoproliferacyjnymi. Przemieszczenia onkogenów wydają się być markerem bardziej specyficznym dla rozrostu



Rys. 2. DNA izolowane z linii komórkowej HL 60 chłoniaka grudkowego RS 1184, odczynowych węzłów chłonnych (przypadki nr 4, 11) i chłoniaka rozlanego (przypadek nr 84) poddano analizie metodą Southerna stosując enzym restrykcyjny PstI i sondę molekularną dla onkogenu *bcl-2*; w linii komórkowej HL 60, która nie wykazuje przemieszczeń *bcl-2*, znakowany jest jedynie odcinek DNA długości \approx 17,0 kbp; znakowanie odcinka DNA o odmiennie długości, a zatem przemieszczenie *bcl-2* wykryto w chłoniaku grudkowym RS 1184; nie stwierdzono przemieszczeń *bcl-2* w odczynowych węzłach chłonnych i chłoniaku rozlanym

złośliwego od klonalnego wzrostu ocenianego na podstawie przemieszczeń genów *Ig* i *RLT*. Specyficzność przemieszczeń genów *bcl-2* (rys. 2), *c-myc* czy odcinka *bcl-1* dla złośliwych zmian limfoproliferacyjnych nie jest jednak jak dotąd dostatecznie zweryfikowana [10, 28, 40].

RÓŻNICOWANIE MIĘDZY CHŁONIAKAMI A NOWOTWORAMI ZŁOŚLIWYMI SPOZA UKŁADU CHŁONNEGO

Badania przemieszczeń genów są szczególnie przydatne w ocenie typu nowotworów złośliwych w przypadkach, w których w diagnostyce różnicowej uwzględniane są CHN. Wystąpienie przemieszczeń genów *Ig* lub *RLT* umożliwia rozpoznanie CHN a wykluczenie raka, mięsaka czy czerniaka. Nowotwory złośliwe spoza układu chłonnego nie wykazują przemieszczeń genów *Ig* lub *RLT* [1, 2, 27, 33]. Brak przemieszczeń genów nie wyklucza ZZ. Metodą tańszą i technicznie prostszą od analiz DNA, a bardzo przydatną w klasyfikowaniu nowotworów złośliwych na grupy jest immunocytochemia. Jednakże w niektórych przypadkach jedynie ocena przemieszczeń genów umożliwia rozpoznanie chłoniaków [1, 14]. Badania przemieszczeń genów mogłyby być również przydatne w ocenie przypadków z nietypowymi wynikami analiz immunocytochemicznych [19, 30].

KLASYFIKACJA CHŁONIAKÓW NA NOWOTWORY LINII B I T

Przemieszczenie genów łańcucha lekkiego *Ig* wskazuje na chłoniaki linii B, a przemieszczenie genów *RLT* jest typowe dla chłoniaków T. Jednakże w nisko zróżnicowanych chłoniakach, takich jak "chłoniaki anaplastyczne z dużych komórek", w których markery immunocytochemiczne nie rozstrzygają często o różnicowaniu w kierunku komórek B lub T, obserwować można niekiedy jednoczesne przemieszczenie genów zarówno *Ig*, jak i *RLT* [16, 34].

Pacjenci z limfadenopatią angioimmunoblastyczną, w których występują klonalne przemieszczenia genów zarówno *Ig*, jak i *RLT*, mają rokowanie gorsze od tych, u których wykrywane jest jedynie przemieszczenie genów *RLT* [11].

WYKRYWANIE "ŚLADOWYCH" ILOŚCI KOMÓREK NOWOTWOROWYCH

Niewielka liczba komórek nowotworowych niewykrywalna badaniem morfologicznym może być wykryta z wysoką czułością metodą PCR lub, jeśli to niemożliwe, techniką Southerna. Wykrywanie niewielkich ilości komórek nowotworowych jest ważne w ocenie rozległości choroby, we wczesnym wykryciu nowotworów i monitorowaniu leczenia chłoniaków [7, 17, 22, 24, 37, 39].

LITERATURA

- [1] ARNOLD A, COSSMAN J, BAKHSHI A, JAFFE ES, WALDMANN TA, KORSMEYER SJ. Immunoglobulin gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. *N Engl J Med* 1983; 309: 1593-1599.
- [2] BERTNESS V, KIRSCH I, HOLLIS G, JOHNSON B, BUNN PA. T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1985; 313: 534-538.

- [3] BRINKER MGL, POPPEMA S, BUYS C, TIMENS W, OSINGA J, VISSER L. Cloned immunoglobulin gene rearrangements in tissues involved by Hodgkin's disease. *Blood* 1987; **70**: 186–191.
- [4] CLEARY ML, CHAO J, WARNKE R, SKLAR J. Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 593–597.
- [5] CLEARY ML, SKLAR J. DNA rearrangement in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Surv* 1985; **4**: 331–348.
- [6] COSSMANN J, UPPENKAMP M, SUNDEEN J, COUPLAND R, RAFFELD M. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1988; **112**: 117–127.
- [7] CRESCENZI M, SETO M, HERZIG GP, WEISS PD, GRIFFITH RC, KORSMEYER SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14; 18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 4869–4873.
- [8] CROCE CM. Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* 1987; **49**: 155–156.
- [9] DAVIS LG, DIBNER MD, BATTEY JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier Publishers, New York 1986.
- [10] De JONG D, van OMMEN GJB, van KRIEKEN HMJM, SLAPER-CORTENBACH ICM, PEARSON PL, KLUIN PhM. Polymerase chain reaction (PCR) detects tumor marker t(14; 18) in benign follicular hyperplasia. 21st Conference of European Society of Human Genetics. Groningen, the Netherlands, May 11–13, 1989, Abstracts, p42.
- [11] FELLER AC, GRIESSER H, von SCHILLING C, WACKER HH, DALLENBACH F, BARTELS H, KSE R, MAK TW, LENNERT K. Clonal gene rearrangement patterns correlate with immunophenotype and clinical parameters in patients with angio-immunoblastic lymphadenopathy. *Am J Pathol* 1988; **133**: 549–554.
- [12] FLUG F, PELICCI P-G, BONETTI F, KNOWLES DM II, DALLA-FAVERA R. T-cell receptor gene rearrangements as markers of lineage and clonality in T-cell neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 3460–3464.
- [13] FAO R, CASORATI G, GIUBELLINO MC, BASSO G, SCHIRO R, PIZZDO G, LAUSIA F, LEFRANC MP, RABBITTS TH, MIGONE N. Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor beta and gamma genes associated with terminal deoxynucleotidyl transferase expression in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 1987; **165**: 879–890.
- [14] GONZALES-CRUSSI F, MANGKORNKANOK M, HSUEH W. Large-cell lymphoma. Diagnostic difficulties and case study. *Am J Surg Pathol* 1987; **11**: 59–65.
- [15] GRIESER H, FELLER A, MAK TW, LENNERT K. Clonal rearrangements of T-cell receptor and immunoglobulin genes and immunophenotypic antigen expression in different subclasses of Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 1987; **40**: 157–169.
- [16] GRIESER H, TKACHUK D, REIS MD, MAK TW. Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood* 1989; **73**: 1402–1415.
- [17] HANSEN-HAGGE TE, YOKOTA S, BATRAM CR. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor chain sequences. *Blood* 1989; **74**: 1762–1767.
- [18] HU E, HORNING S, FLYNN S, BROWN S, WARNKE R, SKLAR J. Diagnosis of Bcell lymphoma analysis of immunoglobulin gene rearrangements in biopsy specimens obtained by fine needle aspiration. *J Clin Oncol* 1986; **4**: 278–283.
- [19] HYDER DM, BEALS TF, SCHNITZER B. Leu-M1-positive small cell carcinoma. *Hum Pathol* 1986; **17**: 314–316.
- [20] KORSMEYER SJ. Antigen receptor genes as molecular markers of lymphoid neoplasms. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1291–1295.
- [21] KORSMEYER SJ, HIETER PA, RAVETCH JV, POPLACK DG, WALDMANN TA, LEDER P. Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7096–7100.
- [22] LEE M-S, CHANG K-S, CABANILLAS F, FREIREICH EJ, TRUJILLO JM, STASS SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14; 18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987; **237**: 175–178.
- [23] LINDEN MD, FISHLEDER AJ, KATZIN WE, TUBBS RR. Absence of B-cell or T-cell clonal expansion in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 1988; **19**: 591–594.
- [24] LOH EY, ELLIOTT JF, CWIRLA S, LANIER LL, DAVIS MH. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T-cell receptor chain. *Science* 1989; **243**: 217–220.
- [25] LUBIŃSKI J, CHOSIA M, KOTAŃSKA K, HUEBNER K. Genotypic analysis of DNA isolated from fine needle aspiration biopsies. *Analyt Quant Cytol Histol* 1988; **10**: 383–390.

- [26] LUBIŃSKI J, CHOSIA M, HUEBNER K. Molecular genetic analysis in the diagnosis of lymphoma in fine needle aspiration biopsies. I. Lymphomas versus benign lymphoproliferative disorders. *Analyt Quant Cytol Histol* 1988; **10**: 391–398.
- [27] LUBIŃSKI J, CHOSIA M, HUEBNER K. Molecular genetic analysis in the diagnosis of lymphoma in fine needle aspiration biopsies. II. Lymphomas versus non-lymphoid malignant tumors. *Analyt Quant Cytol Histol* 1988; **10**: 399–404.
- [28] LUBIŃSKI J, PTASZYŃSKI K, TSUJIMOTO Y, HUEBNER K, CROCE CM. Germ line configuration of BCL-2 in hyper-plastic lymph nodes. *Hum Pathol* (submitted) 1990.
- [29] MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROOK J. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982.
- [30] McDONNELL JH, BESCHORNER WE, KUHAJOLA FP, DeMENT SH. Common leukocyte antigen staining of a primitive sarcoma. *Cancer* 1987; **59**: 1438–1441.
- [31] MINDEN MD, MAK TW. The structure of the T cell antigen receptor genes on normal and malignant T cells. *Blood* 1986; **68**: 327–336.
- [32] O'CONNOR NTJ. Genotypic analysis of lymph node biopsies. *J Pathol* 1987; **151**: 185–190.
- [33] O'CONNOR NTJ, GATHER KC, WAINSCOT JS, CRICK J, JONES DB, DELSOL G, RALFKIAER E, De WOLF-PEETERS C, ANGUS B, MASON DY. Practical value of genotypic analysis for diagnosing lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 1987; **40**: 147–150.
- [34] O'CONNOR NTJ, STEIN H, GATTER KC, WAINSCOT JS, CRICK J, AL SAATI T, FALINI B, DELSOL G, MASON DY. Genotypic analysis of large cell lymphomas which express the Ki 1 antigen. *Histopathology* 1987; **11**: 733–738.
- [35] PTASZYŃSKI K, PODOLSKI J, HUEBNER K, LUBIŃSKI J. Gene rearrangements detected by non-radioactive digoxigenin labeled DNA probes. *Analyt Quant Cytol Histol* 1990 – submitted.
- [36] ROTH MS, SCHNITZER B, BONGHAM EL, HARNDEN CE, HYDER D, GINSBURG D. Rearrangement of immunoglobulin and T-cell receptor genes in Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1988; **131**: 331–338.
- [37] SEIBEL NL, FUNA K, DMITROVSKY E, FOSS F, HOLLIS GF, KIRSCH IR. Application of RNA-RNA tissue in situ hybridization in an analysis of a patient with leukemia. *Hum Pathol* 1987; **18**: 3–8.
- [38] SHEIBANK K, WU A, BEN-EZRA J, STROUP R, RAPPAPORT H, WINBERG C. Rearrangement of Kappa-chain and T-cell receptor beta-chain genes in malignant lymphomas of T-cell phenotype. *Am J Pathol* 1987; **129**: 201–207.
- [39] STETLER-STEVENSON M, RAFFELD M, COHEN P, COSSMAN J. Detection of occult follicular lymphomas by specific DNA amplification. *Blood* 1988; **72**: 1822–1825.
- [40] STETLER-STEVENSON M, CRUSH-STAUTON S, COSSMAN J. Involvement of the *bcl-2* gene in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 855–858.
- [41] SUNDEEN J, LIPFORD E, UPPENKAMP M, SUSSMAN E, WAHL L, RAFFELD M, COSMANN J. Rearranged antigen receptor genes in Hodgkin's disease. *Blood* 1987; **70**: 96–103.
- [42] TONEGAWA S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; **302**: 575–581.
- [43] VOSBERG H-P. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet* 1989; **83**: 1–15.
- [44] WEISS LM, STRICKLER JG, HU E, WARNKE RA, SKLAR J. Immunoglobulin gene rearrangements in Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 1986; **17**: 1009–1014.

Otrzymano: 30 października 1990 r.

Przyjęto: 10 listopada 1990 r.

Adres autorów: ul. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin

SYSTEM TLENOWEGO ZABIJANIA MIKROORGANIZMÓW PRZEZ NEUTROFILE

OXYGEN-DEPENDENT MICROBICIDAL SYSTEM OF NEUTROPHILS

Jerzy KANTORSKI, Krzysztof ZEMAN

Zakład Patofizjologii i Immunologii INP WAM

Streszczenie. Neutrofile wyposażone są w złożony system tlenowego zabijania pozwalający tym komórkom brać czynny udział w nieswoistej ochronie organizmu przed zakażeniem. Zabijanie i trawienie wchłoniętego materiału wymaga degranulacji i aktywacji wybuchu oddechowego. W tym procesie komórka wytwarza toksyczne związki tlenowe, mające właściwości bakteriobójcze, przez częściową redukcję cząsteczki tlenu. Aktywacja neutrofila następuje przez kontakt komórki z fagocytowanymi cząsteczkami. W tym artykule opisano mechanizm tlenowo-zależnego systemu bakteriobójczego neutrofilii oraz jego znaczenie.

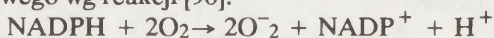
Summary. Neutrophils possess potent oxidative-dependent system providing an array of primary and auxiliary weapons to secure the immunologic defence of the host. Bacterial killing and digestion of engulfed material require degranulation as well as the activation of the respiratory burst. The respiratory burst leads to the formation of potent bacterial oxidants through the partial reduction of oxygen and is activated primarily by contact with ingestible particles. This article focuses on mechanisms and importance of O₂-dependent antimicrobial activities of neutrophils.

