

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 18-NR 1'91
(1-76)

**RECEPTORY GRANULOCYTÓW
OBOJĘTNOCHŁONNYCH (NEUTROFILI)
KRWI OBWODOWEJ**

**I. CHARAKTERYSTYKA STRUKTURY
I BIOLOGICZNEJ FUNKCJI RECEPTORÓW**

**SURFACE RECEPTORS
ON THE HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES
I. CHARACTERIZATION OF STRUCTURE
AND BIOLOGICAL EFFECTS OF THE RECEPTORS**

Krzysztof ZEMAN, Ewa MAJEWSKA

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

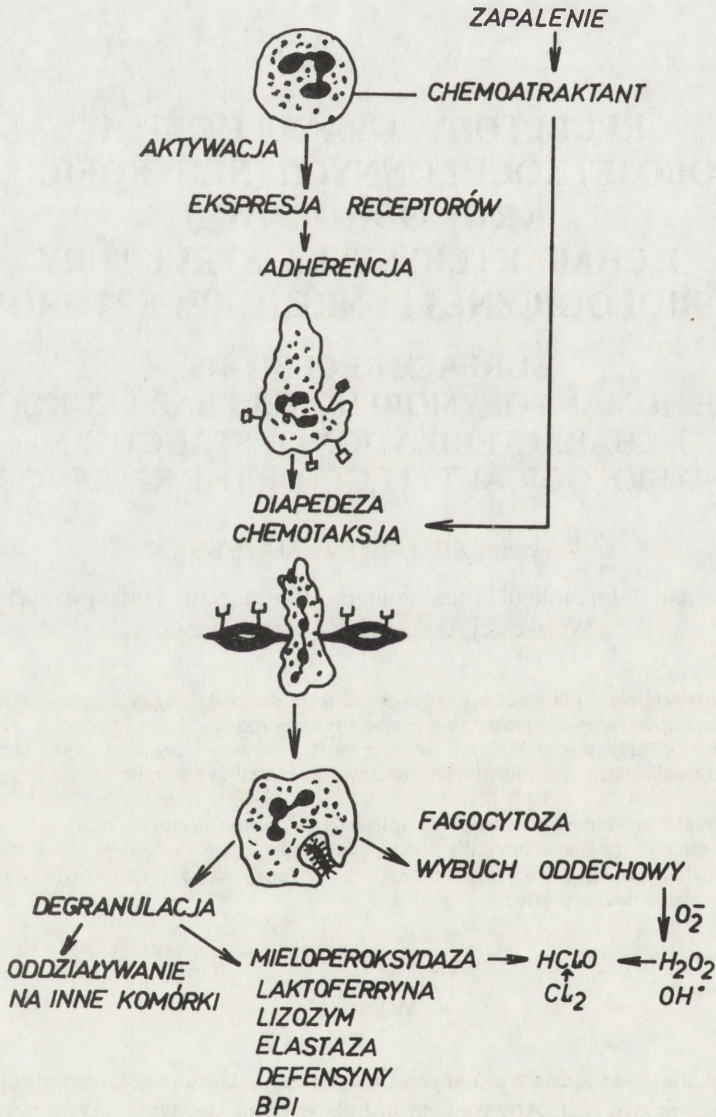
Streszczenie. Aktywacja neutrofilów może być indukowana w drodze reakcji ligandu ze swoistym receptorem. Pobudzenie receptorów warunkuje prawidłowy przebieg takich procesów, jak: chemotaksja, adhezja, diapedeza, fagocytoza i degranulacja. Niniejsza praca omawia podstawowe zagadnienia dotyczące struktury i ekspresji receptorów ludzkich neutrofilów oraz ich znaczenie dla funkcji tych komórek.

Summary. Neutrophil activation can be triggered by ligands for specific membrane receptors. These receptors are involved in some of the functions of the neutrophils such as chemotaxis, aggregation, diapedesis, phagocytosis, degranulation and free radical production. Our review analyzed the structure of the neutrophil surface receptor molecules and their activation.

WSTĘP

Neutrofile stanowią jedną z głównych linii obrony ustroju przeciwko patogenom bakteryjnym i grzybiczym [23]. Aby funkcja ta była w pełni sprawnie wykonywana, istnieją idealnie zharmonizowane z zachodzącymi zmianami biochemicznymi sekwencje kolejno następujących po sobie czynności komórki, z których część wymaga współdziałania z

innymi komponentami układu odpornościowego. Najważniejsze z tych czynności to umiejętność wykrywania gradientu chemotaktycznego, adhezja do powierzchni komórek śródbłonna i tkanki łącznej, diapedeza przez ściany naczyń do miejsca zapalenia, rozpoznanie i fagocytoza opsonizowanych cząstek, fuzja ziarnistości lizosomalnych z fagosomem, a następnie destrukcja pochłoniętego materiału zachodząca w następstwie tlenowo-zależnego bądź niezależnego mechanizmu (rys. w zał.) [23, 37].



RYSUNEK. Repertuar funkcji neutrofila w odpowiedzi na czynnik chemotaktyczny generowany w miejscu zapalenia

Dla prawidłowego przebiegu wyżej wymienionych funkcji niezbędne są struktury receptorowe znajdujące się bądź na powierzchni lub też w strukturach wewnątrzkomórkowych neutrofila [34, 54]. Badania receptorów neutrofila dostarczają nowych danych przydatnych dla zrozumienia procesów przekazywania sygnałów niezbędnych dla aktywacji i funkcji komórek. Zdolność neutrofila do zmiany ekspresji i powinowactwa ich powierzchniowych receptorów staje się podstawowym wykładnikiem aktywacji komórki i aktualnego stanu jej pobudzenia.

RECEPTORY CHEMOTAKTYCZNE

Neutrofile wędrują do ognisk zapalnych w odpowiedzi na substancje chemotaktyczne tam powstające. Substancje owe są wytwarzane przez bakterie (np. formylowane białka ściany komórkowej), neutrofile lub makrofagi z miejsc zapalnych (LTB_4), a także powstają jako skutek aktywacji komplementu (C5a) [23, 37]. Choć receptory dla fMLP (patrz podrozdz. 1), C5a czy LTB_4 różnią się od siebie, odpowiedź komórek na każdy z tych ligandów jest podobna: następuje aktywacja chemotaksji, wzrost przylegania do śródbłonna, uwolnienie zawartości ziarnistości specyficznych i zapoczątkowanie wybuchu oddechowego neutrofila [52].

RECEPTOR DLA N-FORMYL-METHIONYL-LEUCYL-PHENYLALANINY (fMPL)

N-formylowane oligopeptydy są grupą chemotaktycznych dla neutrofila czynników, które początkowo izolowano z nadsączy hodowli bakteryjnych (głównie *E. coli*). fMLP – syntetyczny peptyd jest powszechnie uważany za najlepszego reprezentanta jego biologicznych odpowiedników [70]. Indukuje on procesy aktywacji neutrofila wykazując obok indukcji chemotaksji działanie na takie funkcje tych komórek, jak: degranulacja, generowanie rodników ponadtlenkowych czy uwalnianie metabolitów cyklu przemian kwasu arachidonowego [70]. Wykazano również, że fMLP w dawkach działających chemotaktycznie (10^{-8} M) nasila proces fagocytozy, sekrecję laktoferyny i transkobalaminy z ziarnistości wtórnych, a także agregację i adhezję neutrofila do śródbłonna. Indukowana przez fMLP odpowiedź neutrofila wykazuje ścisłą strukturalno-funkcjonalną współzależność. Teza ta została potwierdzona przez zastosowanie znakowanego izotopem fMLP w typowej metodzie polegającej na ocenie wiązania ligandu przez komórkę docelową oraz izolacji związanego z błoną komórkową receptora, co pozwoliło na jego dokładniejszą charakterystykę [2, 70].

Właściwości fizyko-chemiczne i ekspresja receptora dla fMLP są przedmiotem licznych doniesień różniących się niekiedy nawet podstawowymi danymi zarówno na temat ekspresji, stałej dysocjacji, jak i różnych form powinowactwa. Być może rozbieżności te wynikają z różnych metod i warunków izolacji neutrofila z krwi obwodowej [70]. Wykazano, że receptor dla fMLP jest integralnym białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 50–70 kDa, składającym się z dwóch form o punktach izoelektrycznych (pI) odpowiednio 6,0 i 6,5 [2]. Jest glikoproteiną zawierającą dwa N-związane, oligocukrowe łańcuchy, które po usunięciu powodują redukcję M_r najpierw do 40–45 kDa, a następnie do 33 kDa. W pełni

zdeglikozylowana forma wykazuje różnice w pI w stosunku do formy z komponentą cukrową i być może jest izoformą receptora o takim samym powinowactwie [2]. Mimo wcześniej podkreślonych rozbieżności przyjmuje się, że w strukturze błony znajduje się około 6×10^4 receptorów i taka sama ilość rozmieszczona jest także wewnątrzkomórkowo (receptor 50–70 kDa i fragment 24 kDa w ziarnistościach specyficznych, izoforma 33–35 kDa w obrębie aparatu Golgiego). Wspólnie stanowi to zaledwie 12×10^{-15} g receptorowego białka jednej komórki. Większość autorów nie kwestionuje istnienia dwóch form receptora: o wysokim i niskim powinowactwie i stałej równowagi dysocjacji od 0,0034 do 210 nM [2]. Bardziej szczegółowe badania struktury receptora dla fMLP wskazują, że jego forma pozbawiona części cukrowej (33 kDa), a także fragment receptora o $M_r = 35$ kDa i uzyskany po trawieniu papainą fragment 29–31 kDa mają nie tylko zdolność do wiązania ligandu, ale także same wykazują działanie biologiczne na neutrofile np. uwalniając z nich β -glukuronidazę [2].

Połączenie się czynnika chemotaktycznego ze specyficznym dla niego receptorem indukuje szybkie zmiany w cytoszkielecie komórki i jej elementach kurczliwych. Jedną z najwcześniej obserwowanych zmian morfologicznych jest rozwinięcie się w ciągu 2–5 s bogatych w mikrofilamenty pseudopodiów (podczas adhezji do substratu) lub całkowite pofałdowanie i pomarszczenie błony komórkowej powodujące zwiększenie jej powierzchni o ok. 25% (jeśli komórka znajduje się w zawieszynie). Zmiany te są ściśle związane z zachodzącą wówczas polimeryzacją aktyny. Receptory "spoczynkowych" neutrofilii są rozmieszczone izotropowo na powierzchni błony komórkowej. Po przyjęciu i przekazaniu sygnału chemotaktycznego dochodzi do modulacji powinowactwa receptorów i zmian w ich rozmieszczeniu, co jest wynikiem procesów polaryzacji komórki. Jest to niezbędne dla ustawienia się komórki i utrzymywania jej prawidłowego kierunku w stronę gradientu chemotaktycznego [33a]. Zmiana rozmieszczenia receptorów powierzchniowych i nowych, przesuniętych z puli wewnątrzkomórkowej powoduje zmianę kształtu neutrofila. Komórka ma wówczas najbardziej wrażliwe na stymulację pofałdowane czoło, śródregion zawierający jądro komórkowe i mający największą gęstość receptorów i zawężony ogon z pojedynczymi receptorami. Tak przygotowany neutrofil jest gotowy do adhezji i lokomocji [33a].

RECEPTORY DLA LEUKOTRIENÓW

Leukotrieny są metabolitami kwasu arachidonowego powstającymi w wyniku 5-lipooksygenacji. Po raz pierwszy zostały wyizolowane z leukocytów (stąd ich nazwa), ale zdolność do ich produkcji mają również erythrocyty, komórki tuczne, płytki krwi. Badania nad biologiczną rolą leukotrienów koncentrują się na ich potencjalizującej roli w astmie i zapaleniu. LTC₄, D₄, E₄, F₄ są głównymi składowymi substancji wolnoreagującej w anafilaksji [26]. I chociaż nie mają bezpośredniego wpływu na funkcje neutrofilii, wykazano, że są w stanie zmniejszać adhezję tych ostatnich do syntetycznych powierzchni, a także hamować ich degranulację i chemotaksję indukowaną przez LTB₄ [26]. Ten właśnie leukotrien spełnia szczególną rolę w procesie zapalnym, zwłaszcza w etapach związanych z diapedezą, akumulacją i aktywacją neutrofilii. Podstawową właściwością LTB₄ jest silne działanie chemotaktyczne na neutrofile. Donaczyniowe podanie królikowi tego leukotrienu indukuje szybką, odwracalną neutropenię spowodowaną wzrostem przylegania neutrofilii do endotelium poprzedzającym diapedezę przez ścianę naczyń [7, 28]. Podobnie jak

inne czynniki chemotaktyczne (np. C5a) LTB₄ jest w stanie aktywować sekrecję enzymów lizosomalnych z neutrofilii, jak również wzmacniać produkcję i wydzielanie anionów nadtlenkowych i H₂O₂. Z drugiej strony inne mediatory procesu zapalnego, takie jak fMLP czy PAF (patrz podrozdz. trzeci) nasilają wydzielanie LTB₄ przez granulocyty [7, 26].

Leukotrieny mają zdolność wpływania na funkcję i stan czynnościowy neutrofilii dzięki obecności na tych komórkach specyficznych receptorów. Wykazano istnienie dwóch populacji receptorów dla LTB₄ o różnym powinowactwie [26, 28]. Receptor o wysokim powinowactwie, gęstości 4400/komórkę i K_d = 0,4 nM związany jest z frakcją błonową granulocytów, a pobudzany przez nanomolarne stężenia LTB₄. Jego pobudzenie nasila chemotaksję i adhezję granulocytów, a procesowi temu towarzyszą zmiany w poziomie wewnątrzkomórkowego Ca²⁺. Procesy degranulacji, sekrecji enzymów lizosomalnych i generowania nadtlenków warunkowane są pobudzeniem receptorów o niskim powinowactwie występujących w ilości 270 000/komórkę. Są to białka o Mr = 60 kDa i K_d = 61 nM. Receptory o wysokim powinowactwie stanowią kompleks takiego właśnie białka o Mr = 60 kDa związanego z nukleotydem guaninowym o Mr = 40 kDa [28]. Wykazano ujemną kooperatywność pomiędzy ekspresją receptora o dużym powinowactwie a metabolizmem LTB₄ w cytoplazmie.

Obok omawianych wyżej receptorów dla LTB₄ udało się wykazać także istnienie na powierzchni neutrofilii receptorów dla LTC₄ występujących w ilości 11000/komórkę i o K_d = 34,3 nM. Trzecia część tych receptorów związana jest z strukturami błonowymi, pozostała część z ziarnistościami lizosomalnymi. Receptory te warunkują rozpoznanie przez neutrofile specyficznych sygnałów pochodzących z innych komórek zdolnych do modyfikowania ich funkcji [4].

RECEPTOR DLA CZYNNIKA AKTYWUJĄCEGO PŁYTKI (PAF)

Czynnik aktywujący płytki jest fosfolipidem zdolnym do wywierania efektu biologicznego w dawkach subnanomolarnych. Szczególnie silnie wpływa na wzrost wydzielania przez leukocyty i płytki mediatorów zapalenia, takich jak: proteazy, histamina, serotonina, pochodne kwasu arachidonowego [6]. Oddziałuje także na funkcje neutrofilii aktywując ich chemotaksję, adhezję, produkcję rodników nadtlenkowych i wydzielanie enzymów [73]. Z kolei neutrofile po stymulacji zymosanem, C5a lub fMLP produkują aktywny biologicznie PAF [6]. Nie jest on magazynowany w neutrofilach w postaci aktywnego fosfolipidu, ale bardzo szybko dochodzi do jego syntezy po stymulacji komórki.

Neutrofile nie tylko syntetyzują PAF, ale mają swoje dla niego receptory, poprzez które wpływa on na ich funkcje. Wykazano istnienie dwóch typów receptora dla PAF: o dużym i małym powinowactwie. Typ receptorów o dużym powinowactwie i K_d = 0,11 nM występuje w ilości ok. 5x10⁶ na komórce. Receptory te są specyficzne dla fosfolipidów (zawierających jedno z dwóch wiązań kowalencyjnych α) oraz dla krótkiego łańcucha β kwasów tłuszczowych i nie wykazują stereospecyficzności [73]. Tym tłumaczy się, że inne czynniki chemotaktyczne (fMLP, C5a, LTB₄) w optymalnych dawkach hamują wiązanie znakowanego izotopem czynnika aktywującego płytki z neutrofilami. Drugi typ receptorów dla PAF o niskim powinowactwie, ale większej zdolności łączenia się z ligandem wykazuje odmienny niż inne receptory system przenoszenia aktywności biologicznej czynnika do struktur subkomórkowych neutrofilii. Nie wyklucza się także istnienia swoistego dla PAF

systemu białek transportowych odpowiedzialnych za transport i sekwestrację czynnika w błonach subkomórkowych.

RECEPTOR DLA SKŁADOWEJ C5a DOPEŁNIACZA

C5a jest polipeptydem składającym się z 74 aminokwasów. Ma działanie anafilotoksyny, zapoczątkowuje proces zapalny i bierze udział w jego przebiegu prowadząc do degranulacji komórek tucznych i bazofili. Duże ilości C5a powstają w przebiegu alternatywnej aktywacji dopełniacza wywołanej np. hemodializą, urazem, zapaleniem trzustki. C5a wykazuje silne właściwości chemotaktyczne w stosunku do neutrofilii. Obecność specyficznego receptora dla C5a na neutrofilach wykazano już w latach siedemdziesiątych. Jest to białko o $M_r = 40-80$ kDa i stałej dysocjacji ok. 2 nM w 0°C występujące w ilości 100–300 tysięcy na komórce [30]. W 37°C kompleks C5a-receptor ulega szybkiej internalizacji [11].

RECEPTORY DLA CYTOKIN

Badania kilku ostatnich lat wykazały, że liczne cytokiny mające podstawowe znaczenie dla odpowiedzi immunologicznej są silnymi aktywatorami dojrzałych granulocytów. IL-1, TNF, G-CSF, GM-CSF czy IFN- τ mogą być uwalniane *in vivo* w odpowiedzi na infekcję bakteryjną lub zapalenie i współuczestniczą nie tylko w obronie gospodarza przeciwko atakującym mikroorganizmom, ale także pośrednio poprzez wpływ na niektóre funkcje neutrofilii biorą udział w procesach destrukcji tkanek.

RECEPTOR DLA INTERLEUKINY 1

Interleukina 1 (IL-1), polipeptyd o masie 14–17 kDa jest syntetyzowany i wydzielany przez makrofagi oraz prawdopodobnie inne komórki znajdujące się w miejscach zapalnych [53, 65], m.in. neutrofile mają wykazywać zdolność do produkcji form α i β tej cytokiny [27].

Obiektem zainteresowań szeregu laboratoriów jest wpływ IL-1 na neutrofile. Ustalono, że oczyszczona ludzka IL-1 stymuluje uwalnianie enzymów z ziarnistości specyficznych i produkcję ponadtlenków [65]. Wykazano także jej działanie chemotaktyczne. Rozbieżne są doniesienia na temat wpływu rekombinatów IL-1 (rIL-1) na funkcje neutrofilii. Obok doniesień o braku jakiegokolwiek wpływu istnieją dobrze udokumentowane prace, które wykazują działanie chemotaktyczne (0,1–10 ng/ml), synergizm z opsonizowanym zymosanem w indukcji produkcji O_2^- czy selektywną degranulację ziarnistości specyficznych. Warto tu również wspomnieć, że iniekcja rIL-1 u zwierząt doświadczalnych doprowadza do gromadzenia neutrofilii w miejscu iniekcji.

Udowodniono, że neutrofile mają receptory o wysokim powinowactwie dla rIL-1- α [48, 53]. Receptory te mogą wiązać zarówno formę alfa, jak i beta [48]. Wiązanie tego receptora jest szybkie: 50% maksymalnego wysycenia występuje już po 20 min. Gęstość receptora ustalono na 700–900/komórkę, $K_d = 0,28$ nM [48, 53]. Masa cząsteczkowa receptora dla IL-1 na ludzkich neutrofilach mieści się w granicach 60–70 kDa [53]. Badania autoradiograficzne wskazują na jego lokalizację w jądrze komórki (podobnie jak w limfocytach T),

co jest dość intrygującą obserwacją, zwłaszcza że neutrofil jest komórką o ostatecznym zróżnicowaniu [53].

RECEPTORY DLA INTERLEUKINY-8 (IL-8)

Nowo opisana cytokina Il-8 (MDNCF, MONAP, NAP-1) wyizolowana została z monocytów traktowanych lipopolisacharydem (LPS). Masę cząsteczkową określono na 8000 daltonów. TNF i Il-1 są silnymi stymulatorami jej produkcji. Jak wykazano, oprócz monocytów zdolność do jej uwalniania mają również komórki śródbłonkowe, fibroblasty i makrofagi płucne [3]. Interleukina 8 wykazuje silną aktywność chemotaktyczną dla neutrofilii, powoduje także uwalnianie enzymów lizosomalnych i indukcję wybuchu oddechowego. Rekombinowany i syntetyczny odpowiednik wykazują identyczną aktywność biologiczną [3].

Receptory dla Il-8 zlokalizowano na ludzkich neutrofilach, a także komórkach takich linii, jak: U937, THP-1, HL-60. Dane co do gęstości i powinowactwa receptora są rozbieżne, co wynika najprawdopodobniej z różnic w zastosowanych technikach. Jedna z grup badawczych określa masę receptora na 58 kDa. Komórka ma ok. 75 000 miejsc receptorowych wykazujących duże powinowactwo ($K_d = 4$ nM). Inne dane wykazują zbliżone parametry charakteryzujące receptor dla Il-8 ($K_d = 0,8$ nM, gęstość 20 000/komórkę) bądź też istnienie receptorów o dużym ($K_d = 750$ pM i gęstość 34 000) i niskim powinowactwie ($K_d = 19$ pM, gęstość 5200) wraz z mechanizmem własnej autoregulacji gęstości miejsc receptorowych [57].

RECEPTOR DLA TNF- α

Czynnik indukujący krwotoczną martwicę guza (*tumor necrosis factor*, kachektyna, TNF) jest proteiną o $M_r = 17$ kDa produkowaną i wydzielaną przez aktywowane endotoksyną monocyty i makrofagi, wykazującą także wpływ na funkcje komórek prawidłowych [61]. Mimo obiecujących wyników w badaniach *in vivo* cytostatyczny i cytotoksyczny wpływ TNF na wiele linii nowotworowych nie zawsze udaje się wykazać *in vitro*, włączając w to i te komórki, które są wrażliwe *in vivo*. Sugeruje to, że mechanizm działania TNF polega na indukowaniu innych czynników bądź komórek [62]. Ponieważ neutrofile inkubowane z TNF okazują się być wysoce cytostatyczne i cytotoksyczne dla wielu linii nowotworowych, kooperacja tych komórek z TNF staje się przedmiotem badań wielu wyspecjalizowanych ośrodków [62]. Wykazano, że TNF stymuluje adhezję, fagocytozę, powoduje wzrost produkcji anionów nadtlenkowych [47], a także degranulację ziarnistości specyficznych nie wpływając na uwalnianie zawartości ziarnistości pierwotnych [19]. Niektórzy uważają, że ma zdolność do indukcji selektywnej sekrecji laktoferyny z ziarnistości specyficznych [55]. TNF działa hamująco na proces migracji neutrofilii pod wpływem gradientu fMLP [19]. Pod wpływem tej cytokiny neutrofile wykazują zwiększoną ekspresję receptorów CR3, CR1 i p.150,95 (CR4) (patrz podrozdz.1 rozdz. 5), co związane jest ze wzrostem ich syntezy i mobilizacją z puli wewnątrzkomórkowej do powierzchni komórki [51].

TNF- α wpływa na funkcje komórek przez łączenie się ze specyficznym dla siebie receptorem na ich powierzchni ulegając następnie szybkiej endocytozie i degradacji we wnętrzu komórki. Spośród komórek układu krwiotwórczego neutrofile mają najwięcej receptorów dla tej cytokiny [61]. Ilość receptorów na jednym neutrofile oceniana się na 6000, 2200 lub 1200, a stałe dysocjacji odpowiednio 1,37 nM, 2×10^{-10} M i $4,9 \times 10^{-10}$ M (zależnie

od źródła) [51, 61]. Różnice wynikają z zastosowania naturalnego lub uzyskanego drogą rekombinacji czynnika. Receptor o wysokim powinowactwie jest wspólny dla TNF- α i TNF- β [1], co nie jest dziwne biorąc pod uwagę 30% homologii sekwencji aminokwasowej i podobny, choć słabiej wyrażony przez TNF- β wpływ na funkcje neutrofilii [19].

RECEPTOR DLA G-CSF I GM-CSF

Działanie tych cytokin (hormonów) polega przede wszystkim na regulowaniu hemopoety. Odbywa się to poprzez wzajemne potęgowanie się procesów związanych z wybiórczym zanikaniem i pojawianiem się nowych receptorów. Różnicowanie się komórki wielopotencjalnej w kierunku erytro- i megakariopoety wiąże się z zanikaniem receptorów dla GM-CSF [10]. Różnicowanie w kierunku granulo- i makrofagopoety wiąże się z kolei ze wzrostem ekspresji receptorów dla GM-CSF, a następnie z pojawieniem się receptora dla układu makrofagów M-CSF lub granulocytów G-CSF [13].

Poza funkcjami hemopoetycznymi GM-CSF i G-CSF stymulują niektóre funkcje dojrzałych neutrofilii, eozynofili i makrofagów zmniejszając ich zdolność do migracji, a pobudzając: aktywność fagocytarną, ADCC, metabolizm tlenowy komórki oraz wpływają na ekspresję niektórych receptorów powierzchniowych, np. CD11b, co potencjalizuje agregację neutrofilii [13, 44, 46]. Cytokiny te potęgują także syntezę niektórych biologicznie aktywnych metabolitów [68]. W wymienionych procesach większą aktywność notuje się w stosunku do GM-CSF. Może on być syntetyzowany w miejscu zapalenia wskutek pobudzenia tkankowych makrofagów do produkcji TNF i IL-1, które nasilają jego syntezę [46]. Tak wyindukowany GM-CSF wpływa na migrujące neutrofile zatrzymując je w ognisku zapalnym. Wzmagając proliferację komórek hemopoetycznych pnia prowadzi jednocześnie do wzrostu produkcji dalszych granulocytów i makrofagów niezbędnych do zwalczania infekcji [45]. Wykazano także, iż GM-CSF może wpływać na syntezę wewnątrzkomórkową i indukację sekrecji G-CSF przez neutrofile, co drogą autoregulacji może oddziaływać na wielkość puli odpowiednich progenitorów [44].

Na krążących neutrofilach wykazano obecność receptora dla G-CSF o wysokim powinowactwie. Jest to jednołańcuchowe białko o Mr 150 kDa i stałej dysocjacji 250 pM. Pojedyncza komórka wykazuje obecność ok. 560 receptorów [72].

Najbardziej zróżnicowane neutrofile szpikowe i te znajdujące się we krwi obwodowej mają podobną ekspresję receptora dla GM-CSF [15]. Jest to jeden typ o wysokim powinowactwie ($K_d \approx 37\text{--}51$ pM) zajmujący 300–1000 miejsc na komórce. Mr ustalono na ok. 84 kDa. Ilość receptorów na komórkach linii HL-60, która odpowiada końcowo zróżnicowanym neutrofilom, wzrasta do 10 razy pod wpływem DMSO z wartości wyjściowych 20–450/komórkę [15]. Ponieważ istnienie receptora dla GM-CSF stwierdza się na komórkach wielu linii białaczkowych, dalsza jego molekularna charakterystyka może prowadzić do zrozumienia roli tej cytokiny w patogenezie procesów rozrostowych.

RECEPTOR DLA FRAGMENTU Fc IMMUNOGLOBULINY G

Receptor Fc dla IgG (Fc γ R) pojawia się na neutrofilach już we wczesnych stadiach ich różnicowania (promielocyty) [25]. Receptor ten odgrywa niezwykle istotną rolę w usuwa-

niu opłaszczonych przeciwciałem czynników infekcyjnych, co czyni go niezbędnym w procesach fagocytozy. Inna jego rola wiąże się z mechanizmami obrony przed komórkami nowotworowymi, bowiem cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC) wymaga rozpoznania opłaszczanego przeciwciałem celu przez receptor Fc na komórce efektorowej. Uzyskano przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko Fc γ R na ludzkich krwinkach białych, co pozwoliło udowodnić heterogenność receptora Fc i wykazać istnienie jego trzech form różniących się od siebie masą cząsteczkową, siłą ekspresji i rolą w procesach odpornościowych [18, 49]. Neutrofile wykazują ekspresję każdego z trzech typów receptora Fc (tab. 1), ale warto dodać, że posiadanie receptorów Fc pozwala wykazać heterogenność tych komórek korelującą z ich stanem czynnościowym [69].

TABELA 1. Receptory dla fragmentu Fc immunoglobuliny G na komórkach krwi

Receptor	Mr(kDa)	CD	MoAb	Dystrybucja
Fc γ RI	70	-	mAb32, 22, 197	monocyty, makrofagi, neutrofile + IFN γ , linie mieloidalne
Fc γ RII	40	CDw32	KuFc79, 2E1 C1KM5	monocyty, makrofagi, neutrofile, płytki, eozynofile, limf. B
Fc γ RIII	55-70	CD16	3G8, VEP13	neutrofile, LGL/NK eozynofile, makrofagi

RECEPTOR Fc γ RI

Receptor ten jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 70 kDa. Jako jedyny z trzech receptorów Fc ma wysokie powinowactwo dla wiązania monowalentnej IgG. Stałą dysocjacji ustalono na 10^{-8} – 10^{-9} dla ludzkiej IgG $_1$ i IgG $_2$ [33]. Trudno określić jest ilość miejsc receptorowych na komórkach, ponieważ zależy ona od warunków izolacji komórek i ich hodowli, obecności IgG oraz naturalnych cytokin, których działaniu komórki były poddane in vivo bądź in vitro. W przeciwnieństwie do dużych ilości receptorów Fc γ RI znajdujących się na makrofagach i monocytach, świeżo izolowane neutrofile mają ich nie więcej niż 1000 na jednej komórce [33]. Interesującą jest informacja, że po 18-godzinnej inkubacji neutrofile z interferonem γ (400 U/ml) liczba receptorów Fc γ RI wzrasta pięć do dwudziestu razy osiągając wartości 5000–20000 na komórce [18, 49]. Efektu takiego nie obserwowano pod wpływem takich cytokin, jak: TNF, GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6.

RECEPTOR Fc γ RII

Receptor, określane antygenem różnicowania CDw32, jest glikoproteiną o Mr = 40 kDa. Wykazano istnienie jego dwóch form, a przy zastosowaniu klonowania cDNA nawet trzech subtypów, z których wszystkie zajmują identyczny zewnątrzkomórkowy, ale różny cytoplazmatyczny region [18]. Wszystkie te formy mają słabe powinowactwo do monowalentnej IgG $_1$. Gęstość tego receptora na komórce jest znacznie większa niż Fc γ RI i wynosi 30000 do 60000 na komórce nie zmieniając się po inkubacji z cytokinami [31].

RECEPTOR Fc γ RIII (FcR $_{i0}$)

Receptor, określane antygenem różnicowania jako CD16, jest glikoproteiną o Mr = 55–70 kDa, ma niskie powinowactwo do monomerycznej IgG. Badania z cDNA dla

Fc γ RIII wskazują, że struktury białkowe receptora są związane z błoną neutrofila poprzez glikan fosfatydyloinozytolu (PIG) [63]. W dalszych badaniach wykazano także strukturalny polimorfizm i istnienie dwóch allotypowych form receptora na neutrofilach. Bardzo charakterystyczne są różnice w ekspresji tego receptora, gdyż neutrofile wykazują obecność 100–200 tys. molekuł na powierzchni komórki, podczas gdy monocyty nawet do 200 razy mniej [12].

RECEPTORY ADHEZYJNE

Zdolność neutrofilów do formowania agregatów i adhezji do komórek endotelium jest niezbędna dla migracji, diapedezy i fagocytozy. Bez prawidłowej adhezji komórki do komórki i komórek do endotelium nie istniałyby warunki dla prawidłowego przebiegu procesu zapalnego. Adherencja neutrofilów do śródbłonka jest warunkowana mechanizmami zależnymi od śródbłonka i mechanizmami związanymi ze strukturami granulocytarnymi. Mechanizmy zależne od śródbłonka to głównie indukcja przez trombinę, leukotrieny czy TNF lub LPS ekspresji powierzchniowych cząsteczek, tzw. E-LAM (*endothelial-leukocyte adhesion molecules*) [16, 66]. Mechanizm zależny od neutrofilów to współdziałanie niektórych czynników białkowych (np. TNF, PAF) z powierzchniowymi cząsteczkami komórki.

KOMPLEKS CD11/CD18 (Leu-CAM)

Na powierzchni neutrofilów wykazano istnienie grupy trzech glikoprotein powiązanych ze sobą strukturalnie i funkcjonalnie (tab. 2).

Zalicza się do nich receptor dla iC3b komplementu – CR3 (CD11b), receptor LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*) (CD11a) i glikoproteiny określanej jako p150,95 (CD11c) [34, 54]. Ponieważ wszystkie trzy struktury są niezbędne w procesach adhezji

TABELA 2. Współzależności pomiędzy receptorami adhezyjnymi kompleksu CD11/CD18 a funkcją i rodzajem komórek, na których występują

Receptor	MoAb	CD	Funkcja	Komórki
LFA-1	TS1/22, L1, 1B4, 60.3	CD11a/CD18 (Leu-CAMa)	proliferaacja prod. Ig in vitro konjugaty adherencja agregacja	kom. T/monocyty kom. T i B CTL, LGL/monocyty limf./monocyty, neutrofile aktyw. limf. T i B, monocyty
CR3	Mac-1, Mo1, OKM-1,	CD11b/CD18 (Leu-CAMb)	adherencja agregacja chemotaksja ADCC fagocytoza	granulocyty neutrofile neutrofile neutrofile, monocyty, LGL neutrofile/monocyty
p150/95 (CR4)	Ki-M1	CD11c/CD18 (Leu-CAMc)	adherencja chemotaksja liza komórek fagocytoza	monocyty/neutrofile monocyty? CTL/LGL? makrofagi/monocyty?

a występują wspólnie na krwinkach białych, określa się je jako kompleks adhezyjny krwinek białych CD11/18 (*Leukocyte Adhesion Complex*). CR3 i p150,95 są obecne na powierzchni neutrofilów i monocytów, LFA-1 udaje się wykazać na powierzchni neutrofilów, monocytów, limfocytów T i B oraz komórkach NK [54]. Wszystkie te trzy struktury składają się z dwóch niekowalencyjnie sprzężonych ze sobą łańcuchów glikoproteinowych. Mniejszy łańcuch beta o masie 95 kDa (CD18) jest strukturalnie identyczny dla wszystkich trzech determinant antygenowych. Łańcuch alfa jest różny (CD11 a, b, c), a jego masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio 165 kDa dla CR3, 177 kDa dla LFA-1 i 150 kDa dla p150,95. Badania nad ich biosyntezą wykazały, że łańcuchy beta i alfa są syntetyzowane oddzielnie, następnie glikozylowane i łączone razem do powierzchni błony komórkowej [34, 54].