WSTĘP

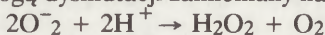
Neutrofile odgrywają jedną z głównych ról w odporności nieswoistej organizmu. Te najważniejsze wśród profesjonalnych fagocytów komórki jako pierwsze zjawiają się w miejscach procesów zapalnych. Jest to możliwe dzięki istnieniu na ich powierzchni wysoce wyspecjalizowanych receptorów, które rozpoznają niezwykle niskie stężenia substancji chemotaktycznych powstających w miejscu procesu zapalnego. Zadaniem neutrofilii jest odnalezienie tych miejsc, rozpoznanie i wchłonięcie intruza oraz o ile to możliwe – zabicie i strawienie go. W tym celu zostały one wyposażone w dwa systemy zabijania wewnątrzkomórkowego: zależny od tlenu i tzw. tlenowo-niezależny. Niniejszy artykuł jest próbą całościowego ujęcia molekularnych podstaw mechanizmów odpowiedzialnych za prawi-

dłowo funkcjonujący system zabijania drobnoustrojów drogą zależną od przemian tlenowych. Postępy w tej dziedzinie są możliwe m.in. dzięki badaniom pacjentów chorych na przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD), których neutrofile nie mają możliwości uruchomienia swoich mechanizmów zabijania tlenowego. Po połączeniu się czynnika zdolnego wywołać aktywację neutrofila (czynniki chemotaktyczne, niektóre cytokiny, składowe dopełniacza itp.) [24, 44, 58, 64, 108] ze specyficznym dla nich receptorem zostaje uruchomiona kaskada reakcji biochemicznych zachodzących w komórce pozwalająca na przekazanie informacji do odpowiednich molekuł efektorowych. Proces ten w uproszczeniu przebiega w sposób następujący: sygnał z receptora przenoszony jest poprzez białko wiążące GTP, które po dysocjacji na podjednostki α , β i γ , aktywuje fosfolipazę C. Enzym ten katalizuje reakcje rozpadu błonowego fosfatydyloinozytolu do diacylglicerolu (DG) i 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP₃) [20, 26, 39, 46, 57]. IP₃ powoduje mobilizację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia zawartych w kalciosomach [51]. DG w obecności jonów wapnia aktywuje kinazę białkową C (PKC) [15, 16], która następnie fosforyluje białka enzymatyczne zapoczątkowując chemotaksję, adherencję, diapedezę oraz fagocytozę i procesy wewnątrzkomórkowego zabijania.

Wkrótce po aktywacji obserwuje się drastyczne zwiększenie zapotrzebowania komórki na tlen. Proces ten nie jest hamowany przez cyjanki i azydki wskazując na udział w nim pozamitochondrialnej frakcji komórki [17]. Otrzymał on nazwę **wybuchu oddechowego** (*respiratory burst*). W przeciągu kilkunastu sekund neutrofil rozpoczyna uwalnianie dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego (O₂⁻) i nadtlenku wodoru (H₂O₂) do środowiska. W tym samym czasie komórka utlenia duże ilości glukozy poprzez szlak pentozowy. Głównym enzymem odpowiedzialnym za powstanie tego zjawiska jest oksydaza NADPH. Katalizuje ona jednoelektronową redukcję cząsteczki tlenu do anionorodnika ponadtlenkowego wg reakcji [96]:



Rodnik ten jest prekursorem innych aktywnych postaci tlenu (H₂O₂, OH⁻, ¹O₂, OCl⁻) wykorzystywanych przez komórkę do zabijania drobnoustrojów. W większości O₂⁻ jest drogą dysmutacji zamieniany na H₂O₂:



Aktywność komórki, wyrażająca się wzrostem konsumpcji tlenu i powstawaniem jego aktywnych postaci, powoduje tworzenie czynników bakteriobójczych.

W dalszej części artykułu zostaną omówione mechanizmy aktywacji i właściwości oksydazy NADPH, mieloperoksydazy, toksycznych związków tlenu oraz ich wzajemne powiązania w systemach, w których działają.

OKSYDAZA NADPH

Badania pacjentów, u których stwierdzono przewlekłą chorobę ziarniniakową (CGD – *chronic granulomatous disease*), dostarczyły dowodów, że oksydaza NADPH nie może być jednocząsteczkowym enzymem, lecz jest układem cząsteczek przenoszących elektron z cytozolu poprzez błonę komórkową lub błonę ziarnistości specyficznych na tlen [75, 84]. Trzeba podkreślić, że do tej pory nie udało się nikomu wyizolować lub odtworzyć kompletnego i w pełni aktywnego kompleksu oksydazy. Z tego względu możemy obecnie mówić

tylko o jego hipotetycznej budowie. Zdecydowana większość badaczy, zajmujących się tym problemem, jest zgodna, że w jego skład wchodzi: flawoproteina związana z dinukleotydem flawinoadeninowym (FAD), cytochrom b₂₄₅, nieokreślone jeszcze bliżej czynniki cytozolowe i być może białko wiążące NADPH [49, 52, 53, 84, 94].

NADPH

Uważa się, że donorem elektronów do redukcji tlenu jest zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH) powstający w bocznym szlaku cyklu przemian monofosforanu heksozy (cykl pentozowy). Jest to bardzo wydajna reakcja, w której utlenienie jednej cząsteczki glukozy daje 12 cząsteczek NADPH [95]. Świadczy o tym zaobserwowana aktywacja cyklu pentozowego w pobudzonych neutrofilach i zwiększony metabolizm glukozy (2, 76, 88, 110), a także większe powinowactwo systemu transferu elektronów do NADPH ($K_m \approx 30 \mu\text{M}$) niż do NADH ($K_m \approx 2 \text{mM}$) [27, 47]. Nie ma pełnej zgodności przy odpowiedzi na pytanie, czy NADPH jest przyłączany do oddzielnego białka, czy też wiąże się bezpośrednio z flawoproteina. Sha'ag i wsp. [91] opisali takie białko i ocenili jego masę na $M_r = 100 \text{kDa}$. Natomiast Umei i wsp. [100] ocenili masę białka wiążącego NADPH na 65 kDa, co jest zgodne z oceną masy flawoproteiny dokonanej przez Kakinuma i wsp. [47] na $M_r = 67 \text{kDa}$, co raczej przemawia za bezpośrednim wiązaniem NADPH do flawoproteiny.

FLAWOPROTEINA

W preparatach wykazujących aktywność oksydazy NADPH stwierdzono obecność flawoproteiny zawierającej wyłącznie FAD [48]. Cząsteczka ta była oczyszczana razem z cytochromem b₂₄₅. Borregaard i Tauber [10] stwierdzili, że flawoproteiny są rozmieszczone w neutrofilach w trzech obszarach: ok. 50% znajduje się w ziarnistościach specyficznych, 30% w błonie komórkowej i 20% w cytozolu. Ponadto wykazali, że flawoproteina błonowa i cytozolowa różni się od formy umiejscowionej w ziarnistościach. Określili oni także stosunek molowy cyt_b/FAD w ziarnistościach wtórnych na 2 : 1. Autorzy uważają, że podczas aktywacji związana z cytochromem b₂₄₅ flawoproteina jest przemieszczana do błony komórkowej w miejsce, gdzie jest zlokalizowana oksydaza NADPH. Inne wyniki uzyskał Clark i wsp. [17] wykazując, że w niestymulowanych ludzkich granulocytach 70–75% FAD znajduje się w ziarnistościach specyficznych, a 25% we frakcji błonowej. Kakinuma i wsp. [48] posługując się techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) również zaobserwowali w stymulowanych komórkach obecność związanej z błoną flawoproteiny, która reaguje z NADPH do formy jej obojętnego semichinonu. Bellavite i wsp. [8, 9] badając częściowo oczyszczone preparaty oksydazy określili stosunek molowy cyt_b/FAD na ok. 19 : 1. Kakinuma i wsp. [47] wyizolowali enzym zawierający FAD z błon komórkowych aktywowanych neutrofilów świnki morskiej określając, że zawiera 1.1–1.9 nmol FAD/mg białka oraz że jego masa cząsteczkowa wynosi 67 kDa. Ci sami badacze zmierzili potencjał redoks flawoproteiny (*mid-point potencial*), tj. potencjał, przy którym $[F_1^+] = [F_{IH}]$, i określili jego wartość $E_{m7} = -280 \text{mV}$.

CYTOCHROM b_{245}

Cytochrom b jest obecnie najlepiej poznanym składnikiem oksydazy. O jego istnieniu doniósł w 1978 r. Segal [85]. Okazało się, że jest on obecny tylko w komórkach fagocytujących. U sześciu pacjentów z CGD autor stwierdził albo brak, albo poważne odstępstwa w charakterystycznym widmie absorpcyjnym tego cytochromu. Dalsze prace skupiły się na dokładnym scharakteryzowaniu tej cząsteczki oraz określeniu jej roli w kompleksie oksydazy NADPH. Cytochrom b_{588} (nazwany tak ze względu na długość fali charakterystycznego pasma w widmie absorpcyjnym) nazywany również cytochromem b_{245} okazał się heterodimerem składającym się z dwóch łańcuchów polipeptydowych: lekkiego α i ciężkiego β [72]. Masa łańcucha α wynosi 23 kDa [97] lub 22 kDa [72, 30, 86, 73], natomiast łańcucha β 76–92 kDa [97], 92 kDa [86], 90 kDa [30], 91 kDa [73]. Składnik β jest silnie glikolizowany z polipeptydowym jądrem o $M_r \approx 50$ kDa [73]. Dokonano klonowania genu dla polipeptydu podjednostki β . Gen ten koduje polipeptyd o $M_r \approx 54$ kDa, w którym stwierdzono cztery potencjalne miejsca glikolizacji w N-końcowej części łańcucha. Otrzymano także jeden region hydrofobowy, w którym być może zlokalizowany jest segment transbłonowy. Wydaje się, że funkcjonalnie ważnym obszarem jest C-końcowa część, z której utrata 50 aminokwasów powoduje wystąpienie klinicznych objawów CGD (co wykryto u jednego pacjenta). Gen dla tej podjednostki znajduje się na chromosomie Xp21.1 [78]. Przypuszcza się, że gen dla podjednostki α znajduje się na chromosomie autosomalnym [31]. Teahan i wsp. [97] oczyścili łańcuch β cytochromu i określili sekwencję 43 N-końcowych aminokwasów. Stwierdzili prawie całkowitą homologię pomiędzy tą sekwencją a komplementarnymi nukleotydami 19–147 sekwencji genu X-CGD, początkowo uważanego za obszar niekodujący. Ponadto sekwencja aminokwasowa nie wykazuje homologii z jakimkolwiek innym cytochromem b . Dinauer i wsp. [30] podali, że przeciwiało otrzymane przeciwko syntetycznemu cDNA pochodnemu polipeptydowi o $M_r = 90$ kDa rozpoznaje cięższy składnik oczyszczonego cytochromu b . Przytoczone powyżej dane wskazują, że rzeczywiście w skład oksydazy NADPH wchodzi unikalny cytochrom b . Ze struktury łańcucha β wynika, że raczej nie ma w nim miejsca wiążącego hem. Parkos i wsp. [73] sugerują, że łańcuch α (22 kDa) może być związany z hemem. Jest też możliwe, że hem łączy się jednocześnie z dwiema podjednostkami cytochromu. Wiadomo, że obie podjednostki nawzajem się regulują. Gen dla łańcucha α występuje w wielu różnych komórkach niefagocytujących, ale do jego ekspresji dochodzi tylko w komórkach mających sprawny gen dla segmentu β . Stwierdzono u pacjentów z CGD przy defekcie genu Xp21.1 brak również łańcucha α . Wydaje się, że podobna zależność zachodzi i w drugą stronę, tzn. wada w kodowaniu części α powoduje brak części β mimo prawidłowego genu. Potwierdzają to przypadki tzw. autosomalnej CGD z brakiem cytochromu [31]. Nie wiadomo do tej pory, jaki jest typ wiązania pomiędzy podjednostkami, ale nie wydaje się, aby było to wiązanie disulfidowe [73].

Neutrofilowy cytochrom b , odkryty przez Segala, ma najniższy wśród organizmów eukariotycznych potencjał redoks (*mid-point*) wynoszący $E_{m7} = -245$ mV [42, 75, 87] i dlatego pretenduje do końcowego elementu łańcucha przenoszenia elektronu na tlen. Potencjał ten nie ulega zmianie po aktywacji komórki. Edwards i wsp. [32] zaobserwowali wzrost szybkości utleniania cytochromu b i jego powinowactwa do tworzenia O_2^- w

zależności od prężności tlenu. Stwierdzili także, że wielkości te dla danej prężności tlenu są większe w komórce aktywowanej niż spoczynkowej.

Badania nad rozmieszczeniem cytochromu b_{245} w neutrofile wykazały, że jego dystrybucja jest identyczna jak flawoproteiny i że jest on integralnym białkiem błonowym [8,10,17].

CZYNNIKI CYTOZOLOWE

Oprócz najczęściej występującej odmiany CGD charakteryzującej się brakiem cytochromu b_{245} rozpoznano też typ tej choroby związany z chromosomem autosomalnym, w której cytochrom b_{245} jest obecny [31, 87]. Dzięki badaniom poszczególnych frakcji komórkowych stwierdzono, że czynnik odpowiedzialny za brak generowania O_2^- występuje w cytozolu. Hayakawa i wsp. [40] badając komórki od pacjentów z CGD zauważyli, że grupa białek o masie $M_r \approx 48$ kDa nie ulega fosforylacji po aktywacji komórki, jak ma to miejsce w komórkach od zdrowych dawców. Ponadto, przeprowadzając doświadczenia w atmosferze azotu wykluczyli, że fosforylacja jest wtórnym efektem spowodowanym przez oksydanty produkowane przez komórkę w wybuchu oddechowym. Badania te rozwinął dalej Okamura i wsp. [70] obserwując zmiany fosforylacji tej grupy białek w funkcji czasu po stymulacji przez ester forbolu (PMA). Zauważyli oni ścisły związek pomiędzy stopniem fosforylacji i defosforylacji a szybkością i wielkością produkcji O_2^- . Podobna zależność wystąpiła w funkcji stężenia PMA użytego do stymulacji. Ohtsuka i wsp. [69], którzy wykonując podobne doświadczenia na neutrofilach świnek morskich wykorzystali jako stymulatory Con A, chemotaktyczny peptyd (FMLP) oraz PMA, zaobserwowali efekty analogiczne do cytowanych powyżej w odniesieniu do fosforylacji i defosforylacji białka o $M_r = 46$ kDa. Volpp i wsp. [104, 105] postulują istnienie dwóch niezależnych czynników o masach 47 kDa i 67 kDa, natomiast Nunoi i wsp. [68] trzech takich białek, nazwanych przez nich NCF-1 o $M_r = 47$ kDa, NCF-2 o $M_r = 65$ kDa i NCF-3 o $M_r > 5$ kDa. Białko o masie 47 kDa jest nieobecne prawie we wszystkich autosomalnych, cytochromowo b dodatnich, recesywnych i dominujących CGD. Czynnik 65 kDa okazał się źle funkcjonującym u jednego pacjenta. Nie stwierdzono w tych badaniach żadnego pacjenta z brakiem NCF-3.

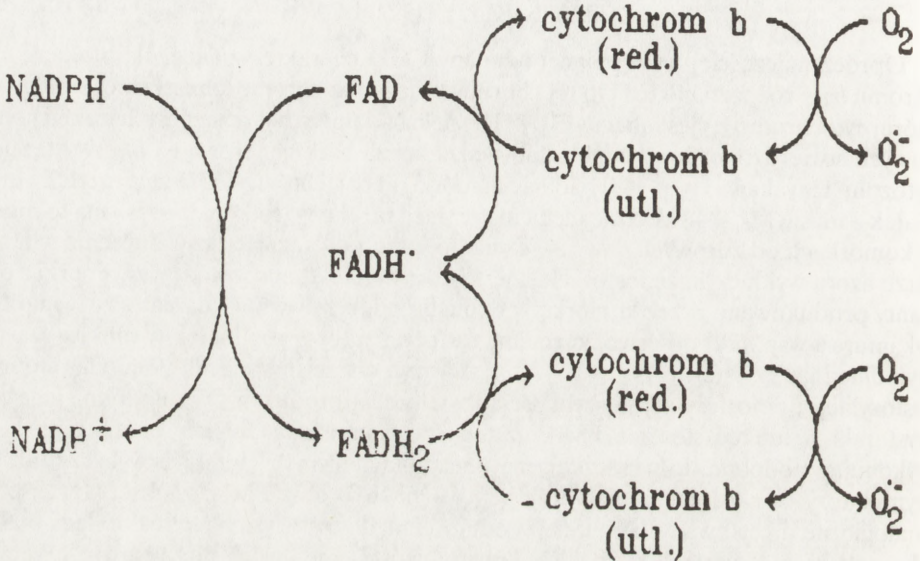
Oprócz omówionych wyżej, najczęściej opisywanych białek donoszono także o istnieniu innych. Clark i wsp. [17] wyizolowali czynnik cytozolowy o masie 10 kDa. Curnutte i wsp. [28], badając frakcje komórkowe, donieśli o istnieniu dużej formy o $M_r = 250$ kDa sugerując, że składa się ona z podjednostek, z których jedna może mieć $M_r = 40$ kDa. Wykazali także, że nie jest to PKC ani żadna inna kinaza. Gant i Corchman [36], prowadząc badania nad zróżnicowanymi w kierunku granulocytów komórkami linii HL-60, zaproponowali, że w pośredniczeniu aktywowanej przez PMA produkcji O_2^- mogą grać rolę białka o masach 212 kDa, 134 kDa i 76 kDa.

Chociaż brak jeszcze ostatecznych ustaleń co do ilości i mas molowych czynników cytozolowych, wydaje się, że ich udział w aktywacji i/lub regulacji oksydazy NADPH jest dobrze udokumentowany.

Niektórzy badacze [49, 96] wysuwali przypuszczenia, że w skład oksydazy może wchodzić ubiquinon, ale inne prace [8, 25] raczej wykluczają tę możliwość.

HIPOTETYCZNY MODEL OKSYDAZY NADPH

Na podstawie swoich badań Borregaard i Tauber [10] zaproponowali model pokazany na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat przenoszenia elektronów w oksydazie NADPH

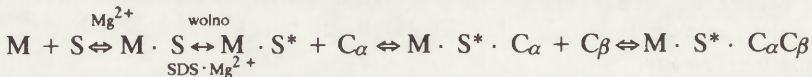
Podstawą tego modelu jest znaleziony przez nich stosunek molowy FAD/cyt $b = 1 : 2$.

Natomiast cytowany wcześniej wynik Bellavite i wsp. [8] wykazujący, że stosunek FAD/cyt $b = 1 : 19$, zmusza do przyjęcia innego modelu, w którym cząsteczka flawoproteiny otoczona jest dużą liczbą (20 lub więcej) cząsteczek cytochromu b_{245} . Taki układ funkcjonuje pomiędzy cytochromem P-450 i jego reduktazą.

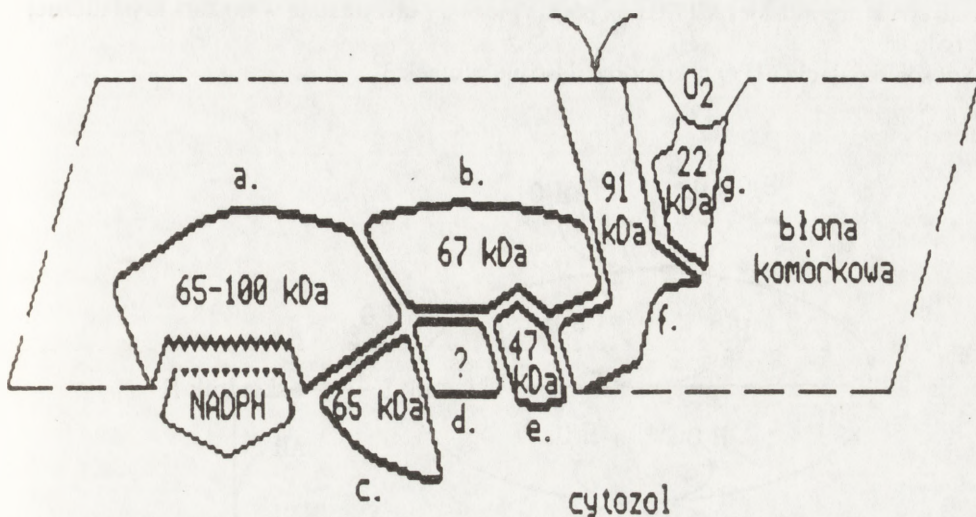
W wyniku badań kinetycznych aktywacji wybuchu oddechowego w rozpuszczonych detergentem ludzkich neutrofilach Babior, Curnutte i wsp. [4, 29] stwierdzili:

1. Oksydaza NADPH istnieje w dwóch stanach o różnym powinowactwie do NADPH. W stanie niskiego powinowactwa zawiera ona składnik błonowy (M) oraz dwa składniki cytozolowe (S i C_{α}). Przy przejściu do stanu o wysokim powinowactwie do istniejącego kompleksu dołącza się trzeci składnik cytozolowy (C_{β}).

2. Aktywne formy oksydazy są generowane w następujących reakcjach:



Pick i wsp. [74] na podstawie swoich badań zasugerowali, że w skład oksydazy NADPH może wchodzić związany z błoną komórkową składnik o $M_r \approx 11-28$ kDa.



Rys. 2. Model budowy oksydazy NADPH: a – białko wiążące NADPH, b – flawoproteina FAD, c,d,e – czynniki cytozolowe, f,g – cytochrom b_{245}

Wiadomości podane w naszej pracy sugerują, że oksydaza ma budowę zbliżoną do modelu pokazanego na rysunku 2.

Za kolejnością głównych składników w oksydazie przemawiają potencjały redoks (*mid-point*) poszczególnych części.

NADPH/NADP ⁺	-320 mV	[75]
FADH ₂ /FAD	-280 mV	[48]
cyt b_{red} /cyt b_{ox}	-245 mV	[42]
O ₂ /O ₂	-160 mV	[109]

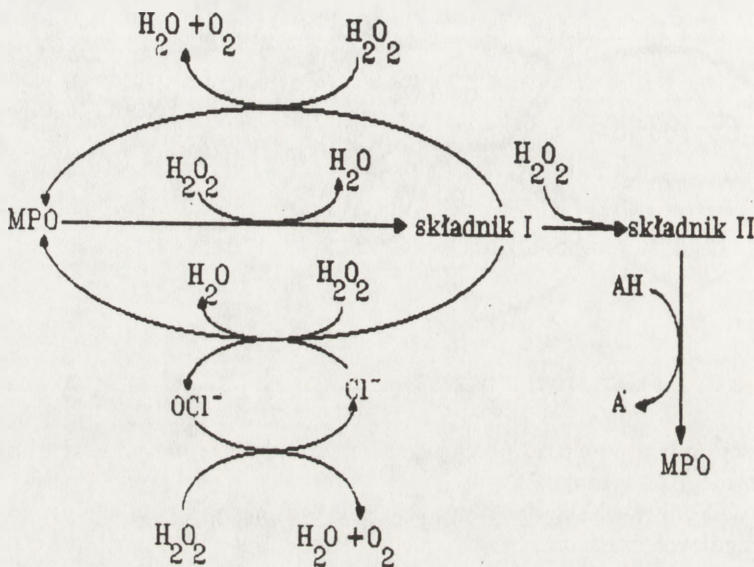
Taka kolejność składników spełnia warunki fizyczne, aby elektron mógł wędrować w kierunku rosnącego potencjału.

SYSTEM MIELOPEROKSYDAZA/H₂O₂/HALOGENEK

Mieloperoksydaza (MPO) (oksydoreduktaza donora: H₂O₂; EC 1.11.1.7) jest lizosomalną hemoproteiną obecną u ludzi w ziarnistościach azurofilnych neutrofilów i monocytów i różniącą się od peroksydazy w eozynofilach. Enzym ten daje charakterystyczny zielony kolor treści ropnej. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej ok. 153 kDa, złożona z dwóch podjednostek ciężkich (α) i dwóch lekkich (β), zawierająca dwie grupy prostetyczne podobne do hemu [56, 66]. Znalaziono trzy odmiany MPO o masach 153 kDa, 155 kDa i 152 kDa, różniące się masą podjednostki α , (odpowiednio 59 kDa, 59,5 kDa i 57 kDa). Masa podjednostki β wynosi ok. 16 kDa [65] lub 13,5 kDa [66]. Mimo tych różnic nie stwierdza się zmian funkcjonalnych odmian enzymu. Nie ustalono, czy są to izoenzymy MPO, czy też niewielkie artefakty powstałe w trakcie izolowania cząsteczki. Morita i wsp.

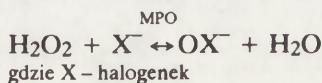
opisali strukturę ludzkiej MPO oraz po raz pierwszy otrzymali ją w postaci krystalicznej [45, 65].

Sposób działania MPO w komórce ilustruje rysunek 3.



Rys. 3. Schemat działania mieloperoksydazy

MPO katalizuje reakcję utleniania halogenków do kwasu podhalogenkowego równocześnie rozkładając nadtlenek wodoru wg reakcji [5]:



W komórce, z halogenków, najłatwiej dostępne są jony chlorkowe (80 meq/l wody komórkowej) [49, 93] i z tego powodu praktyczne znaczenie ma jedynie kwas podchloryny (HOCl). HOCl jest silnym utleniaczem wielu związków chemicznych m.in. grup tiolowych (-SH) białek, porfiryn, nukleodów, β karotenu [1]. Uważa się, że w bakteriach HOCl atakuje kompleksy żelazowo-siarkowe białek wchodzących w skład układu transportu elektronów łańcucha oddechowego i blokując w ten sposób szlak energetyczny doprowadza do jej śmierci [77]. Oprócz działania bezpośredniego, HOCl jako bardzo reaktywna cząsteczka, reaguje z grupami aminowymi białek [37,96]:



W ten sposób 30–50% obecnego w komórce HOCl tworzy =N-Cl pochodne białek lub fragmentów białek, z następującym szybkim rozrywaniem wiązań peptydowych lub utlenianiem innych składników bakteryjnych [37, 96, 98]. Wytwarzana w komórce chloramina

(NH₂Cl) jest substancją lipofilową i wykazuje bardziej toksyczne działanie niż HOCl. Powstaje ona w reakcji z jonami amonowymi wg równania [37]:



Wykazano, że lipofilowe N-chloraminy utleniają złożone białka poprzez atak na reszty metionylowe w hydrofobowych obszarach polipeptydów [38]. Jest to proces zachodzący na dużą skalę, bowiem obserwowano w białkach zewnątrzkomórkowych inkubowanych z aktywowanymi neutrofilami utlenianie aż 66–75% metioniny w zależności od typu stymulacji [7]. Za to zjawisko odpowiada system MPO/H₂O₂/Cl⁻.

HOCl może również uczestniczyć w aktywowaniu enzymów lizosomalnych uwalnianych przez neutrofile. Wykazano to na przykładzie aktywacji kolagenazy przez katepsynę G przy udziale kwasu podchlorawego [12, 13].

Należy także wspomnieć o roli jodu w opisywanym systemie mikrobójczym. Jest on nawet bardziej efektywny niż chlor. Stwierdzono, że transferryna i apotransferryna ekspozowane na MPO/H₂O₂/I traciły zdolność do wiązania żelaza, a zjawisku temu towarzyszyło jednoczesne jodowanie tyrozyny leżącej w pobliżu miejsc wiążących żelazo. Chlor w tym układzie był mało aktywny. Identyczne wyniki uzyskano w układzie z neutrofilami [18].

Uwolnione jony żelazawe (Fe²⁺) mogą katalizować rozkład H₂O₂ w reakcji, w której powstaje wysoce szkodliwy rodnik hydroksylowy (OH[•]). Być może proces jodowania zachodzi również w innych strukturach bakterii, blokując ich funkcje [89, 90]. Stwierdzono także, że jony żelazawe biorą udział w procesie peroksydacji lipidów uszkadzając błony komórkowe [3].

Sepe i Clark [89] przebadali wpływ układu MPO/H₂O₂/halogenek na sztuczny lizosom. Przy kompletnym systemie stwierdzono liżę 50–75% liposomów, a jod, brom i tiocyjanian okazały się być ok. 10 razy bardziej efektywne niż chlor. Stosując znakowany jod badacze znaleźli ścisłą korelację pomiędzy halogenacją liposomów a ich liżą. Efekt ten mógł być znacznie ograniczony przez zastosowanie antyoksydantów (α-tokoferol, β-karoten) [90].