Radioimmunologiczne metody oznaczania ilościowego wykazują, że neutrofil ma ok. 65 000 molekuł CR3, 9000 molekuł LFA-1 i 7000 molekuł p150,95 [34, 54]. Badania ultrastrukturalne wykazały, że receptor dla CR3 jest magazynowany w ziarnistościach specyficznych, stosunkowo blisko powierzchni błony komórkowej i stymulacja komórki przez czynniki chemotaktyczne, związki forbolu (PMA) lub nawet warunki izolacji powodują szybki, 10–20-krotny wzrost ekspresji receptora na powierzchni komórki.

Adherencja neutrofilów do śródbłonnka naczyniowego może zachodzić zależnie od neutrofilów lub zależnie od śródbłonnka. Adhezja zależna od neutrofilów ma miejsce wówczas, gdy poddane są one stymulacji fMLP lub cytokinami. Ten typ adhezji warunkowany jest interakcją między CD11b/CD18 z ligandem na powierzchni komórek endotelium ICAM-1 (*intracellular adherence molecule-1*), który pierwotnie zidentyfikowano jako ligand dla LFA-1 [16, 66]. Wykazano w tym typie adherencji wzrost ekspresji CR3 i p150,95 pod wpływem stymulacji PAF i fMLP. Drugi typ adhezji obejmuje szybkie, niezależne od syntezy białka wzmoczenie ekspresji powierzchniowych adhezyjnych cząsteczek na komórkach śródbłonnka indukowane przez trombinę i leukotrieny oraz świeżo syntetyzowanych protein po stymulacji LPS i cytokinami [5]. Zachodząca wówczas adhezja neutrofilów jest w części zależna od kompleksu CD11/CD18, podczas gdy adhezja indukowana aktywacją śródbłonnka przez trombinę nie zależy od tego kompleksu [16]. Opisywane procesy adhezji mimo intensywnych badań są zjawiskiem nie do końca wyjaśnionym.

RECEPTOR DLA FIBRONEKTyny

Fibronektyna (Fn) jest adhezyjną makroglikoproteiną o masie cząsteczkowej 440 kDa, występującą w osoczu krwi, zrębie tkanki łącznej i powierzchni niektórych komórek. Mimo że nie określono dokładnie charakteru i natury receptora dla fibronektyny na neutrofilach, istnieją niezaprzeczone dowody na jego obecność. Wiadomo, że komórkowy receptor dla fibronektyny rozpoznaje (niezależnie od rodzaju komórki, na której się znajduje) ten sam obszar w cząsteczce fibronektyny składającej się z sekwencji Arg-Gly-Asp-Ser [74]. Wykazano, że neutrofile mają zdolność do produkcji Fn. Jest ona produkowana przez dojrzewające komórki, a magazynowana w błonie komórkowej i strukturach wewnątrzkomórkowych. Dojrzałe neutrofile nie syntetyzują Fn, a mogą ją jedynie wydzielać do środowiska. Sekrecja ta wzrasta po stymulacji komórek fMLP i osiąga maksimum po 1 godzinie [39]. Fn obok amyloidu P i laminy jest główną składową tzw. zewnątrzkomórkowej matryks i odgrywa ważną rolę w procesie fagocytozy i adhezji neutrofilów [8]. Adhezja neutrofilów stymulowanych fMLP ulega zahamowaniu pod wpływem przeciwciał monoklonalnych przeciwko osoczowej Fn. Fn odgrywa także zasadniczą rolę przy potencjalizacji

fagocytozy, ale dopiero wówczas, gdy neutrofile po stymulacji fMLP lub C5a wejdą z nią w interakcję. Molekularny mechanizm warunkujący wzrost fagocytozy pod wpływem fibronektyny, wymagający poprzedniej stymulacji fMLP lub C5a, nie jest jasny [8].

RECEPTOR DLA LAMININY

Jednym z czynników warunkujących proces adhezji indukowanych PMA lub fMLP neutrofile do błon podstawnych innych komórek jest ich interakcja z lamininą. Jest ona glikoproteiną o masie cząsteczkowej 800–1000 kDa, występującą w podstawie wszystkich błon komórkowych [71]. Ma ona funkcjonalną i strukturalną zdolność do wiązania się z innymi kompleksami zewnątrzkomórkowej matriks, a także z receptorami powierzchniowymi komórek, takich jak: komórki ludzkiego raka sutka, komórki czerniaka. Receptor dla lamininy na tych komórkach jest białkiem o $M_r = 68\text{--}72$ kDa. Istnieje także bakteryjny receptor dla lamininy o $M_r = 50$ kDa [36]. Wykazano, że także neutrofile mają swoisty dla lamininy receptor, którego ekspresja na ich powierzchni ujawnia się po stymulacji komórek dużymi dawkami (sekrecyjnymi) fMLP lub PMA. W niepobudzonych neutrofilach receptor ten, będący białkiem o $M_r = 68$ kDa jest magazynowany w ziarnistościach specyficznych, a pod wpływem stymulacji ulega przemieszczeniu do powierzchni komórki [75].

RECEPTORY STYMULUJĄCE CYKLAZĘ ADENYLOWĄ

RECEPTORY ADRENERGICZNE

Katecholaminy: norepinefryna i epinefryna regulują wiele fizjologicznych zjawisk w organizmie ludzkim. Odpowiedź na katecholaminy jest regulowana przez ich wiązanie się na komórkach efektorowych ze specyficznymi miejscami receptorowymi (receptorami adrenergicznymi), które są odpowiedzialne za zapoczątkowanie dekodowania informacji płynącej do komórki [41, 42]. Badania z użyciem znakowanych izotopami agonistów i antagonistów katecholamin pozwoliły ustalić cztery typy receptorów adrenergicznych, a mianowicie α_1 , α_2 i aktywujące cyklazę adenylową β_1 , β_2 [41]. Wśród komórek krwi receptory α_2 znajdują się głównie na płytkach krwi, natomiast receptory β_2 zlokalizowane są wyłącznie na limfocytach i granulocytach [41, 42]. Gęstość receptorów β_2 na neutrofilach wynosi 1000 do 2000/komórkę. Liczba ich zmienia się wraz z wiekiem, a także w przebiegu kuracji hormonalnej lub w niektórych stanach chorobowych [67]. Stymulacja poprzez receptory β -adrenergiczne powoduje zahamowanie uwalniania enzymów lizosomalnych i produkcję ponadtlenków w odpowiedzi na fMLP, a stosowanie antagonistów tych receptorów powoduje wzmoczenie spontanicznej migracji i chemotaksji [42, 67]. Ponieważ samo cAMP wykazuje hamujący wpływ na adhezję i migrację neutrofile, być może opisane wyżej efekty uwarunkowane są przez kinazę białkową zależną od c-AMP.

RECEPTORY DLA ADENOZYNY

Adenozyna i jej nukleotydowe pochodne wykazują szerokie spektrum fizjologicznego oddziaływania na liczne tkanki m.in. mięśniówkę gładką, naczynia wieńcowe, hepatocyty,

neurony czy adipocyty. Działanie to zachodzi dzięki obecności na komórkach efektorowych receptorów A1 i A2 dla adenozyliny, z których pierwszy w przeciwieństwie do A2 ma wysokie powinowactwo do substratu i powoduje hamowanie cykazy adenylowej i wewnątrzkomórkowego cAMP [40, 58]. Związki te znajdują się w dość dużych ilościach w miejscach zapalnych jako wynik aktywacji płytek krwi lub uwalniania z uszkodzonych tkanek. Mogą tu wpływać na funkcje neutrofilii hamując ich zdolność do produkcji O_2^- indukowanej przez fMLP. Nie wpływają natomiast w większym stopniu na ich degranulację i agregację [40, 58]. Badania z zastosowaniem analogów adenozyliny różnie wiążących się do poszczególnych receptorów wykazały, że neutrofile mają receptor A2 w ilości ok. 10 tys. na komórce, o stosunkowo małym powinowactwie ($K_d = 0,22 \mu M$). 50% obserwowanego efektu hamującego produkcję O_2^- zachodzi przy zajęciu ok. 20% receptorów [14].

RECEPTORY DLA PROSTAGLANDYN, RECEPTORY HISTAMINOWE

Prostaglandyny są grupą biologicznie aktywnych pochodnych kwasów tłuszczowych, które są generowane w miejscach zapalenia. Oprócz szeroko dyskutowanego oddziaływania prostaglandyn na różne komórki i etapy odpowiedzi immunologicznej zwraca się uwagę na ich wpływ na niektóre funkcje neutrofilii. Wykazano, że prostaglandyny grupy E hamują indukowaną przez fMLP produkcję O_2^- oraz adhezję i sekrecję enzymów lizosomalnych [58, 59]. Na modelu zwierzęcym wykazano hamujący wpływ PGE_1 i PGE_2 na chemiluminescencję neutrofilii [50]. Hamowanie tych funkcji jest związane z podwyższonym stężeniem wewnątrzkomórkowego cAMP, chociaż bezpośrednie mechanizmy nie są wyjaśnione do końca [50, 56, 59]. Wskazuje się, że wpływ PGE na neutrofile odbywa się poprzez wiązanie tych substancji do powierzchni neutrofilii poprzez specyficzny receptor [56, 59]. Wykazano, że PGE_2 ma dwa miejsca wiązania na neutrofilu, o wysokim powinowactwie i $K_d = 1 \text{ nM}$ oraz niskim powinowactwie i $K_d = 100 \text{ nM}$. Pierwszy z nich występuje w liczbie 150, a drugi 5800 na komórce. Udało się udowodnić istnienie miejsc receptorowych o pojedynczym typie powinowactwa dla PGD_2 ($K_d = 13 \text{ nM}$, gęstość 5100/komórkę) [58].

Histamina jest uwalniana w zapalnej fazie reakcji alergicznej. Wykazano, że może ona regulować niektóre funkcje neutrofilii w miejscach zapalnych wpływając hamująco na ich chemotaksję, adhezję, degranulację i metabolizm tlenowy. Badania z użyciem antagonistów receptorów histaminowych wykazały, że neutrofile mają najprawdopodobniej pojedynczy receptor o typie H2 o niskim powinowactwie. Połączenie histaminy z tym receptorem powoduje zmiany w poziomie komórkowego cAMP, co może być odpowiedzialne za obserwowane efekty [50, 60].

RECEPTORY DLA SKŁADOWYCH DOPEŁNIACZA

Układ dopełniacza poza działaniem cytotoxicznym pośredniczy także w reakcjach ogólnoustrojowych, takich jak: odczyn zapalny, fagocytoza, fibrynoliza. Niektóre fragmenty i kompleksy, powstające w czasie aktywacji, działają chemotaktycznie na fagocyty ($C5a$, $C3a$) lub też pośredniczą w zjawisku adhezji ($C3b$, $iC3b$, $C4b$) [24]. Na powierzchni różnych komórek organizmu wykryto 8 receptorów dla dopełniacza: CR1 ($C3b$), CR2 ($C3d$), CR3 ($iC3b$), $C1qR$, HR, $C3eR$ i $C5a$. Na neutrofilach udało się wykazać obecność

CR1, CR3 oraz receptorów dla C5a i C3a [24, 30, 34]. CR3 i receptor dla C5a zostały omówione w działach dotyczących receptorów adhezyjnych i chemotaktycznych.

RECEPTOR DLA C3b (CR1)

Jest to glikoproteina o jednym łańcuchu, istniejąca w dwu formach allotypowych: "F" o $M_r = 250$ kDa i "S" o $M_r = 260$ kDa, wiążąca się z C3b, C3c, C4b i C5b [32]. Jego funkcja polega na pośredniczeniu w usuwaniu opłaszczonych tymi fragmentami bakterii i innych czynników zewnątrzpochodnych, jak również kompleksów immunologicznych aktywujących układ dopełniacza. Neutrofile wykazują obecność 4000–5000 miejsc receptorowych dla CR1 na jednej komórce; ilość ta wzrasta 10-krotnie pod wpływem np. stymulacji przez fMLP [32]. Około 80% neutrofile osób dorosłych i 60% neutrofile noworodków wykazuje ekspresję tego receptora (receptora CR3 odpowiednio 90 i 75,5%) [22]. Opłaszczony fragmentem C3b bakterie mogą ulegać fagocytozie bez udziału immunoglobulin, chociaż sam proces fagocytozy zależny jest bardziej od receptora CR3 [29]. C3b może indukować chemiluminescencję neutrofile. Wraz ze wzrostem ilości fragmentów dla C3b dochodzi do samoregulacji pojemności receptorowej CR1 (*up regulation*), co można wykazać u hemodializowanych pacjentów z wewnątrzmaczyniową aktywacją komplementu [35].

RECEPTOR DLA C3a

Anafilatoksyna C3a poza wpływem na komórki tuczne wykazuje *in vitro* zdolność uwalniania enzymów lizosomalnych z neutrofile. Działanie to zachodzi w wyniku połączenia się C3a z homogenną klasą receptorów na powierzchni komórki (gęstość ok. 40 000 i $K_d = 3,5 \times 10^{-8}$ M). Specyficzne wiązanie wydaje się być niezależne od poziomu Ca^{2+} . M_r tej molekuly ustalono na 90–123 kDa [24].

INNE RECEPTORY

RECEPTORY OPIATOWE

Coraz więcej danych dokumentuje zdolność neuropeptydów do wpływania na funkcje komórek immunokompetentnych. Do wzajemnych relacji układu nerwowego i immunologicznego wciągnięte są także komórki fagocytyczne. Wykazano bowiem w badaniach z użyciem syntetycznych analogów, że opiaty mogą hamować chemotaksję i agregację, działając jednakże chemokinetycznie [38, 64]. Wykazano miejsca specyficznego wiązania do powierzchni neutrofile zarówno dla β -endorfiny, jak i Met-enkefalin [21]. Badania autoradiograficzne wykazują obecność większości znakowanych peptydów opiatowych w wewnętrznych strukturach komórki. Ponieważ wiązanie ligandu w 37°C pojawia się bardzo szybko, wydaje się, że jest ono krótkie i przemijające. Ten szybki proces zachodzi równolegle z efektem morfologicznym, który pojawia się już po ok. 2 min, po dodaniu β -endorfiny do zawiesiny neutrofile [17, 21]. Po ustaleniu, że tylko 23–42% neutrofile reaguje na β -endorfinę udało się wykazać, że komórka ma ok. 100 receptorów, co jest wystarczające do zainicjowania efektu biologicznego. Badania nad receptorami opiatowymi komplikuje

zjawisko niespecyficznego wiązania się dużych ilości peptydów opiatowych do powierzchni błony [17, 21].

RECEPTORY DLA CRP

Białko C-reaktywne (CRP) jest białkiem ostrej fazy, którego poziom wzrasta ponad 1000-krotnie w stanach uszkodzenia tkanek czy infekcji. Wzmaga ono *in vitro* migrację, potencjalizuje metabolizm tlenowy, fagocytozę, zdolność do wewnątrzkomórkowego zabijania przez neutrofile [9, 20]. Hamuje klonalną proliferację GM-CSF, przez co może regulować skład komórek w miejscu zapalenia. Wpływa modulująco na wiele komórek odpowiedzi immunologicznej.

Wykazano, że ok. 36% krążących neutrofilów wiąże znakowane CRP, a po ekspozycji na PMA procent ten wzrasta do 93 [76]. Znalaziono od 50 do 200 tys. miejsc receptorowych na jednej komórce. Stałą dysocjacji receptora określono na $3,2 \times 10^{-8}$ M [43].

UWAGI KOŃCOWE

Zajęcie receptora przez ligand i stworzenie z nim kompleksu staje się bodźcem do aktywacji sekwencji zjawisk zachodzących w ścisłych przedziałach czasowych i obejmujących określone struktury komórki. Każdy etap takiej aktywacji jest decydujący dla szerzenia się sygnału i aktywacji bocznych szlaków przekazywania; wszystkie zintegrowane razem dają wynik w postaci procesów efektorowych komórki. Bardziej szczegółowe opracowanie zjawisk towarzyszących procesom przekazywania sygnału w neutrofilach zostały przedstawione w drugiej części artykułu.

LITERATURA

- [1] AGGARWAL BB, EESSALU TE, HASS PE. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. *Nature* 1985; **318**: 665–667.
- [2] ALLEN RA, ERICKSON RW, JESAITIS AJ. Identification of a human neutrophil protein of Mr 24 000 that binds N-formyl peptides: co-sedimentation with specific granules. *Biochim Biophys Acta* 1989; **991**: 123–133.
- [3] BAGGIOLINI M, WALZ A, PERERI P, DEWALD B. A novel cytokine that activates human neutrophils. *Int J Immunopathol Pharmacol* 264: 17409–17415.
- [4] BAUD L, KOO CH, GOETZL EJ. Specificity and cellular distribution of human polymorphonuclear leucocyte receptors for leukotriene C₄. *Immunology* 1987; **62**: 53–59.
- [5] BEGILACQUA HP, POBER JS, MENDRICK DL, COTRAN RS, GIMBRONE MA. Identification of an inducible endothelial – leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **184**: 9238–9242.
- [6] BRAQUET P, ROLA-PLESZCZYŃSKI M. Platelet-activating factor and cellular immune responses. *Immunol Today* 1987; **8**: 345–352.
- [7] BRAY MA. Leukotrienes in inflammation. *Agent Action* 1986; **19**: 88–99.
- [8] BROWN EJ. The role of extracellular matrix proteins in the control of phagocytosis. *J Leukocyte Biol* 1986; **39**: 579–591.
- [9] BUCHTA R, FRIDKIN M, PONTET M, CONTESSI E, SAGGIANTE B, ROMEO D. Modulation of human neutrophil function by C-reactive protein. *Eur J Biochem* 1987; **163**: 141–146.