Ważność układu MPO potwierdza doniesienie Edwardsa [33] o pacjencie z nieprawidłową aktywnością bakteriobójczą spowodowaną zbyt wczesną egzocytozą MPO. Potwierdzają to także przypadki z dziedzicznym lub nabytym niedoborem MPO [66]. Objawy kliniczne tego defektu ujawniają się rzadko, co wskazuje na istnienie innych mechanizmów mikrobójczych. Jednym z nich jest ujemne sprzężenie zwrotne pomiędzy czasem trwania wybuchu oddechowego a MPO. Zaobserwowano, że w przypadku braku tej peroksydazy wybuch oddechowy jest znacznie przedłużony. Wytwarzając większą liczbę O₂⁻ i pochodnych aktywnych postaci tlenu, komórka jakby kompensuje brak HOCl [34]. Innym dowodem na istnienie mechanizmów kompensacyjnych jest fakt, że system MPO inaktywuje prawie wszystkie enzymy lizosomalne, przez co ogranicza czas ich działania. Przy braku MPO lub wybuchu oddechowego enzymy te działają znacznie dłużej [103]. Omówienie innych alternatywnych pozatlenowych systemów zabijania wewnątrzkomórkowego opisano w drugiej części pracy o zabijaniu beztlenowym.

Zademonstrowano, że system MPO/H₂O₂/halogenek powoduje zubożenie toksyn bakteryjnych, np. toksyny błonicy, cytotoksyny *Clostridium difficile* [71] i pneumolizyny *Streptococcus pneumoniae* [19]. Jest on również zabójczy [49] dla komórek nowotworowych.

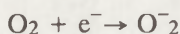
System MPO moduluje wiele aspektów odpowiedzi zapalnej. Powoduje m.in. zmniejszenie fagocytozy cząsteczek zopsonizowanych przez IgG i C3b oraz inaktywację czynników chemotaktycznych [49]. Doniesiono również o efekcie immunosupresyjnym omawianego systemu na limfocyty [35]. Zaproponowano też, że MPO może funkcjonować jako zmiatacz rodnika hydroksylowego (OH^\cdot) [102].

U osób z niedoborem MPO występują defekty zabijania mikroorganizmów z grupy *Candida*. Częstym objawem klinicznym są nawracające, odporne na leczenie grzybicze infekcje skórne lokalizujące się szczególnie w okolicach krocza.

Z tego krótkiego przeglądu wynika, że HOCl i reaktywne chloraminy są prawdopodobnie najważniejszymi bakterioobójczymi utleniaczami generowanymi przez neutrofile. Reaktywne rodniki tlenowe wydają się stanowić system, który dominuje dopiero przy nieprawidłowo funkcjonującym systemie MPO/ H_2O_2 /halogenek.

ANIONORODNIK PONADTLENKOWY

Bezpośrednim produktem wybuchu oddechowego jest O_2^- . Jak już wspomniano, powstaje on w wyniku przyjęcia przez O_2 jednego elektronu:



Rodnik ponadtlenkowy jest w równowadze z uprotonowaną formą, rodnikiem nadhydroksylowym (HO_2^\cdot)



Stała pK tej reakcji wynosi 4,88 [49, 54]. Tak więc, w obojętnym pH, istnieje prawie wyłącznie forma O_2^- . Z punktu widzenia chemicznego rodnik ten może być reduktorem (redukuje cyt. c) [21] albo utleniaczem (utlenianie adrenaliny do adrenochromu) [63].

W środowisku komórkowym O_2^- może podlegać zarówno spontanicznej, jak i katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (EC 1.15.1.1) (SOD) reakcji dysmutacji:



Maksymalna spontaniczna dysmutacja zachodzi przy $\text{pH} = 4,8$, a stała szybkości tej reakcji wynosi $8,5 \times 10^7 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ zbliżając się do wartości uzyskiwanej w reakcji enzymatycznej ($1,9 \times 10^9 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). W neutralnym pH spontaniczna dysmutacja nie odgrywa żadnej roli, ale może być źródłem H_2O_2 wewnątrz fagosomów. Nie stwierdzono bowiem uwalniania SOD do ich wnętrza, a jednocześnie wykazano istnienie niskiego pH w tych strukturach [49].

Uważa się, że O_2^- sam nie jest zbyt toksyczny dla komórek, a raczej jest substratem wyjściowym do tworzenia bardziej toksycznych związków [54, 99, 106]. Jednak fakt, że SOD częściowo blokuje pewne uszkodzenia komórek indukowane przez pobudzone granulocyty (np. uszkodzenia DNA w młodych komórkach nowotworowych [50, 92]), nie pozwala wykluczyć bezpośredniej roli O_2^- w zabijaniu wewnątrz- i/lub zewnątrzkomórkowym.

NADTLENEK WODORU

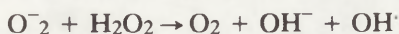
Nadtlenek wodoru jest wytwarzany w dużych ilościach przez zastymulowane fagocyty, głównie w reakcji dysmutacji. Ponieważ w stosunku do innych pochodnych tlenu jest mało reaktywny, może dzięki temu dyfundować poprzez struktury komórkowe do obszarów odległych od miejsca swego powstania. Umożliwia to tej cząsteczce wywoływanie toksycznego efektu tam, gdzie bardziej reaktywne związki nie mają szans dotrzeć, ponieważ są usuwane przez liczne zmiatacze. Na ogół atakowane komórki są dobrze chronione przed H_2O_2 i dlatego uważa się, że (podobnie jak O_2^-) nie jest to silny czynnik zabijający. Istnieją jednak pewne dowody wskazujące na udział H_2O_2 w zabijaniu obcych komórek. Schraufstatter i wsp. [43, 82, 83] wykazali, że poddane działaniu H_2O_2 komórki linii nowotworowej P388D1 ulegały lizie. Podanie katalazy chroniło przed lizą, ale tylko wtedy, gdy uczyniono to w ciągu pierwszych 40–60 minut po ekspozycji na H_2O_2 . Wskazuje to na fakt, że wczesne zmiany metaboliczne określają dalszy los komórki. Autorzy ci wykazali także, że już w ciągu sekund po dodaniu H_2O_2 do zawiesiny komórek linii P388D1 następowało przyśpieszenie przemian w cyklu pentozowym, wskazując na wzrost szybkości cyklu redoks glutationu. Ponadto, w ciągu 30 s zaobserwowano rozrywanie łańcucha DNA. W późniejszym czasie następowały zmiany w morfologii komórek oraz spadek puli wewnątrzkomórkowego ATP spowodowany zakłóceniem fosforylacji ADP.

Bass i wsp. [6] wykazali, że H_2O_2 jest odpowiedzialny za zabijanie nowonarodzonych larw *Trichinella spiralis* przez ludzkie neutrofile i eozynofile.

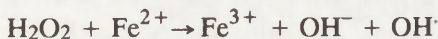
Działanie H_2O_2 może być nasilone w obecności neutralnych proteaz serynowych obecnych w błonie komórkowej neutrofilu. Powszechnie uważa się jednak, że główna rola nadtlenu wodoru w układzie degradacji antygeny przez neutrofil to udział w systemie mieloperoksydazy.

RODNIKI HYDROKSYLOWE

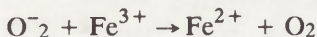
Rodniki hydroksylowe powstają w reakcji zaproponowanej przez Habera-Weissa w 1934 r.:



Wykazano jednak, że w środowisku komórkowym zachodzi ona zbyt wolno (ze względu na deficyt protonów), aby mieć praktyczne znaczenie [54]. Obecnie przyjmuje się, że rodniki OH^\cdot powstają w komórce wg reakcji Fentona katalizowanej przez jony żelazawe:



W przypadku ograniczonej liczby jonów żelazawych konieczna jest reakcja redukcji jonów żelazowych do jonów żelazawych np. wg reakcji:



Dwie ostatnie reakcje można zapisać łącznie jako przytoczoną wcześniej reakcję Ha-

bera-Weissa. Należy jednak stwierdzić, że nie jest konieczne, aby czynnikiem redukującym był O_2^- . Równie dobrze może nim być kwas askorbinowy, glutation lub cysteina [62, 81].

Nie rozstrzygnięto do tej pory zagadnienia, czy rodnik hydroksylowy jest wytwarzany w neutrofilach, czy nie (porównaj np. [48, 80] i [11]). W każdym razie istnieją ku temu warunki biochemiczne. Źródłem żelaza może być laktoferryina uwalniana do fagosomów po wchłonięciu mikroorganizmu lub transferryina pochodząca z atakowanej bakterii [18, 55, 77]. W kwaśnym środowisku fagosomu kataliza jest wydajna przy udziale swobodnych jonów żelaza, a ich uwalnianie ma miejsce w niskim pH [49]. Oprócz jonów żelazawych reakcję Fentona mogą katalizować np. jony Co^{2+} i Cu^{2+} .

Rodnik hydroksylowy uważany jest powszechnie za krańcowo silny utleniacz, który działa niewybiórczo i reaguje z pierwszą napotkaną cząsteczką. Z tego względu jego czas trwania wynosi od 100 ps do 1 ns. Pośrednim dowodem na toksyczne działanie tego związku jest fakt, że wiele szkodliwych skutków wywoływanych przez granulocyty w stosunku do otaczających tkanek jest hamowanych przez katalazę, SOD i zmiatacze OH^- . Właśnie to działanie "na ślepo" czyni z OH^- jeden ze związków najbardziej toksycznych, nie tylko dla ofiary, ale i dla samego neutrofila.

TLEN W STANIE SINGLETOWYM

Tlen w podstawowym stanie energetycznym występuje w formie trypletowej, tzn. na ostatnim orbitalu antywiążącym ma dwa niesparowane elektrony o zgodnych spinach. Po wzbudzeniu może nastąpić sparowanie elektronów (wtedy zgodnie z zakazem Pauliego spiny muszą być przeciwne) albo może nastąpić odwrócenie spinu jednego elektronu bez ich sparowania. W obydwóch przypadkach tlen przechodzi do stanu singletowego. Taki tlen ze względu na duży nadmiar posiadanej energii staje się bardzo reaktywny i toksyczny [2, 54, 59]. Jednak nie ma do tej pory dowodów, że neutrofil wytwarza tlen singletowy.

UWAGI KOŃCOWE

Zdecydowana większość toksycznych substancji produkowanych przez neutrofil działa w fagosomach, jednak część z nich przedostaje się do cytoplazmy. Komórka zabezpiecza się przed nimi wykorzystując ochronne układy enzymatyczne, do których należą: SOD, katalaza i układ redoks glutationu oraz substancje będące zmiataczami wolnych rodników, np. kwas askorbinowy, cysteina, tokoferol α itp. [67, 79, 107]. Część toksycznych związków przedostaje się do środowiska zewnątrzkomórkowego, powodując uszkodzenia otaczających tkanek. Opisano szkodliwe efekty działania neutrofilu m.in. na śródbłonek naczyń [14, 101] czy tkankę płucną [22]. Dobrze również został udokumentowany szkodliwy wpływ tych komórek w czasie reperfuzji po zawale mięśnia sercowego [23, 60, 61, 94].

Jak wynika z prezentowanych danych, ze względu na nieswoistość działania tlenopochodne toksyny wytwarzane przez pobudzony neutrofil obok niezwykle pożytecznej roli uczestniczenia w zabijaniu mikroorganizmów mogą również być destrukcyjne dla organizmu gospodarza, zwłaszcza przy bardzo nasilonym lub przewlekłym procesie zapalnym.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALBRICH JM, McCATHY CA, HURST JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implication for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 210–214.
- [2] ALLEN RC, STJERNHOLM RL, STEELE RH. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biophys Biochem Res Commun* 1972; **47**: 679–684.
- [3] AUST SD. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl Nutr Dieta* 1989; **43**: 266–277.
- [4] BABIOR BM, KUVER R, CURNUTTE JT. Kinetics of activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1713–1718.
- [5] BABIOR BM. Microbicidal oxidant production by phagocytes. [w] Oxy-radicals in molecular biology and pathology. Cerutti PA, McCord JM, Fridovich I, red. Alan R. Liss, Inc., New York 1988; 39–51.
- [6] BASS DA, SZEJDA P. Mechanism of killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by neutrophils and eosinophils: killing by generators of hydrogen peroxide in vitro. *J Clin Invest* 1979; **64**: 1558–1560.
- [7] BECK-SPEIER I, LEUSCHEL L, LUIPPOLD G, MAIER KL. Proteins released from stimulated neutrophils contain very high levels of oxidized methionine. *FEBS Lett* 1988; **227**: 1–4.
- [8] BELLAVITE P, JONES OTG, CROSS AR, PAPINI E, ROSSI F. Composition of partially purified NADPH oxidase from pig neutrophils. *Biochem J* 1984; **223**: 639–648.
- [9] BELLAVITE P, BAZZONI F, SCOLARO G, POLI G, DUSI S, CASSATELLA MA. Genetic defects of phagocyte NADPH oxidase activity and activation. *Inter J Immunopathol Pharmacol* 1989; **2**: 75–86.
- [10] BORREGAARD N, TAUBER AI. Subcellular localization of the human neutrophil NADPH oxidase. b-Cytochrome and associated flavoprotein. *J Biol Chem* 1984; **259**: 47–52.
- [11] BRITIGAN BE, ROSEN GM, CHAI Y, COHEN MS. Do human neutrophils make hydroxyl radical? Determination of free radicals generated by human neutrophils activated with a soluble or particulate stimulus using electron paramagnetic resonance spectrometry. *J Biol Chem* 1986; **261**: 4426–4431.
- [12] CAPODICI C, MUTHUKUMARAN G, AMORUSO MA, BERG RA. Activation of neutrophil collagenase by cathepsin G. *Inflammation* 1989; **13**: 245–258.
- [13] CAPODICI C, BERG RA. Hypochlorous acid (HOCl) activation of neutrophil collagenase requires cathepsin G. *Agents and actions* 1989; **27**: 481–484.
- [14] CHOPRA J, WEBSTER RO. PGE₁ inhibits neutrophil adherence and neutrophil-mediated injury to cultured endothelial cells. *Am Rev Respir Dis* 1988; **138**: 915–920.
- [15] CHRISTIANSEN NO, LARSEN CS, ESMANN V. A study on the role of protein kinase C and intracellular calcium in the activation of superoxide generation. *Biochim Biophys Acta* 1988; **971**: 317–324.
- [16] CHRISTIANSEN NO. A time-course study on superoxide generation and protein kinase C activation in human neutrophils. *FEBS Lett* 1988; **239**: 195–198.
- [17] CLARK RA, LEIDAL KG, PEARSON DW, NAUSEEF WM. NADPH oxidase of human neutrophils. Subcellular localization and characterization of an arachidonate-activatable superoxide-generating system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4065–4074.
- [18] CLARK RA, PEARSON DW. Inactivation of transferrin iron binding capacity by the neutrophil myeloperoxidase system. *J Biol Chem* 1989; **264**: 9420–9427.
- [19] CLARK RA. Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils. *J Immunol* 1986; **136**: 4617–4622.
- [20] COCKCROFT S, STUTCHFIELD J. ATP stimulates secretion in human neutrophils and HL60 cells via a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein coupled to phospholipase C. *FEBS Lett* 1989; **245**: 25–29.
- [21] COHEN HJ, CHOVANIEC ME. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. A basis for a continuous assay for monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. *J Clin Invest* 1978; **61**: 1081–1090.
- [22] CRADDOCK PhR, FEHR J, DALMASSO AP, BRIGHAM KL, JACOB HS. Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J Clin Invest* 1977; **59**: 879–888.
- [23] CRAWFORD MH, GROVER FL, KOLB WP, McMAHAN CA, O'ROURKE RA, McMANUS LM, PINCKARD RN. Complement and neutrophil activation in the pathogenesis of ischemic myocardial injury. *Circulation* 1988; **78**: 1449–1458

- [24] CRONSTEIN BN, ROSENSTEIN ED, KRAMER SB, WEISSMANN G, HIRSCHHORN R. Adenosine: A physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. *J Immunol* 1985; **135**: 1366–1371.
- [25] CROSS AR, JONES OTG, GARCIA R, SEGAL AW. The subcellular localization of ubiquinone in human neutrophils. *Biochem J* 1983; **216**: 765–768
- [26] CUPO JF, ALLEN RA, JESAITIS AJ, BOKOCH GM. Reconstitution and characterization of the human neutrophil N-formyl peptide receptor and GTP binding proteins in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1989; **982**: 31–40.
- [27] CURNUTTE JT, KUIVER R, BABIOR BM. Activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem* 1987; **262**: 6450–6452.
- [28] CURNUTTE JT, KUIVER R, SCOTT PJ. Activation of neutrophil NADPH oxidase in cell-free system. Partial purification of components and characterization of the activation process. *J Biol Chem* 1987; **262** : 5563–5569.
- [29] CURNUTTE JT, SCOTT PJ, BABIOR BM. Functional defect in neutrophil cytosols from two patients with autosomal recessive cytochrome-positive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1236–1240.
- [30] DINAUER MC, ORKIN SH, BROWN R, JESAITIS AJ, PARKOS ChA. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of neutrophil cytochrome b complex. *Nature* 1987; **327**: 717–720.
- [31] DINAUER MC, ORKIN SH. Molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Immunodef Rev* 1988; **1**: 55–69.
- [32] EDWARDS SW, LLOYD D. The relationship between superoxide, cytochrome b and oxygen in activated neutrophils. *FEBS Lett* 1988; **227**: 39–42.
- [33] EDWARDS SW, SAY JE, TAYLOR J, HART CA. Myeloperoxidase secretion during phagocytosis: A case of patient with impaired bactericidal activity. *J Clin Lab Immunol* 1988; **27**: 97–102.
- [34] EDWARDS SW, SWAN TF. Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem J* 1986; **237**: 601–604.
- [35] EL-HAG A, CLARK RA. Immunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system. *J Immunol* 1987; **139**: 2406–2413.
- [36] GAUT JR, CARCHMAN RA. A correlation between phorbol diester-induced protein phosphorylation and superoxide anion generation in HL-60 cells during granulocytic maturation. *J Biol Chem* 1987; **262**: 826–834.
- [37] GRISHAM MB, JEFFERSON MM, MELTON DF, THOMAS EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem* 1984; **259**: 10404–10413.
- [38] GRISHAM MB, JEFFERSON MM, THOMAS EL. Role of monochloramine in the oxidation of erythrocyte hemoglobin by stimulated neutrophils. *J Biol Chem* 1984; **259**: 6757–6765.
- [39] HARDEN TK. The role of guanine nucleotide regulatory proteins in receptor-selective direction of inositol lipid signalling. [w] Inositol lipids in cell signalling. Michell RH, Drummond AH, Downes CP. (red.) Academic Press Ltd., London 1989; 113–133.
- [40] HAYAKAWA T, SUZUKI K, SUZUKI S, ANDREWS PC, BABIOR BM. A possible role for protein phosphorylation in the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Evidence from studies with cells from patients with chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9109–9115.
- [41] HAYAKAWA M, OGAWA T, SUGIYAMA S, OZAWA T. Hydroxyl radical and leukotoxin biosynthesis in neutrophil plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**: 1077–1085.
- [42] HIGSON FK, DURBIN L, PAVLOTSKY N, TAUBER AI. Studies of cytochrome b-245 translocation in the PMA stimulation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *J Immunol* 1985; **135**: 519–524.
- [43] HYSLOP PA, HINSHAW DB, HALSEY WA jr., SCHRAUFSTATTER IU, SAUERHEBER RD, SPRAGG RG, JACKSON JH, COCHRANE ChG. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1665–1675.
- [44] ICHINOSE Y, HARA N, OHTA M, MOTOHIRO A, KUDA T, ASO H, YAGAWA K. Phorbol myristate acetate modulates calcium ion-dependent superoxide anion generation induced by a monoclonal antibody raised against polymorpholeukocytes. *Infect Immunity* 1989; **57**: 2529–2533.
- [45] IWAMOTO H, KOBAYASHI T, HASEGAWA E, MORITA Y. Reaction of human myeloperoxidase with hydrogen peroxide and its true catalase activity. *J Biochem* 1987; **101**: 1407–1412.

- [46] JESAITIS AJ, BOKOCH GM, ALLEN RA. Regulation of signal transduction in human neutrophils by cytoskeleton-mediated reorganization of plasma membrane chemoattractant receptors. [w] *Signal Transduction in Cytoplasmic Organization and Cell Motility*. Satir P, Lazarides E, Condeelis JS, (red.) Alan R. Liss, Inc., New York 1988: 325-337.
- [47] KAKINUMA K, FUKUHARA Y, KANEDA M. The respiratory burst oxidase of neutrophils. Separation of and FAD enzyme and its characterization. *J Biol Chem* 1987; **262**: 12316-12322.
- [48] KAKINUMA K, KANEDA M, CHIBA T, OHNISHI T. Electron spin resonance studies on flavoprotein in neutrophil plasma membranes. Redox potentials of the flavin and its participation in NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1986; **261**: 9426-9432.
- [49] KLEBANOFF SJ. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. [w] *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. (red.) Raven Press Ltd., New York 1988: 391-444.
- [50] KRALL J, BAGLEY AC, MULLENBACH GT, HALLEWELL RA, LYNCH RE. Superoxide mediates the toxicity of paraquat for cultured mammalian cells. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1910-1914.
- [51] KRAUSE KH, PITTET D, VOLPE P, POZZAN T, MELDOLESI J, LEW DP. Calciosome, a sarcoplasmic reticulum-like organelle involved in intracellular Ca^{2+} -handling by nonmuscle cells: Studies in human neutrophils and HL-60 cells. *Cell Calcium* 1989; **10**: 351-361.
- [52] LAMBETH JD. Introduction: Respiratory burst oxidase and its regulation. *J Bioenerg Biomembr* 1988; **20**: 633-635.
- [53] LEHRER RI, GANZ T, SALSTED ME, BABIOR BM, CURNUTTE JT. Neutrophils and host defense. *Annals of Internal Medicine* 1988; **109**: 127-142.
- [54] LICZMAŃSKI AE. Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenia żywych komórek. *Postępy Biochemii* 1988; **34**: 273-291.
- [55] LIMA MF, KIERSZENBAUM F. Lactoferrin effects on phagocytic cell function. II. The presence of iron is required for the lactoferrin molecule to stimulate intracellular killing by macrophages but not to enhanced the uptake of particles and microorganisms. *J Immunol* 1987; **139**: 1647-1651.
- [56] LOMAX KJ, MALECH HL, GALLIN JI. The molecular biology of selected phagocyte defects. *Blood Rev* 1989; **3**: 94-104.
- [57] LYMAN CA, SIMONS ER, MELNICK DA, DIAMOND RD. Induction of signal transduction in human neutrophils by *Candida albicans* hyphae: The role of pertussis toxin-sensitive guanosine triphosphate-binding proteins. *J Infect Dis* 1988; **158**: 1056-1064.
- [58] MALY FE, KAPP A, ROTHER U. C5a-induced chemiluminescence of human granulocytes and its amplification by a serum factor. *Immunobiol* 1983; **164**: 90-97.
- [59] MAUGH II TH. Singlet oxygen a unique microbicidal agent in cells. *Science* 1973; **182**: 44-45.
- [60] MEHTA J, DINERMAN J, MEHTA P, SALDEEN TGP, LAWSON D, DONNELLY WH, WALLIN R. Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 1989; **79**: 549-556.
- [61] MEHTA JL, NICHOLS WW, MEHTA P. Neutrophils as potential participants in acute myocardial ischemia: relevance to reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1988; **11**: 1309-1316.
- [62] MICHLIN LJ, BENDICH A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987; **1**: 441-445.
- [63] MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; **247**: 3170-3175.
- [64] MÓNBOISSE JC, BELLON G, DUFER J, RANDOUX A, BOREL JP. Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils. *Biochem J* 1987; **246**: 599-603.
- [65] MORITA Y, IWAMOTO H, AIBARA S, KOBAYASHI T, HASEGAWA E. Crystallization and properties of myeloperoxidase from normal human leukocytes. *J Biochem* 1986; **99**: 761-770.
- [66] NAUSEEF WM. Phagocytic defects I. Abnormalities outside of the respiratory burst. Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clinics of North America* 1988; **2**: 135-158.
- [67] NIWA Y, KASAMA T, MIYACHI Y, KANO HT. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life Sci* 1989; **44**: 1655-1664.
- [68] NUNOI H, ROTROSEN D, GALLIN JI, MALECH HL. Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science* 1988; **242**: 1298-1301.
- [69] OHTSUKA T, OZAWA M, OKAMOTO T, UCHIDA M, OKAMURA N, ISHIBASHI S. Significance of phosphorylation/dephosphorylation of 46K protein(s) in regulation of superoxide anion production in intact guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J Biochem* 1987; **101**: 897-903.

- [70] OKAMURA N, CURNUTTE JT, ROBERTS RL, BABIOR BM. Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 48 kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6777-6782.
- [71] OOI W, LEVINE HG, LaMONT JT, CLARK RA. Inactivation of *Clostridium difficile* cytotoxin by the neutrophil myeloperoxidase system. *J Infect Dis* 1984; **149**: 215-219.
- [72] PARKOS ChA, ALLEN RA, COCHRANE ChG, JESAITIS AJ. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **932**: 71-83.
- [73] PARKOS ChA, ALLEN RA, COCHRANE ChG, JESAITIS AJ. Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 1987; **80**: 732-742.
- [74] PICK E, BROMBERG Y, SHPUNGIN S, GADBA R. Activation of the superoxide forming NADPH oxidase in cell-free system by sodium dodecyl sulfate. Characterization of the membrane-associated component. *J Biol Chem* 1987; **262**: 16476-16483.
- [75] PRINCE RC, GUNSON DE. Superoxide production by neutrophils. *TIBS* 1987; **12**: 86-87.
- [76] REST RF, FARRELL CF, NAIDS FL. Mannose inhibits the human neutrophil oxidative burst. *J Leukoc Biol* 1988; **43**: 158-164.
- [77] ROSEN H, RAKITA RM, WALTERSDORPH AM, KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase-mediated damage to microbial electron transport: a microbicidal mechanism? [w] Bacteria-host cell interaction. Alan R. Liss, Inc., New York 1988: 31-46.
- [78] ROYER-POKORA B, KUNKEL LM, MONACO AP, GOFF SC, NEWBURGER PE, BAEHNER RL, COLE FS, CURNUTTE JT, ORKIN SH. Cloning the gene for an inherited human disorder-chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986; **322**: 32-38.
- [79] SALIN ML, McCORD JM. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1975; **56**: 1319-1323.
- [80] SAMUNI A, BLACK ChDV, KRISHNA CM, MALECH HL, BERNSTEIN EF, RUSSO A. Hydroxyl radical production by stimulated neutrophils reappraised. *J Biol Chem* 1988; **263**: 13797-13801.
- [81] SCHNEIDER JE, BROWNING MM, FLOYD RA. Ascorbate/iron mediation of hydroxyl free radical damage to PBR322 plasmid DNA. *Free Radical Biol Med* 1988; **5**: 287-295.
- [82] SCHRAUFSTATTER IU, HINSHAW DB, HYSLOP PA, SPRAGG RG, COCHRAN ChG. Oxidant injury of cells. DNA strandbreaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 1986; **77**: 1312-1320.
- [83] SCHRAUFSTATTER IU, HYSLOP PA, JACKSON J, COCHRANE ChG. Mechanisms of oxidant injury of cells. [w] Leukocyte emigration and its sequelae. Movat J. (red.) Satellite Symp., Karger, Basel 1987: 150-160.
- [84] SEGAL AW. The electron transport chain of the microbicidal oxidase of phagocytic cells and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1785-1793.
- [85] SEGAL AW, JONES OTG. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature* 1978; **276**: 515-517.
- [86] SEGAL AW. Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature* 1987; **326**: 88-91.
- [87] SEGAL AW. Phagocytic defects II: Abnormalities of the respiratory burst. Cytochrome b-245 and its involvement in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Hematol/Oncol Clinics of North America* 1988; **2**: 213-223.
- [88] SELVARAJ RJ, SBARRA AJ. Relationship of glycolytic and oxidative metabolism to particle entry and destruction in phagocytosing cells. *Nature* 1966; **211**: 1272-1276.
- [89] SEPE SM, CLARK RA. Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. I. Characterization of a liposome model and injury by myeloperoxidase, hydrogen peroxide, and halides. *J Immunol* 1985; **134**: 1888-1895.
- [90] SEPE SM, CLARK RA. Oxidant membrane injury by the neutrophil myeloperoxidase system. II. Injury by stimulated neutrophils and protection by lipid-soluble antioxidants. *J Immunol* 1985; **134**: 1896-1901.
- [91] SHA'AG D, PICK E. Macrophage-derived superoxide-generating NADPH oxidase in an amphiphile-activated, cell-free system; partial purification of the cytosolic component and evidence that it may contain the NADPH binding site. *Biochim Biophys Acta* 1988; **952**: 213-219.
- [92] SHACTER E, BEECHAM EJ, COVEY JM, KOHN KW, POTTER M. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis* 1988; **9**: 2297-2304.