- [10] CANNISTRA S, GRIFFIN JD. Regulation of the production and function of granulocytes and monocytes. *Semin Hematol* 1988; **25**: 173–188.
- [11] CHENOWETH DE, HUGLI TE. Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; **75**: 3943–3947.
- [12] CLARKSON SB, ORY PA. CD16. Developmental regulated IgG Fc receptors on cultured human monocyte. *J Exp Med* 1988; **167**: 408–420.
- [13] COFFEY RG. Mechanism of GM-CSF stimulation of neutrophils. *Immunol Res* 1989; **8**: 236–248.
- [14] CRONSTEIN BN, ROSENSTEIN ED, KRAMER SB, WEISSMANN G, HIRSCHHORN R. Adenosine: a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A₂ receptor on human neutrophils. *J Immunol* 1985; **135**: 1366–1371.
- [15] DI PERSIO J, BILLING P, KAUFMAN S, EGHTEADY P, WILLIAMS RE, GASSON JC. Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 1988; **263**: 1834–1841.
- [16] DOBRINA A, SCHWARTZ BR, CARLOS TM, OHCS HD, BEATTY PG, HARLAN JM. CD11/CD18-independent neutrophil adherence to inducible endothelial-leukocyte adhesion molecules (E-LAM) in vitro. *Immunology* 1989; **67**: 502–508.
- [17] FALKE NE, FISCHER EG, MARTIN R. Stereospecific opiate binding in living human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Int Rep* 1985; **9**: 1041–1047.
- [18] FANGER MW, SHEN L, GRAZIANO RF, GUYRE PM. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today* 1989; **10**: 92–99.
- [19] FERRANTE A, NANDOSKAR M, WALZ A, GOH DHB, KOWANKO IC. Effects of tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha and beta on human neutrophil migration, respiratory burst and degranulation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; **86**: 82–91.
- [20] FILEP J, FOLDES-FILEP E. Effects of C-reactive protein on human neutrophil granulocytes challenged with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and platelet-activating factor. *Life Sci* 1988; **44**: 517–524.
- [21] FISCHER EG. Opioid peptides modulate immune functions. A review. *Immunopharmacol, Immunotoxicol* 1988; **10**: 265–326.
- [22] FLEIT HB. Fc and complement receptor (CR1 and CR3) expression on neonatal human polymorphonuclear leukocytes. *Biol Neonate* 1989; **55**: 156–163.
- [23] GANZ T. Neutrophils and host defence. *Ann Intern Med* 1988; **109**: 127–142.
- [24] GEREDY-SCHAHNR, AMROSIUS D, SAUNDERS D, CASARETTO M, MITLER CH, KARWARTH G, GORGEN S, BITTER-SUERMAN D. Characterization of C3a receptor-proteins on quinea pig platelets and human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 1095–1102.
- [25] GLASSER L, FIEDERLEIN RL. Functional differentiation of normal human neutrophils. *Blood* 1987; **69**: 937–944.
- [26] GOETZL EJ, BRINDLEY LL, GOLDMAN DW. Enhancement of human neutrophil adherence by synthetic leukotriene constituents of the slow-reacting substance of anaphylaxis. *Immunology* 1983; **50**: 35–41.
- [27] GOH K, FURUSAWA S, KAWA Y, NEGISHI-OKITSU S, MIZOGUCHI M. Production of interleukin-1-alpha and -beta by human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; **88**: 297–303.
- [28] GOLDMAN DW, GIFFORD LA, MAROTTI T, KOO CH, GOETZL EJ. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. *Fed Proc* 1987; **46**: 200–203.
- [29] GORDON DL, RICE JL, McDONALD PJ. Regulation of human neutrophil type 3 complement receptor (iC3b receptor) expression during phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Immunology* 1989; **68**: 460–465.
- [30] HUET R, HUGLI TE. Characterization of a C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes (PMN). *J Immunol* 1985; **135**: 2063–2068.
- [31] HUIZINGA TWJ, VAN DER SCHOOT CE, JOST C, KLAASSEN R, KLEIJER M, VON DEM BORNE AE, ROOS D, TETTEROO PA. The PI-linked receptor FcR_{III} is released on stimulation of neutrophils. *Nature* 1988; **333**: 667–669.
- [32] JACK RM, FEARON DT. Altered surface distribution of both C3b receptors and Fc receptors on neutrophils induced by anti-C3b receptor or aggregated IgG. *J Immunol* 1984; **132**: 3028–3033.
- [33] JONES DH, LOONEY RJ, ANDERSON CL. Two distinct classes of IgG Fc receptors on a human monocyte line (U937) defined by differences in binding of murine IgG subclasses at low ionic strength. *J Immunol* 1985; **135**: 3348–3358.
- [33a] KELLER HU, ZIMMERMANN A. Shape, movement and function on neutrophil granulocytes. *Biomed Pharmacotherapy* 1987; **41**: 285–289.

- [34] KUYPERS TW, ROOS D. Leukocyte membrane, adhesion proteins LFA-1, CR3 and p150,95: a review of functional and regulatory aspects. *Res Immunol* 1989; **140**: 5–61.
- [35] LEE J, HAKIM BM, FEARON DT. Increased expression of the C3b receptor by neutrophils and complement activation during hemodialysis. *Clin Exp Immunol* 1984; **56**: 205–211.
- [36] LOPES JD, DOS REIS M, BRETANI RR. Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1985; **229**: 275–277.
- [37] MALECH HL, GALLIN JI. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987; **317**: 687–694.
- [38] MARCOLI M, RICEVUTI G, MAZZONE A, BEKKERING M, LECCHINI S, FRIGO GM. Opioid-induced modification of granulocyte function. *Int J Immunopharmac* 1988; **10**: 425–433.
- [39] MARINO JA, DAVIS AH, SPAGNUOLO PJ. Fibronectin is stored by not synthesized in mature human peripheral blood granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 1132–1138.
- [40] McGARRITY ST, STEPHENSON AH, WEBSTER RO. Regulation of human neutrophil functions by adenine nucleotides. *J Immunol* 1989; **142**: 1986–1994.
- [41] MOTULSKY HJ, INSEL PA. Adrenergic receptors in man. Direct identification, physiologic regulation and clinical alterations. *N Engl J Med* 1982; **304**: 18–29.
- [42] MUELLER H, MOTULSKY HJ, SKLAAR LA. The potency and kinetics of the β -adrenergic receptors on human neutrophils. *Mol Pharmacol* 1988; **34**: 347–353.
- [43] MUELLER H, FEHR J. Binding of C-reactive protein to human polymorphonuclear leukocytes: evidence for association of binding sites with Fc receptors. *J Immunol* 1986; **136**: 2202–2207.
- [44] LINDEMANN A, RIEDEL D, OSTER W, ZIEGLER-HEITBROCK WL, MERTELSMANN R, HERRMANN F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1308–1312.
- [45] MUNKER R, GASSON J, OGAWA M, KOEFFLER HP. Recombinant human TNF induces production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Nature* 1986; **323**: 79–82.
- [46] NAGATA S. Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor. *Bioessays* 1989; **10**: 113–117.
- [47] OZAKI Y, OHASHI T, NIWA Y, KUME S. Effect of recombinant DNA-produced tumor necrosis factor on various parameters of neutrophil function. *Inflammation* 1988; **12**: 297–309.
- [48] PARKER KP, BENJAMIN WR, KAFFKA KL, KILIAN PL. Presence of IL-1 receptors on human and murine neutrophils. Relevance to IL-1-mediated effects in inflammation. *J Immunol* 1989; **142**: 537–542.
- [49] PETRONI KC, SHEN L, GUYRE PM. Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN- τ and glucocorticoids. *J Immunol* 1988; **140**: 3467–3472.
- [50] PHILLIPS TR, YANG WC, SCHULTZ RD. In vitro effects of prostaglandin E₁, prostaglandin E₂, indomethacin, histamine, and tuftsin on chemiluminescence response of bovine polymorphonuclear leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; **14**: 233–244.
- [51] PICHYANGKUL S, SCHICK D, JIA F, BERENT S, BOLLON A, KAHN A. Binding of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) to high-affinity receptors on polymorphonuclear cells. *Exp Hematol* 1987; **15**: 1055–1059.
- [52] PIKE MC, SNYDERMAN R. Leukocyte chemoattractant receptors. *Methods Enzymol* 1988; **162**: 236–245.
- [53] RHYNE JA, MIZEL SB, TAYLOR RG, CHEDID M, McCALL CE. Characterization of the human interleukin 1 receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; **48**: 354–361.
- [54] RICEVUTI G, MAZZONE A, HARLAN JM. Membrane glycoproteins of neutrophils and related diseases. *Haematologica* 1988; **73**: 415–422.
- [55] RICHTER J, ANDERSSON T, OLSSON I. Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J Immunol* 1989; **142**: 3199–3205.
- [56] ROSSI AG, OFLAHERTY JT. Prostaglandin binding sites in human polymorphonuclear cells. *Prostaglandins* 1989; **97**: 641–654.
- [57] SAMANTA AK, OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA K. Interleukin 8 (Monocyte derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem* 1990; **265**: 183–189.
- [58] SCHRIER DJ, IMRE KM. The effects of adenosine agonists on human neutrophil function. *J Immunol* 1986; **137**: 3284–3289.
- [59] SEDGWICK JB, BERUBE ML, ZURIER RB. Stimulus-dependent inhibition of superoxide generation by prostaglandins. *Clin Immunol Immunopathol* 1985; **34**: 205–215.

- [60] SELIGMANN BE, FLETCHER MP, GALLIN JI. Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. *J Immunol* 1983; **130**: 1902–1909.
- [61] SHALABY MR, PENNICA D, PALLADINO MA. An overview of the history and biologic properties of tumor necrosis factors. *Springer Semin Immunopathol.* 1986; **9**: 33–37.
- [62] SHAU H. Characteristics and mechanism of neutrophil-mediated cytostasis induced by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1988; **141**: 234–240.
- [63] SIMMONS D, SEED B. The Fc γ receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature* 1988; **333**: 568–570.
- [64] SIMPKINS CO, SIONE MD, ALAILIMA T, TATE EA, JOHNSON M. The effect of enkephalins and prostaglandins on O₂ release by neutrophils. *J Surg Res* 1986; **41**: 645–652.
- [65] SMITH RJ, EPPS DE, JUSTEN JM, SAM LM, WYNALDA MA, FITZPATRICK FA, YEIN FS. Human neutrophil activation with interleukin-1. A role for intracellular calcium and arachidonic acid lipoxygenation. *Biochem Pharmacol* 1987; **36**: 3851–3858.
- [66] SMITH CW, ROTHLEIN R, HUGHES BJ, MARISCALCO MH, RUDLOFF HE, SCHMALSTIEG FC, ANDERSON DC. Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 1988; **82**: 1746–1756.
- [67] STRAUSSBERG-DJALDETTI R, FISHMAN P, BESSLER H, DJALDETTI M. The effect of propranolol on protein synthesis and phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes from newborn, children and elderly individuals. *Biomed Pharmacother* 1986; **40**: 265–269.
- [68] SULLIVAN R, GRIFFIN JD, SIMONS ER, SCHAFFER AI, MESHULAM T, FREDETTE JP, MAAS AK, GADENNE A-S, LEAVITT JL, MELNICK DA. Effects of recombinant human granulocyte and macrophage colony-stimulating factors on signal transduction pathways in human granulocytes. *J Immunol* 1987; **139**: 3422–3430.
- [69] TARGOWSKI SP, NIEMIALTOWSKI M. Appearance of Fc receptors on polymorphonuclear leukocytes after migration and their role in phagocytosis. *Infect Immun* 1986; **52**: 798–802.
- [70] TENNEBERG SD, ZEMLAN FP, SOLOMKIN JS. Characterisation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors on human neutrophils. Effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity. *J Immunol* 1988; **141**: 3937–3944.
- [71] TIMPL R, HEILWIG R. Laminin: a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 1979; **254**: 9933–9940.
- [72] UZUMAKI H, OKABE T, SASAKI N, HAGIWARA K, TAKAKU F, ITOH S. Characterisation of receptor for granulocyte colony-stimulating factor on human circulating neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 1026–1032.
- [73] VALONE FH, GOETZL EJ. Specific binding by human polymorphonuclear leukocytes of the immunological mediator 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphoryl-choline. *Immunology* 1983; **48**: 141–149.
- [74] WRIGHT SD, MEYER BC. Fibronectin receptor of human macrophages recognizes the sequence Arg-Gly-Asp-Ser. *J Exp Med* 1985; **162**: 762–767.
- [75] YOON PS, BOXER LA, MAYO LA, YANG AY, WICHA MS. Human neutrophil laminin receptors: activation-dependent receptor expression. *J Immunol* 1987; **138**: 259–265.
- [76] ZELLER JM, LANDAY AL, LIND TF, GEWURZ H. Aggregated C-reactive protein binds to human polymorphonuclear leukocytes and potentiates Fc receptor-mediated chemiluminescence. *J Lab Clin Med* 1986; **108**: 567–576.

Otrzymano w listopadzie 1990 r.

Przyjęto w styczniu 1991 r.

Adres Autorów Plac 9 Maja 1, 90-647 Łódź

**RECEPTORY GRANULOCYTÓW
OBOJĘTNOCHŁONNYCH (NEUTROFILI)
KRWI OBWODOWEJ*.
II. MECHANIZMY PRZEKAZYWANIA
I ROZPRZESTRZENIANIA SIĘ SYGNAŁU**

**SURFACE RECEPTORS
ON THE HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES.
II. MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION**

Krzysztof ZEMAN, Jerzy KANTORSKI

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

Streszczenie. Połączenie się specyficznego receptora z ligandem rozpoczyna kaskadę biochemicznych zjawisk powodującą rozprzestrzenianie się sygnału i doprowadzającą do aktywacji komórki. Proces ten rozpoczyna się od interakcji receptora z białkami G i pobudzeniem metabolizmu fosfolipidów. Prowadzi to do zmian w poziomie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i aktywacji kinazy białkowej C. Integracja tych czynników powoduje polimeryzację aktyny, zmiany organizacji szkieletu komórkowego oraz degranulację ziarnistości komórki. Dokonano przeglądu danych na temat współzależności pomiędzy receptorem i przekaźnikami informacji doprowadzającymi do fazy efektorowej pobudzonej komórki.

Summary. Occupancy of specific receptors begins the neutrophils' response which is propagated and amplified by a biochemical cascade of transduction reactions. This cascade is mediated by receptor interactions with proteins G, subsequent activation of phospholipase C, and a resulting increase in phospholipids turnover. These events are connected with changes in the concentration of intracellular Ca^{2+} and diacylglycerol combined with activation of protein kinase C. Integration of these functions results in stimulation of actin polymerization, shape change, degranulation and membrane flow. In this article some of the relationship between these transduction events and the specific receptor system are briefly considered.

*Praca wykonana w ramach programu PAN CPBP 06.01.

WSTĘP

Podstawą właściwego funkcjonowania jakichkolwiek wielokomórkowych organizmów jest istnienie systemu skutecznej komunikacji, który pozwala na przekazywanie informacji z jednej komórki do drugiej. Główną funkcją błony komórkowej jest utrzymywanie kontrolowanej bariery pomiędzy wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym środowiskiem. Realizacja tego zadania jest możliwa dzięki istnieniu wysoce wyspecjalizowanych struktur błonowych (kanały jonowe, miejsca transportu substancji odżywczych, determinanty zgodności tkankowej), które odgrywają kluczową rolę w selektywnym przekazywaniu informacji ze środowiska zewnętrznego do wewnątrz komórki i odwrotnie [18]. Jedną z możliwości przekazywania informacji jest prosty przepływ jonów przez kanały błonowe lub transport metabolitów. Energia dla tych procesów jest czerpana bądź z gradientu stężeń transportowanych ligandów, bądź z wykorzystania do takich procesów energii komórkowej (ATP) [4]. Transportowany jon czy metabolit jest informacją dla środowiska wewnętrznego komórki i zmusza ją do odpowiedzi na zmiany stężenia transportowanych substancji [18]. Molekuły odpowiedzialne za taki typ transportu są kompleksami protein o allosterycznej regulacji [4].

Drugi typ przekazywania informacji wiąże się z istnieniem wyspecjalizowanych przekazników wewnątrzkomórkowych, które rozpoznają specyficzne białka transportowe i współuczestniczą w selektywnej adsorpcyjnej pinocytozie. Ten typ przenoszenia informacji jest charakterystyczny dla układów LDL¹/cholesterol czy transkobalamina II/wit.B₁₂. Ponieważ takie białka nośnikowe znajdują się na powierzchni komórki, a nie są receptorami w farmakologicznym ujęciu tego zjawiska, nazywa się je akceptorami lub receptorami klasy II [17, 20].

Szybki, zwłaszcza w ostatnim dziesięcioleciu, rozwój prac dotyczących receptorów błonowych komórki pozwolił na dość dokładną charakterystykę tych struktur, które stanowią pierwszy i jedyny punkt kontaktu pomiędzy agonistą a powierzchnią komórki. W przeciwieństwie do akceptorów, farmakologiczne receptory obok zdolności selektywnego rozpoznania ligandu współuczestniczą w procesach aktywacji komórki. Kontakt ligandu z receptorem inicjuje bowiem kaskadę zjawisk powodującą przekazywanie odpowiedniego, specyficznego sygnału i dającą w rezultacie odpowiedź komórki. Komórka reguluje liczbę, powinowactwo i odpowiednie rozmieszczenie receptorów oraz odpowiada na pobudzenie właściwą fazą efektorową. Funkcjonalny dualizm rozpoznania i aktywacji, w których receptor sam przez się bierze udział w generowaniu i przekazywaniu sygnału, odróżnia ten typ struktur od innych powierzchniowych elementów rozpoznania i transportu [11, 24, 35, 36].

Głównym celem artykułu jest próba dokonania przeglądu informacji dotyczących procesów rozpoznawania ligandów przez specyficzne receptory powierzchniowe, przetworzenia przyłączonych czynników na sygnał wewnątrzkomórkowy i aktywacji szlaków metabolicznych odpowiedzialnych za właściwe funkcje maszyneryi komórki.

¹LDL – lipidy o niskiej gęstości (*low density lipids*).

BIAŁKA G

Jedną z podstawowych ról w procesie przenoszenia informacji od receptora do systemu efektorowego komórki przypada białkom G (*guanine nucleotide binding-proteins*). Reprezentują one rodzinę homologicznych białek regulatorowych komórki. Wszystkie poznane do tej pory białka G są heterotrimerami zbudowanymi z trzech podjednostek α , β , τ . Masa molowa całej molekuly wynosi ok. 80 kDa [11, 29, 36]. Podjednostki β i τ są identyczne dla wszystkich typów białek G, a ich masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio 35–36 i 10 kDa. Podjednostki α wykazują funkcjonalne oraz strukturalne różnice w zależności od rodzaju białka G. Natomiast niezależnie od wariantu mają miejsca wiążące nukleotydy guaninowe i fluorki (np. fluorek sodu). Każde z białek G jest substratem dla takich toksyn bakteryjnych (np. białko G_s dla toksyny cholery, G_i dla toksyny krztusca), które mają zdolność katalizowania rybozylacji ADP podjednostki α białka inaktywując go. Zostało to szeroko wykorzystane w badaniach nad mechanizmem działania białek G [9, 12, 38].

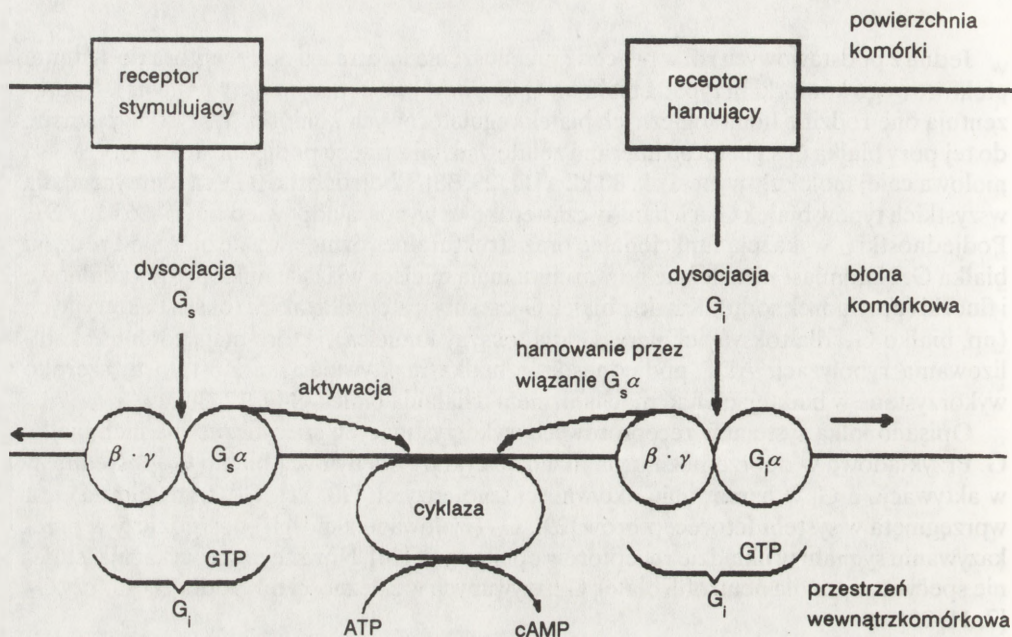
Opisano kilka systemów receptorowych wykorzystujących specyficzne dla nich białka G. Przykładowo w dobrze poznanym układzie cyklazy adenylowej białko G_s pośredniczy w aktywacji, a G_i w hamowaniu aktywności tego enzymu [10, 11]. G_t (transducyna) jest sprzęgnięta w system fotoreceptorów [29], G_o (izolowane z mózgu) pośredniczy w przekazywaniu sygnału w układzie receptorów opiatowych [14]. Nowsze prace wykazują istnienie specyficznych dla neutrofilii białek G nazywanych w zależności od źródła G_c , G_x czy G_p [7, 11, 35].

Rola białek G w procesach przekazywania informacji została najlepiej scharakteryzowana dla działania receptorowego niektórych hormonów w systemie cyklazy adenylowej [10, 13, 35, 38] (rys. 1).

Stymulacja cyklazy adenylowej jest wynikiem dysocjacji białka G_s poprzedzonej przyłączeniem się ligandu do receptora aktywującego. Dochodzi wówczas do dysocjacji cząsteczki na podjednostkę α i podjednostki β - τ . Kompleks α /GTP aktywuje cyklazę adenylową. Z drugiej strony stymulacja receptora hamującego powoduje podobną dysocjację białka G_i . Uwolniona wówczas podjednostka β - τ wiąże się z $G_s\alpha$ tworząc trimeryczną nieaktywną formę G_s i powoduje hamowanie sygnału aktywacji cyklazy adenylowej [10, 14, 35, 38]. Aktywność podjednostki α zostaje zakończona w momencie hydrolizy GTP do GDP.

Uzyskano dowody, że białka G sprzęgnięte są w proces przekazywania informacji w neutrofilach poprzez receptory dla chemotaktycznego peptydu fMLP². Wykazano m.in., że pod wpływem nukleotydów guaninowych dochodzi do zmiany powinowactwa receptorów z wysokiego na niskie [6, 39]. Zastosowanie toksyny krztusca blokującej funkcję białka G_i doprowadza do całkowitego zahamowania odpowiedzi chemotaktycznej, degranulacji i produkcji O_2^- po pobudzeniu przez fMLP; hamowanie takie jest specyficzne, nie zaburza bowiem drogi pobudzenia omijającej receptor (stymulacja przez PMA² lub jonoforem wapniowym) [3, 9, 12]. Zastosowanie tej toksyny powoduje również blokadę odpowiedzi wywołanej przez GM-CSF², co wskazuje, że działanie tej cytokiny zależne jest również od neutrofilowych białek G [30]. Fluorek sodu, aktywator białek G, jest silnym stymulatorem uwalniającym kwas arachidonowy z neutrofilii, co jest dowodem na ich udział i w tych

²fMLP – formyl-met-leu-phe; PMA – mirystyniano octano forbol; GM-CSF – czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów.



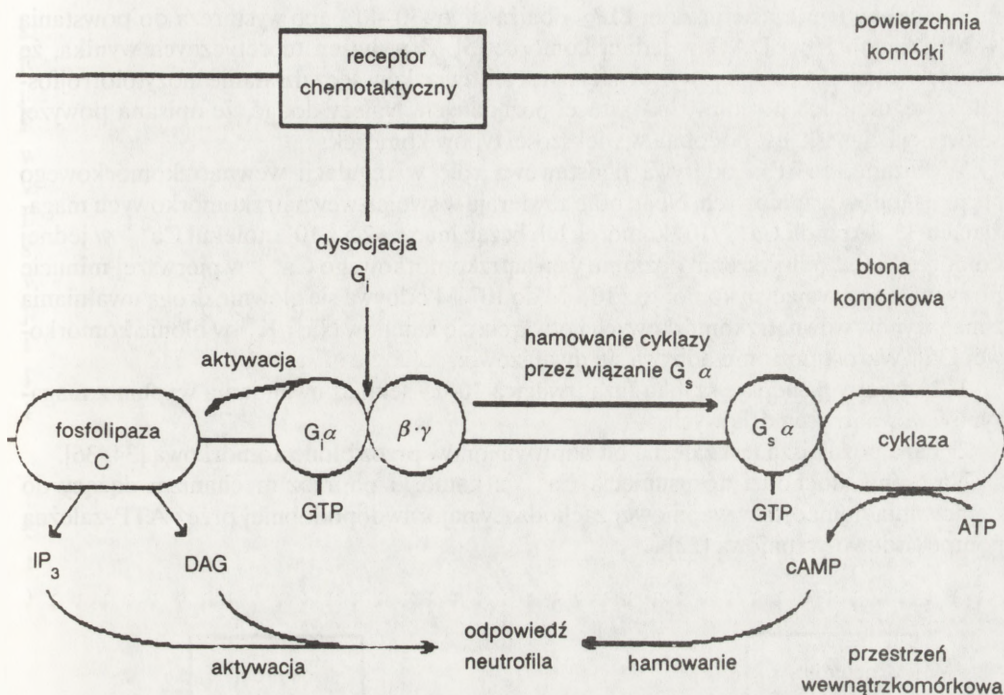
Rys. 1. Schemat regulacji aktywności cykazy adenylowej przez stymulatorowe i hamujące białka G [35]

szlakach metabolicznych komórki [25]. Inne badania wskazują, że toksyny bakteryjne hamują aktywację neutrofilii wywoływaną innymi czynnikami chemotaktycznymi, np. $C5a$, LTB_4 czy PAF^3 [25].

Mechanizm, poprzez który białka G miałyby regulować w neutrofilach kolejne etapy przekaźnictwa sygnału, a więc i aktywację fosfolipazy C, nie jest poznany do końca. Istnieje szereg prób dostosowania do tych zjawisk omawianego wcześniej schematu dotyczącego systemu cykazy adenylowej. Nie można jednakże przyjąć, że aktywacja neutrofila będzie zachodziła poprzez białko G_s , bowiem obserwowany w innych systemach wzrost cAMP powoduje zahamowanie funkcji neutrofila [32]. Podobne efekty otrzymuje się przy działaniu na receptory, które aktywują system cykazy adenylowej (β -adrenergiczne, A_2 , H_2 , dla PGE^3) neutrofila doprowadzając do zahamowania jego funkcji [36]. Założono więc, że tak jak w innych komórkach, dysocjacja $G_i\alpha$ powoduje aktywację fosfolipazy C, natomiast jego podjednostka $\beta - \tau$ wiążąc się z $G_s\alpha$ blokuje możliwość wzrostu poziomu cAMP i nie dopuszcza do hamowania funkcji neutrofila [35, 37] (rys. 2).

Udowodniono, że występujące w granulocytach białko o charakterze G_i nie jest identyczne z białkiem otrzymanym z innych komórek. Specyficzne dla neutrofilii nazwano G_p [35]. W cytoplazmie neutrofila na ogólną masę białek G jest go 33%. Opisywana wyżej hipoteza udziału białek G w przekazywaniu sygnału w neutrofilach wydaje się bardzo prawdopodobna. Stwierdzono, że białko G_p jest substratem dla toksyny krztuśca, a toksyna

³ $C5a$ – fragment składowej dopełniacza; LTB_4 – leukotrien B₄; PAF – czynnik aktywujący płytki; PGE – prostaglandyna E.



Rys. 2. Hipotetyczny model współdziałania białek G w procesie integracji funkcji neutrofila [35]

ta *in vitro* blokuje pobudzenie komórki. Z kolei izolowane z neutrofilów białko G_s wykazuje wrażliwość na toksynę cholery, co prowadzi do wzmocnienia pobudzenia komórki [3, 25, 36]. Tak więc istnienie obu typów białek w neutrofilach pozwala na wyciąganie wniosków co do ich roli w mechanizmach przekazywania sygnału.

Należy wspomnieć, że istnieją dowody na istnienie alternatywnych dróg transdukcji sygnału w neutrofilach, niewrażliwych na toksyny bakteryjne, co może sugerować istnienie w tym systemie jeszcze niescharakteryzowanego innego (innych?) białka G.

FOSFOLIPAZA C I FOSFOLIPIDY INOZYTOŁOWE

Powstające w wyniku aktywacji fosfolipazy C (fosfodiesterazy fosfatydyloinozytolowej – EC3. 1.4.10) metabolity kontynuują kaskadę przekazywania. Pod wpływem tego enzymu dochodzi mianowicie do hydrolizy fosfolipidów inozytolowych (4,5 fosforan fosfatydyloinozytolu = PIP_2 ; 4 fosforan fosfatydyloinozytolu = PIP ; fosforan fosfatydyloinozytolu = PI) i powstania prostych i cyklicznych inozytofosforanów (m.in. IP_3) oraz diacyloglicerolu (DAG) [16, 44]. 1,4,5-trójfosforan inozytolu = IP_3 oraz DAG są związkami o charakterze przekaźników drugiego rzędu. Analiza kinetyki inozytofosforanów wskazuje, że komórka osiąga maksymalny poziom IP_3 po ok. 30 s od momentu uzyskania sygnału aktywującego (maksymalne poziomy innych inozytofosforanów (IP_2 , IP) mierzalne są w

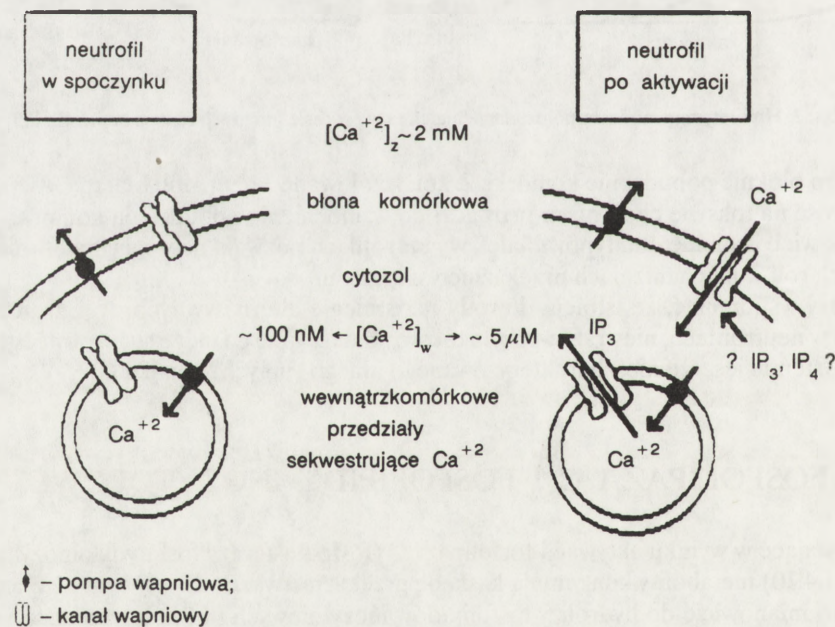
minutach), w tym czasie poziom PIP_2 obniża się o 30–40%, co wystarcza do powstania 4–20 attomoli IP_3 i DAG w jednej komórce [5]. Z wyliczeń teoretycznych wynika, że komórka mogłaby osiągnąć wyższe stężenie tych związków, lecz działanie inozytolotrójfosfatazy reguluje ich poziom do wartości pożądanych. Należy dodać, że opisana powyżej sekwencja zjawisk jest podobna w większości typów komórek.

Wykazano, że IP_3 odgrywa podstawową rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych. Neutrofile zawierają w swoich wewnątrzkomórkowych magazynach 30–40 pmoli $\text{Ca}^{2+}/10^6$ komórek lub licząc inaczej $2,5 \times 10^7$ molekuł Ca^{2+} w jednej komórce [37]. Podwyższenie poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w pierwszej minucie po sygnale aktywującym komórkę z 10^{-7} M do 10^{-6} M odbywa się głównie drogą uwalniania z magazynów wewnątrzkomórkowych i otwarcia się kanałów Na^+/K^+ w błonie komórkowej [36]. Wzrost poziomu odbywa się dwufazowo:

1° Najpierw następuje szybka faza trwająca 10–15 sekund uwalniania wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych.

2° Faza późniejsza jest zależna od napływu jonów przez błonę komórkową [34, 36].

Następnie dochodzi do usunięcia Ca^{2+} z komórki poprzez mechanizm dążący do zachowania homeostazy wapniowej zachodzący najprawdopodobniej przez ATP-zależną pompę sodowo-wapniową [22].



Rys. 3. Mechanizmy homeostazy wapniowej neutrofila po aktywacji [23]

Mechanizm regulujący stężenie Ca^{2+} ma istotne znaczenie dla funkcji komórki. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} uruchamia jej maszynę enzymatyczną. Zastosowanie fluorescencyjnego wskaźnika quin 2, wychytującego jony wapnia wewnątrz komór-

ki, hamuje zainicjowaną chemotaksję [8]. Wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} jest sygnałem do fuzji ziarnistości specyficznych neutrofila z błoną komórkową i następującego uwolnienia ich zawartości. Nie jest to jedyny sygnał dla degranulacji, albowiem estry forbolu aktywujące kinazę białkową C powodują degranulację bez wzrostu poziomu jonów wapniowych. Podobnie zastosowanie jonoforu wapniowego A23187 daje niepełną odpowiedź degranulacyjną oraz mniejszą produkcję O_2^- w porównaniu do stymulacji za pomocą fMLP, który z kolei powoduje osiąganie niższych stężeń Ca^{2+} [27, 28]. Prawdopodobnie sygnał jest uzupełniany przez DAG, który aktywuje kinazę białkową C. Wykazano również wzajemne korelacje pomiędzy wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} a ekspresją receptorów CR3 i CR1 (dla składowych dopełniacza), która rośnie odpowiednio o 650 i 330%. Zastosowanie czynnika TMB-8, inhibitora uwalniania Ca^{2+} zmagazynowanego w przedziałach wewnątrzkomórkowych, powoduje blokowanie ekspresji tych receptorów; podobne działanie wykazują też związki będące antagonistami kalmoduliny [2].