- [93] SIMCHOWITZ L, de WEER P. Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange, and active transport. *J Gen Physiol* 1986; **88**: 167–194.
- [94] SIMTH III EF, EGAN JW, BUGELSKI PJ, HILLEGASS LM, HILL DE, GRISWOLD DE. Temporal relation between neutrophil accumulation and myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988; **255**: H1060–H1068.
- [95] STRYER L. Biochemia. PWN, Warszawa 1986; 369.
- [96] TAUBER AI, BABIOR BM. Neutrophil oxygen reduction: the enzymes and the products. *Adv Free Rad Biol Med* 1985; **1**: 265–307.
- [97] TEAHAN C, ROWE P, PARKER P, TOTTY N, SEGAL AW. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the α -chain of cytochrome b-245. *Nature* 1987; **327**: 720–721.
- [98] THOMAS EL. Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: Nitrogen-chlorine derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli*. *Infect Immunol* 1979; **23**: 522–530.
- [99] THOMAS EL, JEFFERSON MM, GRISHAM MB. Myeloperoxidase – catalyzed incorporation of amines into proteins: Role of hypochlorous acid and dichloramines. *Biochemistry* 1982; **21**: 6299–6308.
- [100] UMEI T, TAKESHIGE K, MINAKAMI S. NADPH binding component of neutrophil superoxide-generating oxidase. *J Biol Chem* 1986; **261**: 5229–5232.
- [101] VANDENBROUCKE-GRAULS ChMJE, THIJSSSEN HMWM, van KESSEL KPM, van ASBEC BS, VERHOEF J. Injury to endothelial cells by phagocytosing polymorphonuclear leukocytes and modulatory role of lipoygenase products. *Infect Immun* 1987; **55**: 1447–1454.
- [102] VARANI J, FLIGIEL SEG, TILL GO, KUNKEL RG, RYAN US, WARD PA. Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils. Possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest* 1985; **53**: 665–674.
- [103] VISSERS MCM, WINTERBOURN CC. Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes. *Biochem J* 1987; **245**: 277–280.
- [104] VOLPP BD, NAUSEEF WM, CLARK RA. Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* 1988; **242**: 1295–1297.
- [105] VOLPP BD, NAUSEEF WM, DONELSON JE, MOSER DR, CLARK RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 7195–7199.
- [106] WARD PA, WARREN JS, JOHNSON KJ. Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1988; **5**: 403–408.
- [107] WENDEL A. Enzymes acting against reactive oxygen. *Adv Clin Enzymol* 1988; **6**: 161–167.
- [108] WHITIN JC, TAKAHASHI K, COHEN HJ. Activation of neutrophil superoxide production by concanavalin A can occur at low levels of intracellular ionized calcium. *Blood* 1987; **69**: 762–768.
- [109] WOOD PM. The two redox potentials for oxygen reduction to superoxide. *TIBS* 1987; **12**: 250–251.
- [110] ZATTI M, ROSSI F. Early changes of hexose monophosphate pathway activity and of NADPH oxidation in phagocytizing leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1965; **99**: 557–561.

Otrzymano i przyjęto: 10 listopada 1990 r.

Adres autorów: Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź

POLTRADE LIMITED

**WYŁĄCZNY DYSTRYBUTOR NA POLSKĘ
WYROBÓW : BIBBY STERILIN I AMICON**

ma przyjemność poinformować państwa, że wszelkie informacje techniczno-handlowe można uzyskać w nowo powstałym biurze:

"PROSPECTA"

Skr.Poczt.11, Wa-wa21
ul. Korotyńskiego 5
02-121 Warszawa

tel.(022)235852
fax/tel.(022)235306
tlx.816675

Bibby Sterilin

Jest jednym z największych na świecie producentem sprzętu laboratoryjnego ze szkła borokrzemowego i sodowowapniowego oraz z tworzyw sztucznych, sprzedawanymi pod znakami firmowymi: PYREX, QUICKFIT, E-MIL, SVL, MBL, AZLON.

Bibby Sterilin specjalizuje się również w naczyniach do hodowli komórkowej, sprzedając swoje wyroby pod znakami firmowymi: CORNING, TISSUE CULTURE i STERILIN.

Firma posiada także bogaty asortyment urządzeń laboratoryjnych takich jak: destylarki, wyparki obrotowe, pH-metry, halogenowe płytki grzejne, termometry, biurety cyfrowe, dozowniki.

amicon

Amicon dostarcza technologii do ultrafiltracji i chromatografii, aparatury do izolowania do zastosowania w badaniach naukowych, laboratoriach klinicznych i produkcyjnych, szpitalach, jak też w przemyśle.

Produkty tej firmy są szeroko stosowane w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym i biotechnologii.

POZATLENOWE MECHANIZMY ZABIJANIA MIKROORGANIZMÓW PRZEZ NEUTROFILE

OXYGEN-INDEPENDENT MICROBICIDAL SYSTEMS OF NEUTROPHILS

Krzysztof ZEMAN, Jerzy KANTORSKI

Zakład Patofizjologii i Immunologii Instytutu Nauk Podstawowych
Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie. Zabijanie i destrukcja mikroorganizmów przez neutrofile zachodzi głównie w fagolizosomie. Do działających tam systemów zabijających zalicza się mechanizmy zależne i niezależne od tlenu. Pozatlenowe czynniki to lizosomalne proteazy i inne enzymy hydrolityczne oraz białka działające destrukcyjnie na mikroorganizmy. Dokonano przeglądu struktur i funkcji składowych ziarnistości neutrofilii o działaniu powodującym zabijanie mikroorganizmów.

Summary. Killing and digestion of microorganisms take place within phagolysosome of neutrophils. Antimicrobial activities in phagolysosomes are divided into two classes. Oxygen-dependent mechanisms are expressed when neutrophils undergo the respiratory burst. Oxygen-independent antimicrobial mechanisms include activities of lysosomal proteases and other hydrolytic enzymes, and action of proteins and peptides that bind to microorganisms and disturb essential processes or structural components. Proposed mechanisms of action of oxygen-independent neutrophil agents, and the range of their microbial targets are discussed.

WSTĘP

Neutrofile, szybko reagujące komórki krwi, pełnią niezwykle ważną rolę w odporności nieswoistej ustroju stanowiąc pierwszą linię obrony przed inwazją bakterii, grzybów i niektórych wirusów. Dzięki swoim strukturom powierzchniowym i systemowi przekaźnictwa sygnału płynącego z ogniska zapalenia, a także posiadanym w organellach wewnątrzkomórkowych specyficznym czynnikiem są w stanie rozpoznać, pochłonąć i zniszczyć niepożądaną cząsteczkę [11]. Wkrótce po aktywacji obserwuje się zwiększone zapotrzebowanie komórki na tlen i uwalnianie przez nią dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) i nadtlenu wodoru (H_2O_2) do środowiska [1]. Proces zmian metabolizmu tlenowego pojawiający się w kilka sekund np. po ekspozycji komórki na opsonizowane

cząsteczki jest przede wszystkim zależny od aktywacji systemu oksydazy NADPH; zazwyczaj nazywa się go wybuchem oddechowym (*respiratory burst*) [1, 20]. Powstające w tym procesie pośrednie produkty redukcji cząsteczki tlenu, a następnie dysmutacji O_2^- nie są jednak czynnikami działającymi silnie bakteriobójczo. Są natomiast niezbędnymi substratami do dalszych przemian katalizowanych przez mieloperoksydazę i metale (Fe), w których wyniku powstają halogenki (kwas podchlorawy, chloraminy) oraz rodniki hydroksylowe. Te grupy substancji z kolei wykazują silną aktywność bójczą skierowaną przeciw drobnoustrojom [41].

Mechanizmy prowadzące do tlenowo-zależnego niszczenia drobnoustrojów przez neutrofile zostały dobrze poznane [1, 6, 18a, 48]. Równolegle zwraca się coraz większą uwagę na zdolność neutrofile do zabijania mikroorganizmów w systemach niezależnych od tlenu. Stwierdzono, że niezbyt dokładnie oczyszczane ekstrakty otrzymane z neutrofile, nazywane np. leukinami czy fagocytynami, wykazały działanie antybakteryjne *in vitro*. Potwierdziło to obserwacje, że neutrofile pacjentów z przewlekłą chorobą ziarniniakową (CGD), które nie mają możliwości tlenowo-zależnego zabijania bakterii, potrafią skutecznie eliminować wiele szczepów bakteryjnych [10, 23]. Może się to odbywać dzięki istnieniu innego systemu zabijania, który opiera się na obecności w strukturach wewnątrzkomórkowych neutrofile tzw. naturalnych antybiotyków. Wyizolowano i oczyszczono takie właśnie endogenne peptydy i białka, które mają różną siłę i różne spektra działania zabijającego mikroorganizmy.

W niniejszym artykule przeprowadzono charakterystykę struktur i funkcji najlepiej poznanych składników ziarnistości neutrofile o działaniu mikrobobójczym oraz przedstawiono dowody wskazujące na ich znaczenie *in vivo* dla odporności ustroju.

Tabela 1. Izolowane z neutrofile czynniki mikrobobójcze

Czynnik	Lokalizacja w ziarnistościach	Masa cząsteczkowa [kDa]	Poziom w neutrofilach [$\mu\text{g}/10^6$]
Defensyny	azurofilne	3,5–4,0	4–6
Lizozym	azurofilne	14,4	3
	specyficzne		
Katepsyna G	azurofilne	29,5–31,0	1–2
BPI	azurofilne	58,0	< 1
Laktoferyna	specyficzne	80,0	2–6

KATEPSYNA G (EC 3.4.21.20)

W 1960 r. Mounter i Atiyeh opisali enzym uzyskany z ekstraktu ludzkich leukocytów, który wykazywał działanie chymotrypsynopodobne, a którego aktywność była hamowana przez dwuizopropylodifluorofosforan (DFP) i surowiczy sojowy inhibitor trypsyny. Ustalono następnie, że enzym ten jest charakterystyczny dla ludzkich neutrofile i zlokalizowany jest w ziarnistościach azurofilnych (pierwotnych) [44]. Powszechnie przyjęto określać go jako katepsynę G. Elektroforeza SDS wykazuje istnienie w katepsynie G trzech powiązanych strukturalnie ze sobą polipeptydów (izoenzymów?) o $pI = 8,0$ i $M_r = 31, 30$ i $29,5$ kDa [17]. Sekwencja aminokwasów tego enzymu wskazuje na dość wysoką homologię z proteazą

II szczyrych komórek tucznych (65%) i elastazą ludzkich neutrofilii (36–48%) [17]. Uzyskanie cDNA dla tego enzymu pozwoliło ustalić, że ma on trzy wiązania disulfidowe i jedno miejsce ulegające glikolizacji oraz wysunąć przypuszczenie, że jest to pojedynczy peptyd składający się z 16–18 aminokwasów [33]. Jego ilość w zależności od metody pomiaru określa się na 1,3–3,8 $\mu\text{g}/10^6$ neutrofilii [17]. Wykazano też, że z ilości 10^{10} komórek można otrzymać ok. 1,2 mg oczyszczonej katepsyny G o aktywności 107 U/mg [37].

Katepsyna G jest najważniejszą obok elastazy proteinazą neutrofilii. Słabiej od elastazy degraduje białka tkanki łącznej – kolagen, elastynę czy proteoglikany [44]. Uwolnienie ok. 2,5 μg tego enzymu do 1 ml osocza (tj. 10% jego zawartości z 10^7 komórek) powoduje silną aktywację płytek krwi z następowym wzrostem ich agregacji i wydzielania 5-hydroksytryptaminy [35]. Uważa się także, że katepsyna G może hamować działanie bradykininy [44].

Wykazano silne właściwości bakteriobójcze tego enzymu szczególnie w stosunku do takich bakterii gramdodatnich, jak: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* i gramujemnych, takich jak: *Proteus aureginosa*, *Neisseria gonorrhoe* oraz w stosunku do niektórych drożdżaków [11]. Wśród wymienionych mikroorganizmów największą wrażliwość wykazują gronkowce. Warto nadmienić, że katepsyna G uwrażliwia niektóre bakterie (np. *Acinetobacter calcoaceticus*) na działanie lizozymu, a także wykazuje działanie synergistyczne z elastazą na bakterie *Escherichia coli* [20]. Zabijanie mikroorganizmów zachodzi w fagosomach, do których uwalniana jest zawartość ziarnistości azurofilnych [28]. Mechanizm działania nie zależy od proteolitycznej aktywności enzymu, bowiem stosowanie inhibitorów proteaz (DFP) nie pozbawia tego enzymu aktywności bakteriobójczej [44]. Wśród przypuszczalnych mechanizmów działania wskazuje się na hamowanie ATP-zależnego transportu błonowego bakterii, a także na hamowanie ich zdolności tworzenia kolonii [11]. Bakteriobójczość tego enzymu jest hamowana przez obniżenie pH oraz przez wzrost poziomu magnezu w środowisku reakcji [11].

U osób z zespołem Chediaka-Higashiego wykazano obniżoną aktywność katepsyny G i elastazy; osoby te wykazują zwiększoną skłonność do nawracających, przewlekających się infekcji [10, 21]. Na modelu myszy beżowych, które wykazują objawy zespołu Chediaka-Higashiego, wykazano kompletny brak obu tych lizosomalnych proteaz [40].

BPI

W ziarnistościach azurofilnych granulocytów króliczych, a następnie ludzkich opisano kationowe, bogate w lizynę białko – BPI (BPI – *bactericidal permeability increasing protein*) o wysokim $\text{pI} = 9,5$ i masie cząsteczkowej 50 kDa (u królika) i 58 kDa (u ludzi) [20, 42]. W neutrofilach ludzkich lokalizuje się je wyłącznie w ziarnistościach azurofilnych [5, 47]. Pierwszych 17 reszt aminokwasowych wykazuje 80% homologii z BPI królika [5]. Wykazano, że ludzkie BPI stanowi ok. 0,5% zawartości białek neutrofila [20].