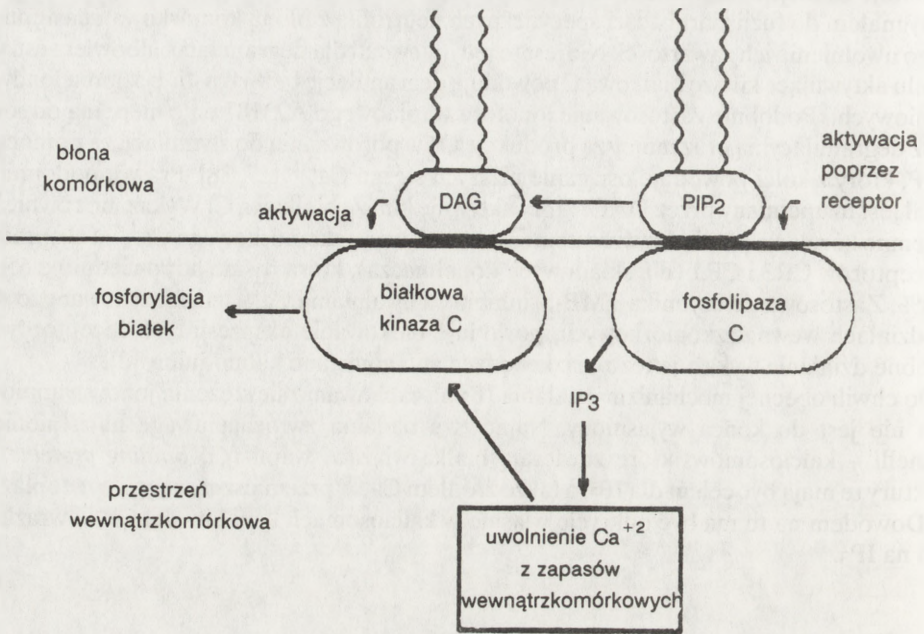
Do chwili obecnej mechanizm działania IP_3 na zachowanie się stężenia jonów wapniowych nie jest do końca wyjaśniony. Najnowsze badania zwracają uwagę na istnienie organelli – kalciosomów, które zawierają białka wiążące wapń (*Ca binding proteins*). Struktury te mają być celem dla IP_3 , a także źródłem Ca^{2+} przemieszczanego do cytoplazmy. Dowodem na to ma być odkrycie właśnie w kalciosomach kanałów dla Ca^{2+} wrażliwych na IP_3 .

DIACYLOGLICEROL I KINAZA BIAŁKOWA C

Diacyloglicerol (DAG) powstaje z wcześniej omawianych fosfatydyloinozytoli; możliwa jest także jego synteza z rozpadu innych lipidów komórkowych. Jest substratem dla lipazy diglicerydowej, a w wyniku jego hydrolizy dochodzi do uwolnienia kwasu arachidonowego, którego metabolity (tromboksan, leukotrieny, prostaglandyny) mają istotne znaczenie dla wielu funkcji komórki [44]. Niektóre z nich aktywując cyklazę guanylową prowadzą do wzrostu stężenia cGMP i dalszego uaktywnienia cyklu fosfolipidów inozytowych, inne (prostaglandyny) powodują zwiększenie poziomu cAMP, co prowadzi do hamowania metabolizmu fosfolipidów.

Podstawowe znaczenie DAG dla procesów rozprzestrzeniania się informacji polega na wpływie na aktywację kinazy białkowej C (PKC), co wydaje się być niezbędne dla procesów efektorowych komórki. Po zadziałaniu fMLP poziom DAG w komórce rośnie powoli i osiąga wysokość ok. 30 attomoli w komórce [5]. W tym czasie dochodzi do przemieszczenia się PKC z cytosolu do błony komórkowej, co związane jest także ze wzrostem wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} . Wykazano, że do takiej redystrybucji dochodzi po 30 sekundach w obecności mikromolowych stężeń wapnia wewnątrz komórki. Przemieszczenie się PKC jest związane z aktywacją oksydazy NADPH, co sugeruje, że kinaza białkowa C może współuczestniczyć w tym procesie. Rozważa się istnienie form cytosolowej i błonowej tego enzymu [41] (rys. 4).

Modelem najchętniej stosowanym w badaniach nad PKC są związki forbolu (PMA), ponieważ kinaza ta jest dla nich receptorem wewnątrzkomórkowym [41]. PMA stymuluje degranulację i produkcję O_2^- w wyższych dawkach niezależnie od Ca^{2+} , synergistycznie natomiast w dawkach niższych, podobnie jak DAG [28].



Rys. 4. Szlaki przekazywania sygnału prowadzące do procesów fosforylacji białek w neutrofilach [35]

Najważniejsze znaczenie PKC dla procesów rozprzestrzeniania się informacji w komórce to jej udział w fosforylacji białek komórkowych (np. wimentyny czy lekkich łańcuchów miozyny), co zapoczątkowuje polimeryzację aktyny i zmiany organizacji szkieletu komórkowego [35, 36, 41]. Badania nad rolą PKC w tych procesach są jednakże niezwykle trudne głównie ze względu na brak odpowiednich modeli zwierzęcych i występowania w komórkach licznych innych typów kinaz białkowych.

ZMIANY ORGANIZACJI SZKIELETU KOMÓRKOWEGO

Zmiany morfologiczne obserwowane po aktywacji neutrofila są ściśle związane ze zmianami stanu polimeryzacji aktyny, a stopień polimeryzacji jest wprost proporcjonalny do ilości wolnych końców filamentów. Procesy te zostały najdokładniej opracowane dla zjawisk przebiegających pod wpływem czynników chemotaktycznych, a istotnym tego odzwierciedleniem jest tworzenie przez komórkę pseudopodiów w ciągu pierwszych sekund od aktywacji. Polimeryzacja aktyny mikrofilamentów warunkuje ruchliwość komórki [19]. Proces ten nie jest hamowany ani przez chelatory wapniowe, ani przez czynniki powodujące sekwestrację wapnia wewnątrzkomórkowego, co dowodzi, że wzrost poziomu komórkowego Ca^{2+} nie jest czynnikiem niezbędnym dla polimeryzacji [33]. Jak się powszechnie sądzi, pewne znaczenie dla sygnału inicjującego polimeryzację aktyny ma metabolizm fosfatydyloinozytoli. Jako przykład może posłużyć tu fakt, że PIP_2 powoduje

dysocjację profilaktyny – kompleksu aktywności z profiliną [26]. Z kolei hamowanie polimeryzacji pod wpływem toksyny krztuśca wskazuje na rolę białek G w tym procesie, co wykazano w układzie, w którym zastosowano elektrycznie wywołaną przepuszczalność błon komórkowych neutrofila [42].

Polimeryzacja aktywności przebiega w dwu różnych kinetycznie fazach. Pierwsza to szybki wzrost ilości filamentowej aktywności osiągającej szczyt po 10–15 sekundach od sygnału dla aktywacji, a wykazującej wzrost z 30 do 85% ogólnego poziomu aktywności komórkowej. Faza ta kończy się po 20–30 sekundach i zostaje zastąpiona przez fazę wolną o niższej amplitudzie reakcji, kończąca się po ok. 3 minutach [43]. Inicjacja tych procesów jest możliwa tylko drogą receptorową, stosowanie sygnału omijającego receptor (PMA) nie prowadzi do takiej kinetyki zmian [45]. Chociaż, jak wspomniano, procesy te nie są zależne od zmian stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , to następująca później depolimeryzacja aktywności wymaga jonów wapnia i zjawisko to jest zależne od kalmoduliny [31] (rys. 5).

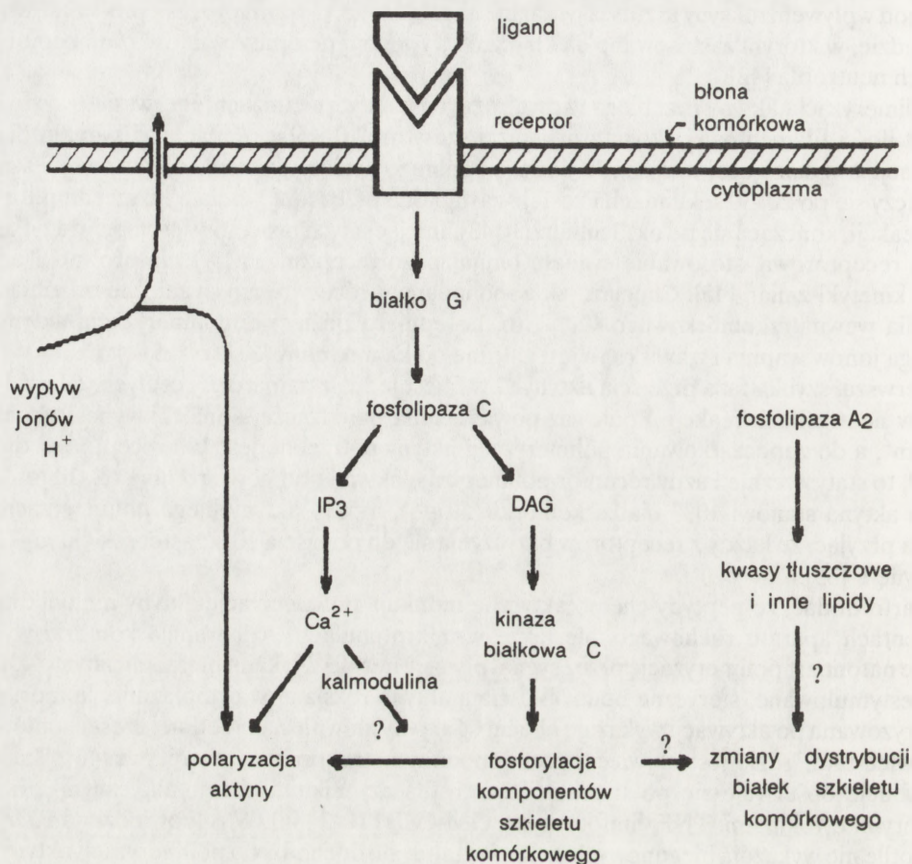
Pierwsza, szybka faza przejścia aktywności G w F jest jedną z najbardziej czułych, mierzalnych w neutrofilach reakcji. Ponieważ powierzchnia pojedynczej komórki wynosi około $400 \mu m^2$, a do zapoczątkowania polimeryzacji aktywności potrzebne jest 100 receptorów dla fMLP, to statystycznie każdy receptor polimeryzuje aktywność pod powierzchnią ok. $10 \mu m^2$. Skoro aktywność stanowi 10% białka komórki (50 pq), a 50% aktywności ulega polimeryzacji, można przyjąć, że każdy z receptorów przyczynia się do przejścia 10^5 cząsteczek aktywności G w aktywność F [35].

Warto dodać, że peptydy chemotaktyczne indukują polimeryzację aktywności nie tylko w filamentach aparatu ruchowego, ale także w mikrotubulach. Adherencja komórki wywołuje natomiast polimeryzację przez sygnał płynący innymi szlakami metabolicznymi [40].

Niestymulowane, sferyczne neutrofile mają aktywność rozszarpaną w cytoplazmie, komórka spolaryzowana po aktywacji wykazuje obecność aktywności głównie na przedniej części komórki, a więc tam, gdzie jest najwięcej pseudopodiów i struktur receptorowych [46]. Taką dystrybucję obserwuje się po stymulacji neutrofila czynnikami chemotaktycznymi oraz niektórymi cytokinami: TNF, limfotoksyną, GM-CSF i IL-3 [46]. W odpowiedzi na PMA neutrofile nie wykazują biegunowych zmian kształtu, ale dochodzi do polimeryzacji aktywności. Uważa się, że pozareceptorowy sygnał rozprzestrzenia się innymi szlakami, najprawdopodobniej główną rolę odgrywa tu układ DAG/PKC [47]. Aktywność współdziała z wieloma białkami komórkowymi. Zwraca się uwagę na fakt, że kolpaktyna, białko z grupy lipokortyn ma zdolność wiązania aktywności. Udowodniono, że jest ono substratem dla onkogenów oraz kinaz tyrozynowych, białek związanych z receptorami dla czynników wzrostowych [1]. Aktywność jest stosunkowo łatwo oznaczana w komórce metodami analizy przepływowej (*flow*), gdy zastosuje się fallacydynę – fluorescencyjny wskaźnik wiążący ją. Posługując się tą metodą wykazano, że neutrofile noworodków mają wyższy poziom aktywności F, ale słabszą zdolność do jej polimeryzacji niż neutrofile osób dorosłych. Można tym faktem tłumaczyć słabszą ruchliwość noworodkowych neutrofilów [15].

UWAGI KOŃCOWE

W niniejszym artykule nie zostały omówione inne mniej poznane lub hipotetyczne drogi rozprzestrzeniania się sygnału po aktywacji. Nie zostały bowiem poruszone takie zjawiska,



Rys. 5. Model dróg doprowadzających po transdukcji sygnału do polimeryzacji aktyny [35]

jak: wpływ innych produktów metabolizmu fosfoinozytoli, oddziaływanie wytwarzanych przez komórkę metabolitów kwasu arachidonowego (LTB₄, PAF), wpływ innych niż Ca²⁺ jonów, znaczenie zmian pH, rola innych kinaz niż kinaza C czy rola kalmoduliny [24, 36].

Bardzo wiele zagadnień dotyczących receptorów pozostaje nadal nie wyjaśnionych i nie rozwiązanych mimo intensywnie prowadzonych badań. Szczególnie mechanizm przekazywania sygnału od receptora do molekuł efektorowych, a zwłaszcza drogi aktywacji fosfodiesteraz czy system działania białek G w neutrofilach pozostają w sferze mniej lub bardziej udokumentowanych hipotez. Interesujące wydają się być doniesienia zwracające uwagę na rolę onkogenów w procesach proliferacyjnych komórek i powiązania ich z metabolizmem fosfoinozytoli; niektóre onkogeny (ras, src) kodują bowiem białka o własnościach kinaz aktywujących metabolizm tych związków [1, 44].

Dalszy postęp wiedzy prowadzący do precyzyjnej oceny zjawisk biochemicznych i biofizycznych zachodzących w neutrofilach po aktywacji wymaga jeszcze dużo nowych

danych eksperymentalnych. Klonowanie receptorów budzi nadzieje na uzyskanie pełniejszych informacji o ich strukturze, sekwencji aminokwasowej i funkcjach.

LITERATURA

- [1] ALLEN RA, TRAYNOR AE, OMANN GM, JESAITIS AJ. The chemotactic peptide receptors. A model for future understanding of chemotactic disorders. *Hematol Oncol Clin North Amer* 1988; 2: 33–59.
- [2] BERGER M, BIRX DL, WETZLER EM. Calcium requirements for increased complement receptor expression during neutrophil activation. *J Immunol* 1985; 135: 1342–1348.
- [3] BOKOCH GM, GILMAN AG. Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell* 1984; 38: 301–308.
- [4] CATTERALL WA. The emerging molecular view of the sodium channel. *Trends Neurosci* 1982; 5: 303–306.
- [5] COCKROFT S, ALLAN D. The fatty acid composition of phosphatidylinositol, phosphatide and 1,2-diacylglycerol in stimulated human neutrophils. *Biochem J* 1984; 222: 557–559.
- [6] 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.
- [7] DICKEY BF, YUNG PYUNH, WILLIAMSON KC, NAVARRO J. Identification and purification a novel G protein from neutrophils. *FEBS Lett* 1987; 219: 289–292.
- [8] ELFERINK JGR, DEIERKAUF M. The effect of quin 2 on chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; 846: 364–372.
- [9] FEISTER AJ, BROWDER B, WILLIS HE, MOHANAKUMAR T, RUDDY S. Pertussis toxin inhibits human neutrophil responses mediated by the 42-kilodalton IgG Fc receptors. *J Immunol* 1988; 141: 228–233.
- [10] GILMAN AG. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 1984; 36: 577–579.
- [11] GILMAN AG. G proteins: Transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 615–649.
- [12] GERSHAM HD, CLEMENT LT, VOLANAKIS JE, BROWN EJ. Cholera toxin and pertussis toxin regulate the Fc receptor-mediated phagocytic response of human neutrophils in a manner analogous to regulation by monoclonal antibody 1C2. *J Immunol* 1987; 139: 4159–4166.
- [13] HARDEN TK. The role of quanine nucleotide regulatory proteins in receptor-selective direction of inositol lipid signalling. [w:] Inositol lipids in cell signalling. (red) Michell RH, Drummond AH, Downes CP, Academic Press Ltd, 1989: 113–133.
- [14] HESCHLER J, ROSENTHAL W, TRAUTWEIN W. The GTP-binding protein G_o regulates neuronal calcium channels. *Nature* 1987; 325: 445–449.
- [15] HILMA A, HOWARD TH. F-actin content of neonate and adult neutrophils. *Blood* 1987; 69: 945–949.
- [16] HOKIN LE. Receptors and phosphoinositide-generated second messengers. *Annu Rev Biochem*. 1985; 54: 205–235.
- [17] HOLI ENBERG MD. Membrane receptors and hormone action. *Pharmac Rev* 1979; 30: 393–410.
- [18] HOLLENBERG MD. Mechanisms of receptor-mediated transmembrane signalling. *Experientia* 1986; 42: 718–727.
- [19] HOWARD TM, MEYER WH. Chemotactive peptide modulation of actin assembly and locomotion in neutrophils. *J Cell Biol* 1984; 98: 1265–1271.
- [20] KAPLAN J. Polypeptide-binding membrane receptor: Analysis and classification. *Science* 1981; 212: 14–20.
- [21] KELLER HU, ZIMMERMANN A. Shape, movement and function of neutrophil granulocytes. *Biomed Pharmacother* 1987; 41: 285–289.
- [22] KORCHAK HM, VIENNG K, RUTHERFORD LG. Stimulus response coupling in the human neutrophil II. Temporal analysis of changes in cytosolic calcium and calcium efflux. *J Biol Chem* 1984; 259: 4076–4082.
- [23] 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.
- [24] LACKIE JM. The behavioural repertoire of neutrophils requires multiple signal transduction pathways. *J Cell Sci* 1988; 89: 449–452.

- [25] LAD PM, OLSON CV, GREWAL IS, FROLICH M, SMILEY PA, SCOTT SJ. Role of GTP-binding proteins in the regulation of the human neutrophil. [w:] *Leukocytes and host defense*. Alan R Liss Inc, 1986: 373–378.
- [26] LASSING I, LINDBERG U. Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 1985; **314**: 472–474.
- [27] LEW PD, MONOD A, WALDVOGEL FA, DEWALD B, BAGGIOLINI M, POZZAN T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J Cell Biol* 1986; **102**: 2197–2204.
- [28] LEW PD, WOLLHEIM CB, WALDVOGEL FA, POZZAN T. Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes in intracellular calcium-buffering capacity correlation with exocytosis and O₂ production in human neutrophils. *J Cell Biol* 1984; **99**: 1212–1220.
- [29] MANNING DR, GILMAN AG. The regulatory component of adenylate cyclase and transducin. A family of structurally homologous guanine nucleotide-binding proteins. *J Biol Chem* 1983; **258**: 7059–7063.
- [30] McCOLL SR, KREIS C, DIPERSIO JF, BORGEAT P, NACCACHE PH. Involvement of guanine nucleotide binding proteins in neutrophil activation and priming by GM-CSF. *Blood* 1989; **73**: 588–591.
- [31] MEANS AR. Molecular mechanisms of action of calmodulin. *Recent Progress in Hormone Res* 1988; **44**: 223–262.
- [32] MUELLER H, SKLAR LA. Coupling of antagonistic signalling pathways in modulation of neutrophil function. *J Cell Biol* 1989; **40**: 287–294.
- [33] NACCACHE PH, THERRIEN S, CAON AC, LIAO N, GILBERT C, McCOLL SR. Chemoattractant-induced cytoplasmic pH changes and cytoskeletal reorganization in human neutrophils. Relationship to the stimulated calcium transients and oxidative burst. *J Immunol* 1989; **142**: 2438–2444.
- [34] NASMITH PE, GRINSTEIN S. Cytosolic calcium, oxygen consumption and the intracellular pH of stimulated neutrophils. *Bioscience Rep* 1988; **8**: 65–76.
- [35] OMMAN GM, ALLEN RA, BOKOCH GM, PAINTER RG, TRAYNOR AE, SKLAR LA. Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. *Physiol Rev* 1987; **67**: 285–322.
- [36] SKLAR LA. Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. *Adv Immunol* 1986; **39**: 95–143.
- [37] SKLAR LA, OADES ZG. Signal transduction and ligand-receptor dynamics in the human neutrophil. Transient responses and occupancy response relation at the formyl peptide receptor. *J Biol Chem* 1985; **260**: 11468–11475.
- [38] SMIGEL MT, KATADA JK, NORTHUP GM, BOKOCH MU, GILMAN AG. Mechanisms of guanine nucleotide mediated regulation of adenylate cyclase activity. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1984; **17**: 1–18.
- [39] SNYDERMAN RM, PIKE MC, LANE B. A chemoattractant receptor on macrophage exists in two affinity states regulated by guanine nucleotides. *J Cell Biol* 1984; **98**: 444–448.
- [40] SOUTHWIK FS, DABIVI GA, PASCHETTO M, ZIGMOND SH. Polymorphonuclear leukocyte adherence induces actin polymerization by a transduction pathway which differs from that used by chemoattractants. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1561–1570.
- [41] TAUBER AI. Protein kinase C and the activation of the human NADPH-oxidase. *Blood* 1987; **69**: 711–720.
- [42] THERRIEN S, NACCACHE PH. Guanine nucleotide-induced polymerization of actin in electroporabilized human neutrophils. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1125–1132.
- [43] WHITE JR, NACCACHE PH, SHA'AFI RI. Stimulation by chemotactic factor of actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils. *J Biol Chem* 1983; **258**: 14041–14047.
- [44] WIKIĘŁ H, STROSZNAJDER J. Fosfolipidy inozytowe, ich metabolizm i znaczenie w procesie przekazywania informacji. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 1–22.
- [45] YULI I, SNYDERMAN R. Rapid changes in light scattering from human polymorphonuclear leukocytes exposed to chemoattractants. Discrete responses correlated with chemotactic and secretory functions. *J Clin Invest* 1984; **73**: 1408–1417.
- [46] ZECK-KAPP G, KAPP A, RIEDE UN. Activation of human polymorphonuclear neutrophilic granulocytes by immunomodulating cytokines: an ultrastructural study. *Immunobiol* 1989; **179**: 44–55.
- [47] ZIMMERMANN A, GEHR P, KELLER HU. Diacylglycerol-induced shape changes, movements and altered F-actin distribution in human neutrophils. *J Cell Sci* 1988; **90**: 657–666.

Otrzymano w listopadzie 1990 r.

Przyjęto w styczniu 1991 r.

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

IMMUNOCHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK TYLAKOIDOWYCH ANTEN ENERGETYCZNYCH*

IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES OF PROTEINS OF THYLAKOID ENERGETIC ANTENNAE

Grzegorz JACKOWSKI, Jolenta SCHNEIDER

Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie. Omówiono stan wiedzy na temat polipeptydów wchodzących w skład tylakoidowych kompleksów anten energetycznych. Szczególną uwagę zwrócono na dane dotyczące sekwencji kodujących, składu aminokwasowego i struktury drugorzędowej tych polipeptydów. Na podstawie szczegółowo przedstawionych wyników badań immunologicznych przedyskutowano relacje biogenetyczne pomiędzy polipeptydami kompleksów antenowych.

Słowa kluczowe: tylakoidy, LHCPII, apo-CP29, apo-CP26, LHCPI, przeciwciało, domena.

Summary. The current state of knowledge on the polypeptides of thylakoid complexes of energetic antennae is presented. The emphasis placed on the data pertaining to Cab genes, aminoacid composition and secondary structure of these polypeptides. On the basis of results of immunological investigations the biogenetic relations of polypeptides within and between antennae complexes are discussed.

Key words: thylakoids, LHCPII, apo-CP29, apo-CP26, LHCPI, antibody, domain.

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 dodecyłu sodu; PAGE – elektroforeza na żelu poliakrylamidowym; m. cz. – masa cząsteczkowa

WSTĘP

W ostatnich latach znacznie wzrosła wiedza o ogólnych właściwościach kompleksów antenowych [23] i ich komponentach białkowych: LHCPII, apo-CP29, apo-CP26, LHCPI. Szczególnie intensywne badania koncentrują się wokół zagadnień dotyczących:

*Niniejsze opracowanie powstało w ramach CPBP 04.12.4.1.

- (1) określenia sekwencji kodujących te białka i regulacji ich ekspresji,
- (2) obróbki potranslacyjnej form prekursorowych białek kompleksów antenowych,
- (3) mechanizmów montażu włączania kompleksów białkowo-barwnikowych do błon tylakoidowych.

Postęp w tych dziedzinach w odniesieniu do LHCII został niedawno zreferowany w pracy przeglądowej Chitnisa i Thornbera [10]. Ze względu na brak analogicznych opracowań, w publikacji niniejszej skupiliśmy uwagę na immunochemicznych właściwościach polipeptydów kompleksów antenowych.

WŁAŚCIWOŚCI POLIPEPTYDÓW KOMPLEKSÓW ANTENOWYCH LHCPII

W skład LHCII wchodzi polipeptydy o masach cząsteczkowych 23–30 kDa [5, 14]. Ich liczba jest u poszczególnych gatunków zróżnicowana w przedziale 1–5, przy czym najczęściej stwierdza się 2 lub 3 [10]. W tabeli 1 zestawiono masy cząsteczkowe LHCPII pięciu gatunków roślin najlepiej poznanych pod względem struktury kompleksów chlorofilowo-białkowych.

TABELA 1. Masy cząsteczkowe polipeptydów kompleksów antenowych pięciu wybranych gatunków roślin

Gatunek		CP29		CP26		LHCI	
LHCII		kDa		kDa		kDa	
kDa	literatura	kDa	literatura	kDa	literatura	kDa	literatura
Szpinak							
28 + 26,5	[21]	28	[54]	25 + 22,5	[21]	23 + 22 + 20	[36]
29,5 + 27	[54]	29	[39]			24 + 23,5 + 21,5	[18]
27 + 25	[39]	27 + 26	[8]			25,8 + 25 + 24 + 23	[21]
25 + 24	[32]	25,5	[18]				
Jęczmień							
27 + 25 + 24	[15]	28	[31]	–	–		
27 + 26 + 25	[59]					4 polipeptydy 24–22	[59]
Groch							
29 + 27 + 26 + 25	[45]	–	–	–	–	24 + 23,5 + 21,5	[14]
28 + 26 + 25,5 + 24,5	[14]						
Kukurydza							
30 + 29 + 28,8 + 26	[5]	31	[5]	29 + 28,5	[5]	kilka polipeptydów poniżej 26 kDa	[7]
30 + 29,5 + 29 + 28,8 + 28,5	[7]	29	[25]				
Soja							
28 + 27,2 + 26,8	[43]	29	[43]	–	–	–	–

Z przytoczonych danych wynika, że pochodzące z różnych pracowni oznaczenia mas cząsteczkowych LHCPII dla danego gatunku różnią się między sobą, a nawet znane są przypadki, gdy różne laboratoria podają różną liczbę LHCPII dla określonego gatunku (np. dla grochu). Przyczyny rozbieżności tkwią m.in. w fakcie, że dwie najczęściej stosowane metody izolacji oczyszczonych LHCII (wytrącanie LHCII po ultrawirowaniu upłynnionych Tritonem X-100 tylakoidów lub elektroforeza upłynnionych tylakoidów),

prowadzą z reguły do uzyskania preparatów o niejednakowym składzie polipeptydowym [23 i cyt. literatura].

LHCPII syntetyzowane są pod kontrolą jądrową na rybosomach cytoplazmatycznych w formie hydrofilnych prekursorów (pLHCPII) dłuższych od dojrzałego białka o 31–39 (a w jednym przypadku o 21) aminokwasów stanowiących peptyd tranzytowy [9, 17, 20]. Zlokalizowany na N-końcu pLHCPII peptyd tranzytowy zawiera dużo aminokwasów zasadowych i wykazuje znaczny stopień międzygatunkowej zmienności. Przykładem regiony kodujące peptydy tranzytowe pLHCPII rzęsy i grochu wykazujące tylko 60% podobieństwa [10]. Peptyd tranzytowy nadaje pLHCPII zdolność do wiązania się z otoczką chloroplastową, do transportu przez stromę oraz do włączania w błony tylakoidowe. Przypuszcza się, że w procesie wiązania pLHCPII z otoczką chloroplastową istotną rolę odgrywa drugorzędowa struktura pLHCPII, to znaczy, że określona domena konformacyjna cząsteczki polipeptydu wiąże się z receptorami zlokalizowanymi w otoczkce [11, 34]. W trakcie transportu przez stromę pLHCPII ulega zmianom nadającym jej charakter hydrofobowy i zdolność do włączenia w błonę tylakoidu. Przypuszczano, że zmiana ta polega na dołączeniu reszty kwasu palmitynowego, o którym wiadomo, że jest związany z dojrzałą formą LHCPII oraz że nadaje prekursorowej formie białka D₂ (tzw. wiążącego herbicydy) zdolność integracji do tylakoidów [42]. Jednak ostatnio Fulson i Cline [22] uzyskali przekonujące dowody, że czynnik nadający pLHCPII grochu zdolność włączania do tylakoidu ma naturę białkową. Po włączeniu do błony tylakoidu pLHCPII ulega proteolitycznej obróbce do formy dojrzałej, w czym jak się sądzi, uczestniczy tylakoidowa proteaza (dotąd nie oczyszczona). Od powyższego schematu (pod względem roli i losów peptydu tranzytowego), który z niewielkimi modyfikacjami wydaje się powtarzać u wszystkich dotąd badanych roślin wyższych, odbiega *Euglena*. Rikin i Schwartzbach [50] stwierdzili, że poliklonalne przeciwciała przeciwko dojrzałym LHCPII (25,6 i 27,2 kDa) wytrącają z ekstraktu białek syntetyzowanych *in vivo* w komórkach *Euglena* cztery wielko-cząsteczkowe białka o m. cz. 207, 161, 122 i 110 kDa. W doświadczeniach typu *pulse-chase* z użyciem [³⁵S] wykazano, że wraz z upływem czasu znakowania ilość każdego z czterech białek zmniejsza się, natomiast wzrasta ilość LHCPII, przy czym kinetyka tych zmian odpowiada zależności prekursor – produkt. Wobec czego owe 4 wielko-cząsteczkowe białka można uznać za prekursory LHCPII. Rikin i Schwartzbach [50] umacniają ten wniosek spostrzeżeniem, że dwie klasy mRNA *Euglena* o masach 6,6 i 8,3 kb hybrydują z regionem kodującym LHCPII u *Arabidopsis thaliana*, a wielkość 8,3 kb wystarczy do kodowania nawet najcięższego (207 kDa) białka prekursorowego LHCII. Natomiast Houlne i Schantz [30] stwierdzili, że LHCPII *Euglena* jest programowany w układzie translacji *in vitro* przez mRNA o długości 7,5 kb. Można więc sądzić, że *Euglena* syntetyzuje wyjątkowo wielkie prekursory LHCPII, dodatkowo odróżniające się od pLHCPII innych gatunków glonów i roślin wyższych wolnym tempem obróbki do formy dojrzałej. Zważywszy, iż trudno sobie wyobrazić, aby transport pLHCPII do chloroplastów *Euglena* uwarunkowany był przez peptyd tranzytowy o masie 80–180 kDa, Rikin i Schwartzbach [50] sądzą, że długość peptydu tranzytowego w tym przypadku nie odbiega od stwierdzonej u innych roślin, natomiast pLHCPII jest polibiałkiem rozcinanym wewnątrz chloroplastu na 2 lub 3 cząsteczki LHCPII.

Pomimo kilkunastoletnich, intensywnych badań, jakie prowadzone są w wielu laboratoriach nad LHCII i jego składnikiem białkowym, żadne z dojrzałych LHCPII nie zostało dotąd bezpośrednio zsekwencjonowane. Jednak znana jest sekwencja LHCPII jedenastu

gatunków roślin wydedukowana na podstawie struktury pierwszorzędowej sklonowanych genów kodujących LHCPII, zwanych Cab genami [10, 17, 20]. Należą one do rośliny wielogenowej o liczbie genów zróżnicowanej w zależności od gatunku rośliny, np. u *Arabidopsis thaliana* wynosi ona 3, u *Pisum sativum* 8, a u *Petunia hybrida* 16 genów [12, 20, 40]. Wśród genów kodujących białka LHCII wyróżnia się znacznie liczniejszą, występującą u większości zbadanych roślin grupę genów pozbawionych sekwencji intronowych zaliczaną do typu I oraz grupę genów typu II zawierających intron [10, 51]. Na przykład wśród 8 Cab genów pomidora 6 należy do typu I, a tylko 2 do typu II [17]. Obydwa typy genów odróżnia również stopień dywergencji sekwencji peptydu tranzytowego i dojrzałego białka. Dywergencja sekwencji aminokwasów dojrzałego białka wynosi od 1,3 do 9,4 dla typu I genów Cab i 13,6 do 16% w typie II, natomiast w przypadku peptydu tranzytowego różnice te są znacznie wyższe i wyrażają się w granicach od 0 do 51,5% w typie I oraz od 57,8 do 84,8% w typie II genów [17]. Sporo informacji na temat Cab genów różnych roślin wraz z zestawieniem sekwencji aminokwasowych prekursorowych form białek LHCII określonych na podstawie sekwencji genowych zawierają artykuły Chitnisa i Thornbera [10] oraz Demmina i wsp. [17]. Z przeglądu tych sekwencji wynika, że długość cząsteczki LHCPII wynosi od 211 u *Silene pratensis* [58] do 234 aminokwasów u kukurydzy [41]. Występuje przy tym wysoki stopień podobieństwa międzygatunkowego, wskaźnikiem czego może być fakt, że sekwencje LHCPII rzęsy, pszenicy, grochu i pomidora są w 90% identyczne [28]. Z kolei ze stosunkowo nielicznych danych porównawczych dotyczących sekwencji aminokwasowych poszczególnych białek wchodzących w skład LHCII w obrębie danego gatunku wynika, że w tym przypadku podobieństwo jest również wysokie i sięga np. 85% dla dwu genów LHCPII u rzęsy [35], 85–97% wśród kilku genów LHCPII pomidora [47], a nawet 98–99% w przypadku 4 genów Cab soi [17].

Wśród aminokwasów wchodzących w skład LHCPII wyraźnie przeważają hydrofobowe z najliczniej występującymi: glicyną, alaniną i leucyną. Tylko te trzy wymienione aminokwasy stanowią ponad 35% składu białka LHCII grochu o m. cz. 27 kDa grochu [45].