Po 15-minutowej ekspozycji na to białko bakterie *Escherichia coli* tracą zdolność tworzenia kolonii [42]. Towarzyszą temu zmiany w zewnętrznej błonie komórkowej polegające na wzroście jej przepuszczalności dla substancji hydrofobowych (np. aktynomycyna D) i selektywnej aktywacji enzymów degradujących peptydoglikany [5, 42]. Dochodzi także do wzrostu metabolizmu fosfolipidów błony komórkowej. 10^7 bakterii wiąże się z 1,7 μg BPI [20]. Usunięcie BPI z powierzchni bakterii (przy użyciu np. trypsyny lub dwuwartość-

ciowych kationów) znosi zaburzenia funkcjonalne, ale nie przywraca utraconej zdolności tworzenia kolonii [42, 48]. Optymalny efekt bakteriobójczy zachodzi w neutralnym pH [42]. BPI wiąże się z wrażliwymi na niego bakteriami poprzez lipid A i rdzeń lipopolisacharydu (LPS). Jony Ca^{2+} i Mg^{2+} konkurują z BPI o te same miejsca anionowe molekuly LPS [5, 48]. Nie wszystkie bakterie gramujemne są wrażliwe na BPI, należą do nich m.in. *Serratia marcescens*, *Proteus* species i niektóre bakterie z rodzaju *Salmonella*; w czasie fagocytozy białko opłaszca selektywnie tylko te wrażliwe [20].

DEFENSYNY

W neutrofilach ludzkich istnieją trzy podobne w budowie i funkcji homologiczne peptydy, nazwane defensynami. Te małe ($M_r = 3,5\text{--}4,0$ kDa), bogate w cysteinę i argininę peptydy, stanowią 5–7% ogólnej zawartości białek neutrofila i aż 30–50% zawartości ziarnistości azurofilnych [4, 14, 42]. Zastosowanie metody rozwirowywania ziarnistości granulocytarnych na podfrakcje pozwala zlokalizować defensyny głównie we frakcjach o najwyższej gęstości, przy czym wartości sięgające 50% maksymalnych osiągają we frakcji H5 zawierającej ziarnistości największe ($0,32\ \mu\text{m}$) i o największej gęstości [31]. Ustalono, że 10^9 neutrofilów ludzkich zawiera ok. 5 mg defensyn. Osoba o wadze 70 kg, której szpik produkuje dziennie 2×10^9 granulocytów, syntetyzuje 700 mg tych peptydów na dobę [48]. Wykazano istnienie 6 króliczych i trzech ludzkich (wykazujących dużą homologię strukturalną) defensyn (HNP 1–3). HNP są zbudowane z 29–30 aminokwasów, a różnią się od siebie nieznacznie: HNP1 ma przed pierwszą cysteiną alaninę, HNP3 kwas asparaginowy, a HNP-2 wolne miejsce. Wszystkie są cyklicznymi peptydami, bowiem reszty cysteinowe są sprzężone jedna z drugą za pomocą wiązań disulfidowych. Rozerwanie mostków disulfidowych znosi aktywność biologiczną [36, 46].

Spektrum działania tych peptydów to głównie bakterie gramodatnie (*Staphylococcus aureus*) oraz gramujemne (*Escherichia coli*), ale także niektóre drożdżaki (*Candida albicans*) i wirusy (Herpes simplex typ 1 i 2, wirus grypy, wirus cytomegalii) [4, 13, 20]. Mechanizm działania opiera się na hamowaniu procesów oddechowych drobnoustrojów, wywoływaniu zmian przepuszczalności wewnętrznych i zewnętrznych błon komórkowych (gramujemne), hamowaniu zdolności do syntezy RNA i DNA i utracie zdolności bakterii do tworzenia kolonii [13, 20]. Co ciekawe, ludzkie defensyny wykazują działanie bójcze tylko w stosunku do metabolicznie aktywnych bakterii, przy czym w stosunku do bakterii gramodatnich wymagane są dość duże stężenia tych peptydów w układzie *in vitro* [42, 46].

Takie wysokie stężenia mają swoje odnośniki *in vivo*, gdyż jeden neutrofil zawiera ok. 1000 ziarnistości z defensynami, których zawartość ocenia się, jak wspomniano, na 4–5 $\mu\text{g}/10^6$ komórek. Wobec tego przy fuzji ziarnistości z fagosomem o średnicy $1\ \mu\text{m}$ stężenie defensyn w 1 ml wynosi 8–10 mg [13]. Ester forbolu (PMA) oraz opsonizowany zymosan powodują odpowiednio uwalnianie tylko 3 i 8% zawartości defensyn, natomiast surowica ma działanie hamujące uwalnianie defensyn [13].

Stwierdzono, że u osób z wrodzonym brakiem ziarnistości specyficznych brak jest także jakiegokolwiek aktywności defensyn. Osoby te wykazują wzrost częstości zachorowań na infekcje bakteryjne i wirusowe [10, 11, 32].

Opisano ostatnio kolejną defensynę zlokalizowaną w ziarnistościach azurofilnych [9, 49].

Jest ona podobnie jak poprzednie małym peptydem o masie 3,7 kDa i pI 8,6, bogatym w argininę (15,2 mol%), różni się natomiast dość znacznie składem aminokwasowym. W stosunku do pozostałych defensyn wykazuje ponad stukrotnie silniejsze działanie przeciwko *Escherichia coli* i czterokrotnie silniejsze przeciwko *Streptococcus foecalis* i *Candida albicans*.

LIZOZYM

Około 70 lat temu Fleming użył terminu lizozym dla określenia enzymu powodującego szybką lizę zawiesiny bakterii. Zgodnie z obecną nomenklaturą lizozym nosi nazwę systematyczną N-acetylomuramido-glikanohydrolazy, a potocznie – muramidazy. Lizozym jest białkiem kationowym o masie cząsteczkowej 14,4 kDa [11]. Powszechność jego występowania sprawia, że jest jednym z głównych składników nieswoistych mechanizmów obronnych ustroju. Największą jego aktywność stwierdza się m.in. w łzach, mleku kobiecym, soku żołądkowym, spermie, płynie owodniowym, przesiękach, ślinie [15]. Istotne ilości tego enzymu znajdują się również w ziarnistościach azurofilnych i specyficznych neutrofilii ludzkich. Jego ilość ocenia się na około 3 μg w 10^6 tych komórek [10].

Rola lizozymu jako czynnika przeciwbakteryjnego to bezpośrednie działanie, ale również stymulacja komórek fagocytykujących. Jako glikozydaza rozbija wiązania β -1,4-glikozydowe między kwasem N-acetylmuraminowym i N-acetyloglukozaminą ścian bakterii [39]. Enzymatyczny mechanizm zabijania odnosi się głównie do bakterii mających tego typu miejsce w błonie komórkowej (*Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus* sp.), stwierdzono jednakże możliwości bójcze lizozymu nie opierające się na enzymatycznym działaniu w stosunku do takich mikroorganizmów, jak *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* czy *Candida albicans* [24, 30]. Ten drugi typ działania wymaga większych dawek; uważa się że in vivo nieenzymatyczny efekt lizozymu może być wzmagany przez neutrofilowe, obojętne proteazy [43]. Wykazano także in vitro destrukcyjne działanie lizozymu w stosunku do niektórych *Chlamydia* [30].

Lizozym może mieć pośredni wpływ na immunostymulację poprzez rozszczepianie peptydoglikanów, które są zdolne do tworzenia adjuwantów, stymulowania produkcji przeciwciał, indukowania opóźnionej odpowiedzi na antygeny, indukowania odpowiedzi mitogennej [15].

Poziom lizozymu w surowicy jest przydatny do diagnostyki niektórych chorób rozrostowych, nowotworowych i zapalnych. Istnieją próby stosowania terapeutycznego tego enzymu, stosuje się go także jako konserwant w przemyśle spożywczym [15].

LAKTOFERRYNA

Laktoferryna jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej ok. 80 kDa. Jest to substancja będąca nośnikiem kationowym jonów żelaza. Jedna jej cząsteczka wiąże dwa atomy Fe^{2+} . Po raz pierwszy wyizolowano ją z mleka kobiecego (tzw. czerwona proteina), gdzie osiąga stężenie do 1 mg/ml [7]. W organizmie znajduje się głównie w neutrofilach oraz w puli

stacycznej jako część wydzieliny na błonach śluzowych [11]. Wykazano także, że 28% monocytów i ok. 13% limfocytów wykazuje jej obecność. Mało (w porównaniu do transferyny) znajduje się jej w surowicy ($> 1 \mu\text{g/ml}$ vs $2\text{--}4 \text{ mg/ml}$) [7]. Stosunkowo dużą (tj. $2\text{--}6 \mu\text{g}/10^6$) zawartość laktoferyny wykazano w neutrofilach [25]. Metodą immunoperoxydazową lokalizuje się ją wyłącznie w ziarnistościach specyficznych [25]. Stosowanie innych metod (*immunogold*) pozwala wykazać heterogenność neutrofilii pod względem zawartości laktoferyny – 6–10% tych komórek nie zawiera jej wcale [7].

Wskazuje się na rolę laktoferyny jako modulatora niektórych reakcji immunologicznych, wykazano bowiem jej zdolność do hamowania uwalniania czynnika powodującego powstawanie kolonii granulocyтарно-makrofagowych (GM-CSF) [3], hamowania mieszanej reakcji limfocytów (MLR), wzmagania cytotoksyczności makrofagów przeciwko komórkom nowotworowym [19, 27]. Interesujące są także spostrzeżenia o wiązaniu laktoferyny przez komórki białaczkowe i o indukowaniu przez interleukinę-1 *in vitro* selektywnej egzocytozy laktoferyny z ziarnistości specyficznych [50].

Najważniejsze spektrum fizjologicznego działania laktoferyny to jej destrukcyjny wpływ na mikroorganizmy. Może on zachodzić poprzez bakteriostatyczny efekt wolnej od żelaza apolaktoferyny wynikający z chelatowania komponentów żelazowych niezbędnych dla metabolizmu bakterii. Druga możliwość to bezpośredni wpływ apolaktoferyny na np. *Vibrio cholerae* czy *Streptococcus mutans*. Trzecia możliwość jest związana z funkcją laktoferyny jako donora jonów Fe^{2+} dla systemu mieloperoxydazy i generowania wolnych rodników [11, 25]. Wykazano, że w czasie infekcji bakteryjnej, oparzenia i hemodializy obniża się wewnątrzkomórkowe stężenie laktoferyny, przy równoczesnym jej wzroście w surowicy.

Pacjenci z wrodzonym brakiem ziarnistości specyficznych, a więc i niedoborem laktoferyny wykazują zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne [11, 12, 23]. Opisano również przypadki z selektywnym niedoborem laktoferyny [22].

INNE CZYNNIKI

Oprócz wyżej omówionych czynników wykazujących działanie bójcze na mikroorganizmy opisywane są zawarte w neutrofilach substancje białkowe wykazujące różne spektra działania. Białka CAp-57 czy BP mające wykazywać szczególnie silne właściwości bójcze w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* mają masy cząsteczkowe odpowiednio 57 i 55 kDa oraz sekwencję aminokwasów bardzo podobną do wcześniej omówionego BPI i są z nim najprawdopodobniej identyczne [18, 29, 38].

Ponieważ neutrofile stanowią główną komórkową w miejscach uszkodzeń spowodowanych wirusami herpes, wydaje się, że mogą one wiązać i internalizować cząsteczki wirusa [45]. Wykazano, że neutrofile produkują substancje o aktywności interferonopodobnej, które określa się mianem poliferonów. Jedna z nich scharakteryzowana dokładniej, o M_r ok. 90 kDa wykazuje działanie anty HSV1, a także powoduje supresję proliferacji zależnych od interleukiny-2 limfocytów T [2]. Na materiale bydłęcym opisano czynnik otrzymywany z neutrofilii o bezpośrednio neutralizującym wpływie na rhinowirusy (RV1B) i wirusy herpes. Składa się on z dwu peptydów, bogatych w prolinę i argininę, o M_r ok. $7,5 \text{ kDa} \cdot 10^{11}$ neutrofilii produkuje 5–13 mg tej substancji [51].

Opisano także grupę uzyskanych z neutrofilii bydłych kationowych peptydów o masie cząsteczkowej 5–7 kDa. Określa się je jako bakteneeciny (łac. *bacterium* i *necare*). Ich działanie jest skierowane głównie przeciw bakteriom *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*. Każda z opisywanych bakteneecin znajduje się w ilości ok. 125 ng/10⁶ komórek [16].

UWAGI KOŃCOWE

Profesjonalne fagocyty, do których należą neutrofile, wchłaniają opsonizowane mikroorganizmy do fagosomów, które po fuzji z ziarnistościami wewnątrzkomórkowymi tworzą fagolizosomy, w których dochodzi do zabijania i trawienia pochłoniętego materiału [6, 42]. Proces taki, jak wspomniano, może odbywać się w drodze zależnych i niezależnych od tlenu mechanizmów. Na ogół oba są rozpatrywane oddzielnie i nie uwzględnia się ich wzajemnych interakcji. Istnieją pojedyncze doniesienia wskazujące na fakt, że oba te systemy mogą działać synergistycznie, np. ekspozycja bakterii na system wolnych rodników wzmacnia ich wrażliwość na lizozym [26]. Jako inny przykład może służyć fakt, że składniki zawarte w ziarnistościach mogą ochraniać własną mieloperoksydazę przed tlenowo-zależną autoinaktywacją [42].

Trudno szczegółowo opisać sekwencję zjawisk zachodzących w fagolizosomie. Znajdują się tam produkty powstające w wyniku wybuchu oddechowego oraz czynniki bójcze pochodzące z systemu pozatlenowego. Niejasna jest rola pH wewnątrz fagolizosomu, które w kilku pierwszych minutach procesu fagocytozy rośnie do 8,0, a po ok. 30 minutach spada do 6,5 [34]. Trudno też odpowiedzieć na pytanie, po jakim czasie wchłonięte bakterie są zabijane. Chociaż uważa się, że następuje to w kilka minut po internalizacji, to jednakże kinetyki zabijania dla poszczególnych bakterii są różne [21]. Nie wyjaśniono dotychczas, jakie są optymalne stężenia czynników wewnątrz fagolizosomu, czy działają one ze sobą synergistycznie czy antagonistycznie wobec siebie, jaki jest półokres ich trwania, co powoduje ich inaktywację.

Przy rozpatrywaniu powyższych zagadnień należy także uwzględniać doniesienia wykazujące, że mikroorganizmy wytwarzają własne mechanizmy obronne chroniące je przed działaniem zabijających czynników. Przykładowo *Chlamydia* species czy *Mycobacterium tuberculosis* hamują etap powstawania fagolizosomu, *Trypanosoma cruzi* jest zdolna do lizy nowo sformowanego fagolizosomu [32]. U bakterii *Salmonella typhimurium* wykryto gen powodujący ich oporność na defensyny neutrofilii [8]. Należy także wspomnieć o genetycznie uwarunkowanych różnicach w zdolności neutrofilii do fagocytozy i genetycznie zdeterminowanych defektach fagocytozy i zabijania wewnątrzkomórkowego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BABIOR GL, ROSIN RE, McMURRICH BJ, PETERS WA, BABIOR BM. Arrangement of the respiratory burst oxidase in the plasma membrane of the neutrophil. *J Clin Invest* 1981; 67: 1724–1728.
- [2] BIELEFELDT OHMANN H, CAMPOS M, FITZPATRICK DR, RAPIN N, BABIUK LA. A neutrophil-derived antiviral protein: induction requirements and biological properties. *J Virol* 1989; 63: 1916–1923.

- [3] BROXENMAYER HE, PLATZER E. Lactoferrin acts on I-A an I-E/C antigen subpopulations of mouse peritoneal macrophages in the absence of T lymphocytes and other cell types to inhibit production of granulocyte-macrophage colony stimulatory factors in vitro. *J Immunol* 1984; **133**: 306–314.
- [4] DAHER KA, SELSTED ME, LEHRER RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* 1986; **60**: 1068–1074.
- [5] ELSBACH P, WEISS J. Bactericidal/permeability increasing protein (BPI) of granulocytes: structure and function. [w] *Bacteria-Host Cell Interaction*, Alan R. Liss, Inc. 1988: 47–60.
- [6] ELSBACH P, WEISS J. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 843–853.
- [7] ESAGUY N, AGUAS AP, SILVA MT. High-resolution localization of lactoferrin in human neutrophils: labelling of secondary granules and cell heterogeneity. *J Leukoc Biol* 1989; **46**: 51–62.
- [8] FIELDS P, GROISMAN EA, HEFFRON A. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 1988; **243**: 981–1112.
- [9] GABAY JE, SCOTT RW, CAMPANELLI D, GRIFFITH J, WILDE C, MARRA M, SEEGER M, NATHAN CF. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5610–5614.
- [10] GALLIN JI. Phagocytic cells: disorders of function. Inflammation: Basic Principles and clinical correlates. JI Gallin, IM Goldstein, R Snyderman (red.) Raven Press, Ltd, New York, 1988: 493–511.
- [11] GANZ T. Neutrophil receptors. [w] Lehrer RI, moderator. Neutrophils and Host Defense. *Ann Intern Med* 1988; **109**: 127–142.
- [12] GANZ T, METCALF JA, GALLIN JI, BOXER LA, LEHRER R. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and specific granule deficiency. *J Clin Invest* 1988; **82**: 552–556.
- [13] GANZ T, SELSTED ME, LEHRER RI. Defensins: antimicrobial/cytotoxic peptides of phagocytes. [w] *Bacteria-Host Cell Interaction*. Alan R. Liss, Inc. 1988: 3–14.
- [14] GANZ T, SELSTED ME, SZKLAREK D, HARWIG SSI, DAHER K, BAINTON DF, LEHRER RI. Defensins: natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 1985; **76**: 1427–1435.
- [15] GAŚSIOR-CHRZAN B. Biologiczna rola lizozymu i jego przydatność w praktyce klinicznej. *Wiad Lek* 1987; **40**: 1693–1696.
- [16] GENNARO R, SKERLAVAJ B, ROMEO D. Purification, composition and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immunity* 1987; **57**: 3142–3146.
- [17] HECK LW, ROSTAND KS, HUNTER FA, BHOWN A. Isolation, characterisation, and amino-terminal amino acid sequence analysis of human neutrophil cathepsin G from normal donors. *Anal Biochem* 1986; **158**: 217–227.
- [18] HOVDE CJ, HOLMES BH. Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1986; **54**: 142–146.
- [18a] KANTORSKI J, ZEMAN K. System tlenowego zabijania mikroorganizmów przez neutrofile. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 361–377.
- [19] LIMA MF, KIERSZENBAUM J. Lactoferrin effects on phagocytic cell function. I. Increased uptake and killing of an intracellular parasite by murine macrophages and human monocytes. *J Immunol* 1985; **134**: 4176–4183.
- [20] LEHRER RI, GANZ T, SELSTED ME. Oxygen-independent bactericidal systems. Mechanisms and disorders. *Hematol Oncol Clin N Amer* 1988; **2**: 159–169.
- [21] LEIJH PCJ, van der BARSEAAR MT, DUBBELDEMAN-REMPT I, van FURTH R. Kinetics of intracellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes. *Eur J Immunol* 1980; **10**: 750–757.
- [22] LOMAX KJ, GALLIN JI, ROTROSEN D, RAPHAEL GD, KALINER MA, BENZ EJ, BOXER LA, MALECH LA. Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency. *J Clin Invest* 1989; **83**: 514–519.
- [23] MALECH HL, GALLIN JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987; **317**: 687–694.
- [24] MARQUIS A, MONTPLAISIS S, GARZON S, STRYKOWSKI H, AUGER P. Fungitoxicity of muramidase: ultrastructural damage to *Candida albicans*. *Lab Invest* 1982; **46**: 627–636.
- [25] MIYAUCHI J, WATANABE Y. Immunocytochemical localization of lactoferrin in human neutrophils. An ultrastructural and morphometrical study. *Cell Tissue Res* 1987; **247**: 249–258.
- [26] MILLER TE. Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid and lysozyme. *J Bacteriol* 1989; **98**: 949–955.

- [27] NISHIYA K, HORWITZ DA. Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1982; **129**: 2519.
- [28] ODEBERG HI, OLSSON I. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes. *J Clin Invest* 1975; **56**: 1118–1124.
- [29] PEREIRA HA, MARTIN LE, SPITZNAGEL JK. Quantitation of a cationic antimicrobial granule protein of human polymorphonuclear leukocytes by ELISA. *J Immunol Methods* 1989; **117**: 115–120.
- [30] REGISTER KB, DAVIS CH, WYRICK PB, SHAFER WM, SPITZNAGEL JK. Nonoxidative antimicrobial effects of human polymorphonuclear leukocyte granule proteins on *Chlamydia* spp. in vitro. *Infect Immun* 1987; **55**: 2420–2427.
- [31] RICE WG, GANZ T, KINKADE JM, SELSTED ME, LEHRER RI, PARMLEY RT. Defensins-rich dense granules of human neutrophils. *Blood* 1987; **70**: 757–765.
- [32] ROTROSEN D, GALLIN JI. Disorders of phagocyte function. *Ann Rev Immunol* 1987; **5**: 127–150.
- [33] SALVESEN G, FARLEY D, SHUMAN J, PRZYBYLA A, REILLY C, TRAVIS J. Molecular cloning of human cathepsin G structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochemistry* 1987; **26**: 2289–2293.
- [34] SEGAL AW, GEISOW M, GARCIA R, HARPER A, MILLER R. The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* 1981; **290**: 406–469.
- [35] SELAK MA, CHIGNARD M, SMITH JB. Cathepsin G is strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem J* 1988; **251**: 293–299.
- [36] SELSTED ME, HARWIG SL, GANZ T, SCHILLING JW, LEHRER RI. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* 1985; **76**: 1436–1439.
- [37] SENIOR RM, CAMPBELL EJ. Cathepsin G in human mononuclear phagocytes: comparison between monocytes and U937 monocyte-like line. *J Immunol* 1984; **132**: 2547–2551.
- [38] SHAFER WM, MARTIN LE, SPITZNAGEL JK. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect Immun* 1984; **45**: 29–35.
- [39] STROMINGER JL, GHUYSEN JM. Mechanisms of enzymatic bacteriolysis: cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or of specific peptidases. *Science* 1967; **156**: 213–221.
- [40] TAKEUCHI KH, SWANK RT. Inhibitors of elastase and cathepsin G in Chediak-Higashi (Beige) neutrophils. *J Biol Chemistry* 1989; **264**: 7431–7436.
- [41] THOMAS EL, GRISHAM MB, JEFFERSON MM. Cytotoxicity of chloramines. *Methods Enzymol* 1986; **132**: 585–593.
- [42] THOMAS EL, LEHRER RI, REST RF. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 1988; **10**: 450–456.
- [43] THORNE KJ, OLIVER RC, BARRET AJ. Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases. *Infect Immunity* 1976; **14**: 555–563.
- [44] TRAVIS J. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am J Med* 1988; **84**: 37–42.
- [45] Van STRIJP JA, van KESSEL KP, van der TOL ME, FLUIT AC, SNIPPE H, VERHOEF J. Phagocytosis of herpes simplex virus by human granulocytes and monocytes. *Arch Virol* 1989; **104**: 287–298.
- [46] VILJANEN P, KOSKI P, VAARA M. Effect of small cationic leukocyte peptides (defensins) on the permeability barrier of the outer membrane. *Infect Immun* 1988; **56**: 2324–2329.
- [47] WEISS J, OLSSON I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils. *Blood* 1987; **69**: 652–659.
- [48] WEISS J, VICTOR M, STENDHAL O, ELSBACH P. O₂-independent intracellular and O₂-dependent extracellular killing of *Escherichia coli* S15 by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1985; **76**: 206–212.
- [49] WILDE CG, GRIFFITH JE, MARRA MN, SNABLE JL, SCOTT RW. Purification and characterization of human neutrophil peptide 4 a novel member of the defensin family. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11200–11203.
- [50] YAMADA Y, AMAGASAKI T, JACOBSEN DW, GREEN R. Lactoferrin binding by leukemia cell lines. *Blood* 1987; **70**: 264–270.
- [51] ZERIAL A, SKERLAVAJ B, GENNARO R, ROMEO D. Inactivation of herpes simplex virus by protein components of bovine neutrophil granules. *Antiviral Res* 1987; **7**: 341–352.

Otrzymano i przyjęto: 10 listopada 1990
Adres autorów: Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź

BECTON DICKINSON

Becton Dickinson GmbH

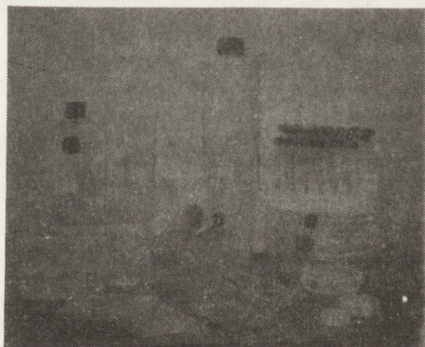
Tullastraße 8-12
6900 Heidelberg 1
Telefon: (0 62 21) 305-0
Telefax: (0 62 21) 30 52 16

Przedstawicielstwo w Polsce:

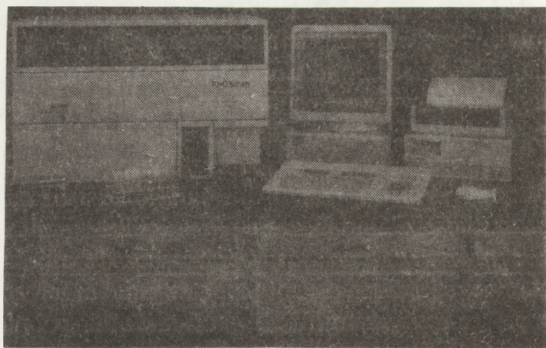
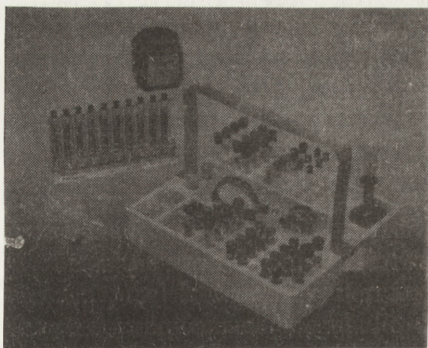
PHZ TRANSPOL S. A.
ul. Stawki 2, 00-193 Warszawa
Telefon: (02) 635 61 32 Telexy: 812366
Telefax: (02) 635 51 76 813844

Istniejąca od 1897 roku firma
BECTON DICKINSON
jest jednym z największych dostawców
produktów medycznych i diagnostycznych.

Dzięki nieustannym pracom naukowo-badaw-
czym firma oferuje najwyższej jakości produkty,
a także zapewnia szybki i niezawodny serwis.



System pobierania krwi: VACUTAINER
Wirówkowe oznaczanie krwi: QBC
Immunochemia: DIRECTIGEN
Immunocytochemia: FACSCAN, FACSTAR
Mikrobiologia:
- *podłoża:* GASPAK, SENSI DISC,
BACTEC, SCEPTOR
- *przeciwciała klonalne*
Produkty do hodowli tkanek: FALCON



INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1. Artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych).

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

3. Doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach maszynopisu z kilkoma pozycjami bibliograficznymi ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jedностronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNİLICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E, red. Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie prosimy zastępować raczej rysunkami, ale jeżeli są niezbędne, powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w zmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

TREŚĆ

JACKOWSKI G., SCHNEIDER J. Kompleksy anten energetycznych tylakoidów	289
SAKOWICZ T. Sekwencje powtarzające się w genomach roślinnych	301
KOZŁOWSKA K., KILKOWSKA-CHADZY PANAGIOTIS K. Desmosomy punktowe i ich struktura molekularna	313
KAWIAK J. Regulacja cyklu mitotycznego	325
CZYŻEWSKA K. Budowa i funkcja mezotelium ssaków	335
LUBIŃSKI J., PTASZYŃSKI K. Badania molekularno-genetyczne w diagnostyce chłoniaków	353
KANTORSKI J., ZEMAN K. System tlenowego zabijania mikroorganizmów przez neutrofile	361
KANTORSKI J., ZEMAN K. Pozatlenowe mechanizmy zabijania mikroorganizmów przez neutrofile	379

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1991

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1991 r na nowe konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.
 Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 180 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 80 000 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.
Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705