Od szeregu lat trwają prace zmierzające do poznania struktury drugorzędowej LHCPII. Wiele informacji na ten temat wniosły badania z zastosowaniem techniki trawienia białek proteazami, a zwłaszcza trypsyną. W serii prac pochodzących z pracowni Arntzena [45, 53] stwierdzono, że trypsyna katalizuje odcięcie od LHCPII grochu trzech peptydów o m. cz. 1,0–1,5 kDa. Efekt ten obserwowano, gdy działaniu trypsyny poddawano zarówno oczyszczone dwa główne białka LHCII grochu o m. cz. 26 i 27 kDa, jak i preparat błon tylakoidowych czy też liposomy fosfatydylocholinowe z wbudowanym LHCII. Wnioskowano, że miejsca podatne na działanie trypsyny znajdują się od strony zewnętrznej błony tylakoidowej, zwróconej w kierunku stromy. Analiza sekwencji trzech oczyszczonych, odciętych peptydów [1,0–1,5 kDa] wykazała, że są one fragmentami oktopeptydu, że mają własności hydrofilne oraz że jeden z nich zawiera miejsce fosforylacji, czyli resztę treoninową. Zsekwencjonowanie przez Coruzzi i wsp. [12] genu kodującego LHCPII grochu umożliwiło umiejscowienie oktopeptydu na N-końcu łańcucha cząsteczki LHCPII. Interesujące, że białka o m. cz. 29 i 25 kDa (mniej obficie reprezentowane w porównaniu z 27 i 26 kDa białkami LHCII grochu) nie ulegają fosforylacji [45], co wskazuje, że ich N-końcowe fragmenty różnią się konformacją lub sekwencją od analogicznych fragmentów białek 27 i 26 kDa. Dalszych informacji dostarczyły badania Hinz i Welinder [28], które poddały szczegółowej analizie 16 kDa fragment LHCPII kukurydzy, jaki pozostał po odcięciu przez trypsynę małych (o m. cz. < 2 kDa) N-końcowych peptydów. Opierając się

na danych pochodzących z analizy widm dichroizmu kołowego LHCII oraz produktów jego trawienia trypsyną autorki zasugerowały, że większa część fragmentu 16 kDa znajduje się wewnątrz błony tylakoidowej i wiąże pełną pulę chlorofilu b oraz większość cząsteczek chlorofilu a i ksantofile, jakie przypadają na jeden polipeptyd LHCII. Hinz i Welinder [28] zaproponowały model struktury drugorzędowej fragmentu 16 kDa przyjmując, że łańcuch polipeptydowy przenika błonę tylakoidu w konformacji α -helikalnej oraz że każdy z segmentów transmembranowych składa się z 24 aminokwasów (rys. 1c). Zakładając identyczność sekwencji aminokwasów LHCP II kukurydzy i pszenicy Hinz i Welinder [28] przewidziały umiejscowienie skrętów α -helisy LHCP II oraz wysunęły tezę że błonę tylakoidu przenikają cztery α -helisy oraz że C-koniec łańcucha polipeptydu LHCII wnika do stromy tak, jak to wcześniej wiedziano o N-końcu. Model ten koresponduje z modelem Anderson i Goodchilda [2] (rys. 1b), którzy wykazali, że przeciwciała przeciwko syntetycznemu polipeptydowi o sekwencji aminokwasowej identycznej z C-końcowym fragmentem LHCP II szpinaku reagują z preparatami tylakoidów typu *right side-out*, natomiast nie reagują z preparatami typu *inside-out*.

Wyżej przedstawiony model Hinz i Welinder oraz Anderson i Goodchilda nie jest zgodny z zaproponowanym wcześniej przez Karlin-Neumann i wsp. [58] modelem (rys. 1a), który na podstawie wykresu hydropatii LHCP II *Lemna gibba* przyjmuje, że błonę tylakoidu przenikają nie cztery, a trzy α -helikalne segmenty LHCP II oraz że jego C-koniec jest eksponowany w stronę światła tylakoidu.

Do tej pory nie wiadomo, w jaki sposób cząsteczki chlorofilu i ksantofili są wbudowywane w strukturę LHCII. Już kilka lat temu sugerowano, że są one głęboko ukryte w hydrofobowej części łańcucha polipeptydowego [44]. Hinz i Welinder [28] potwierdziły to przypuszczenie w odniesieniu do chlorofilu b, którego ilość w przeliczeniu na polipeptyd okazała się taka sama w LHCII przed trawieniem trypsyną, jak i w pozostałym po trawieniu fragmencie 16 kDa. Autorki jednak sądzą, że przynajmniej jedna cząsteczka chlorofilu a oraz część cząsteczek ksantofili jest związana z hydrofilnym regionem łańcucha LHCP II. Nie wiadomo też, który(e) z aminokwasów wiąże cząsteczki chlorofili w kompleksie. Histydyna wiążąca cząsteczki białek z chlorofilem w bakteryjnych kompleksach chlorofilowo-białkowych [16] nie może spełniać tej roli, przynajmniej w modelu Hinz i Welinder [28]. Cały bowiem fragment 16 kDa zawiera zaledwie 2 reszty histydynowe, podczas gdy związane jest z nim 11–13 cząsteczek chlorofili a i b. Wechsler i wsp. [57] sugerowali, że oprócz histydyny w wiązaniu chlorofilu mogą uczestniczyć również glutamina i asparagina.

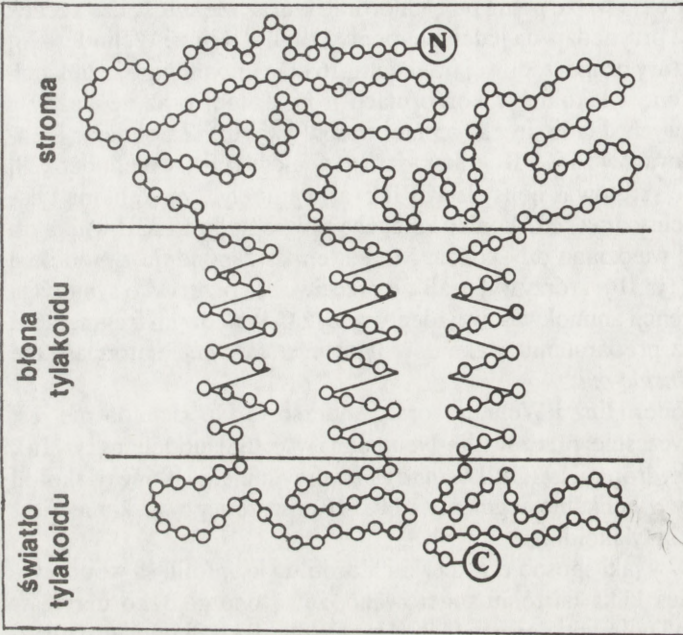
APO-CP29

Z wyjątkiem ostatniej pracy Camm i Green [8] informującej o dwu białkach (o m. cz. 26 i 27 kDa) wchodzących w skład CP29 szpinaku u wszystkich badanych do tej pory gatunków roślin (w tym również u szpinaku [18, 39, 54]) w kompleksie tym znajdowano tylko jeden polipeptyd, którego masa cząsteczkowa w zależności od gatunku mieściła się w przedziale 28–31 kDa [4, 26, 43] (tab. 1).

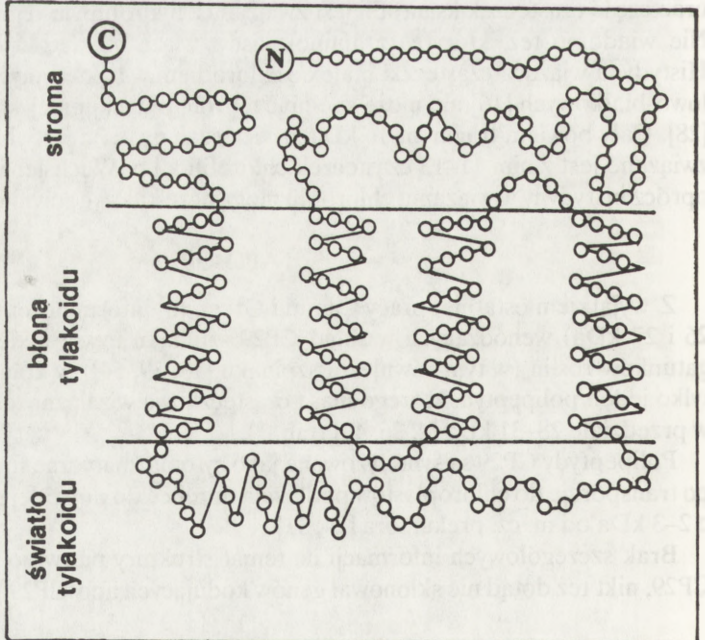
Polipeptydy CP29 są syntetyzowane jako cytoplazmatyczne formy prekursorowe, które po transporcie do chloroplastów podlegają obróbce do dojrzałej postaci o m. cz. mniejszej o 2–3 kDa od m. cz. prekursora [24, 31].

Brak szczegółowych informacji na temat struktury pierwszo- i drugorzędowej białka CP29, nikt też dotąd nie sklonował genów kodujących apo-CP29 [23]. Wprawdzie w wyżej

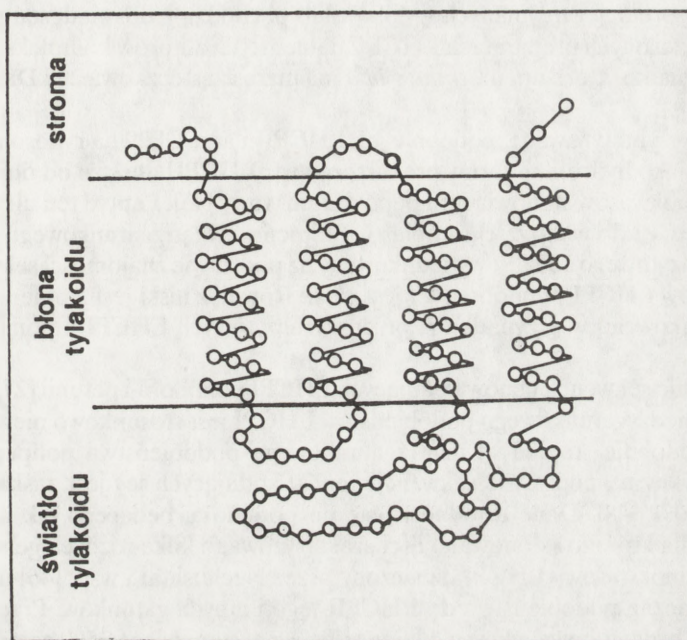
A



B



C



Rys. 1. Model struktury drugorzędowej LHCPII opracowany A – przez Karlina-Neumanna i wsp. ([33] uproszczone), B – przez Anderson i Goodchilda ([2] uproszczone), C – model struktury drugorzędowej fragmentu LHCPII opornego na działanie trypsyny, opracowany przez Hinz i Welinder ([28] uproszczone)

wspomnianej pracy Camm i Green z 1989 r. [8] znajduje się informacja, że u pomidora występuje tylko jeden gen dla apo-CP29 i że białko to jest syntetyzowane *in vitro* w postaci 30 kDa prekursora, ale dane te pochodzą z niepublikowanych dotąd prac E. Pichersky'ego i współpracowników. Apo-CP29 nie jest fosforylowane przez zależną od plastochinonu kinazę uczestniczącą w regulacji dystrybucji energii wzbudzenia przez LHCII pomiędzy PSII i PSI [19].

APO-CP26

Według Bassi i wsp. [5] CP26 kukurydzy zawiera dwa nie podlegające fosforylacji polipeptydy o masach cząsteczkowych 29 i 28,5 kDa. W skład CP26 szpinaku wchodzi też dwa nie ulegające fosforylacji polipeptydy o masach cząsteczkowych 25 i 22,5 kDa [19].

LHCPI

Opisywana przez różnych badaczy liczba białek wchodzących w skład LHCI (tab. 1) u poszczególnych gatunków roślin wynosi od 1 do 4, przy czym ich masy cząsteczkowe mieszczą się w zakresie 20–26 kDa [3, 6, 21, 36, 37, 55]. Anandan i wsp. [1] zaliczają do LHCI jęczmienia także dwa polipeptydy o mniejszych m. cz. (17 i 11 kDa), jednak jest dość

prawdopodobne, że mogą one reprezentować zanieczyszczenia preparatu LHCPI białkami centrum reakcji PSI. Ostatnio Nechushtai i wsp. [46] wystąpili z dość zaskakującą tezą, że wszystkie poprzednio opisane przypadki heterogeniczności białek LHCI są wynikiem błędnej interpretacji otrzymanych wyników lub pochodzą z doświadczeń prowadzonych na zanieczyszczonych preparatach LHCI. Zdaniem tych autorów kompleks LHCI zawiera tylko jedno białko, które np. u *Lemna gibba* ma masę cząsteczkową 20 kDa, a u grochu 21 kDa [3, 46].

LHCPI są syntetyzowane, podobnie jak LHCPII i apo-CP29 na rybosomach cytoplazmatycznych jako hydrofilne formy prekursorowe [pLHCPI] dłuższe od dojrzałego białka o 32–45 aminokwasów stanowiących peptyd tranzytowy [48]. Peptyd ten ulega odcięciu po przejściu LHCPI do wnętrza chloroplastu. Stopień wewnątrzgatunkowego podobieństwa peptydu tranzytowego LHCPI wydedukowany na podstawie znajomości sekwencji sklonowanych genów LHCPI pomidora [48] jest niski. Również niski jest stopień podobieństwa międzygatunkowego w przypadku peptydów tranzytowych LHCPI u pomidora i petunii [48, 52].

Porównanie sekwencji genów kodujących LHCPI pomidora i petunii [27, 52] wskazuje, że stopień międzygatunkowego podobieństwa LHCPI jest stosunkowo niewysoki i wynosi ok. 28%. Podobnie stopień wewnątrzgatunkowego podobieństwa polipeptydów LHCI (wydedukowany na podstawie sekwencji genów kodujących je) jest zaskakująco niski i wynosi 35–40% [48]. Dane te odnoszą się do pomidora, będącego jak dotąd jedynym gatunkiem, dla którego sklonowano i scharakteryzowano kilka różnych genów LHCPI.

Skład aminokwasowy LHCPI oznaczony przez Nechushtai i wsp. [46] u *Lemna gibba* wykazuje znaczne podobieństwo do LHCPII tego i innych gatunków. Przeważają w nim aminokwasy hydrofobowe: glicyna, alanina i leucyna, stanowiące 35% całości.

Struktura drugorzędowa LHCPI nie była do tej pory szczegółowo badana. Opierając się na wynikach proteolitycznego trawienia błon tylakoidów grochu, Oritz i wsp. [1985 cyt. 27] sugerowali, że dwa cięższe polipeptydy (22 i 23 kDa) LHCI zawierają regiony przenikające błonę tylakoidu i występujące poza nią, podczas gdy najlżejszy polipeptyd (20 kDa) jest całkowicie ukryty w błonie tylakoidu. Ostatnie spostrzeżenie potwierdzili Herrin i wsp. [27] dla 20 kDa LHCPI *Chlamydomonas reinhardtii*, gdzie polipeptyd ten pozostał nienaruszony po trawieniu tylakoidów pięcioma proteazami.

Rozmieszczenie barwników w obrębie cząsteczek LHCPI jest dotąd nieznanne.

WŁAŚCIWOŚCI IMMUNOLOGICZNE POLIPEPTYDÓW KOMPLEKSÓW ANTENOWYCH

Wśród technik stosowanych do badań białek kompleksów antenowych istotną rolę odgrywają metody immunologiczne. Umożliwiają one ustalenie podobieństw:

- 1) pomiędzy polipeptydami poszczególnych anten energetycznych,
- 2) form prekursorowych wobec dojrzałych,
- 3) form prekursorowych polipeptydów poszczególnych anten.

Dotyczy to podobieństw zarówno wewnątrz-, jak i międzygatunkowych. Biorąc pod uwagę, że w zdecydowanej większości badania tego typu prowadzone są na polipeptydach całkowicie zdenaturowanych, informacje uzyskiwane przy użyciu metod immunologicz-

nych dotyczą głównie podobieństwa domen sekwencyjnych. W sytuacji, gdy brak bezpośrednich danych o sekwencji aminokwasów badanych polipeptydów, a relacje pomiędzy zróżnicowaniem sekwencji kodujących a zróżnicowaniem dojrzałych LHCPII są niejasne, wyniki badań immunologicznych są istotne dla poznania dróg biogenezy białek kompleksów antenowych, tempa ich zmienności ewolucyjnej itp.

PODOBIENSTWO WEWNĄTRZGATUNKOWE I MIĘDZYGATUNKOWE LHCPII

Z badań nad LHCII wynika, że białka tego kompleksu wykazują pewien stopień podobieństwa immunologicznego. Podobieństwo to dotyczy nie tylko LHCPII występujących u określonego gatunku, ale ma także charakter międzygatunkowy. Najwięcej informacji odnośnie wewnątrzgatunkowego podobieństwa immunologicznego LHCPII zawiera praca Darr i wsp. [14]. Autorzy ci uzyskali kilkanaście monoklonalnych przeciwciał immunizując myszy preparatem LHCII grochu. Przeciwciała te charakteryzowała zróżnicowana zdolność rozpoznawania determinant antygenowych poszczególnych białkowych komponentów LHCII o m. cz. 28, 26, 25,5 i 24,5 kDa. Okazało się, że dwa przeciwciała nazwane MLH1 i MLH2 rozpoznawały wyłącznie odpowiednio białko 26 i białko 28 kDa. Sugeruje to, że wymienione białka nie są pochodnymi wspólnego cytoplazmatycznego prekursora i że mogą się różnić strukturą pierwszorzędową, bowiem używanie do doświadczeń całkowicie zdenaturowanych białek wyklucza różnice konformacyjne, przynajmniej w obrębie domen rozpoznawanych przez MLH1 i MLH2. Ponieważ domeny te, w przypadku obydwu białek, usuwa traktowanie trypsyną, można sądzić, że heterogenia białek 26 i 28 kDa dotyczy ich N-końcowego regionu. Darr i wsp. [14] opisali także grupę przeciwciał monoklonalnych o odmiennych właściwościach. Wszystkie one rozpoznawały białka o m. cz. 26, 25,5 i 24,5 kDa, a część z nich rozpoznawała ponadto białko o m. cz. 28 kDa. Biorąc pod uwagę, że wszystkie przeciwciała rozpoznające białka o m. cz. 25,5 i 24,5 kDa rozpoznawały też białko o m. cz. 26 kDa, można przypuszczać, że dwa mniejsze białka powstają przez potranslacyjną, proteolityczną obróbkę białka o m. cz. 26 kDa. Ponieważ N-terminalna domena białka o m. cz. 26 kDa rozpoznawana przez przeciwciało MLH1 jest nieobecna w białkach o m. cz. 25,5 i 24,5 kDa, wielce prawdopodobne wydaje się, że odcięcie właśnie N-końcowego fragmentu białka 26 kDa prowadzi do powstania polipeptydu 25,5 kDa, a następnie 24,5 kDa.

Za koncepcją powstawania polipeptydu 24,5 kDa przez obróbkę polipeptydu 26 kDa przemawiają wyniki badań Mulleta [45], który wykazał, że polipeptyd LHCII grochu o mniejszej masie cząsteczkowej 25 kDa (odpowiadający 24,5 wg Darr i wsp. [14]) nie ulega fosforylacji w przeciwieństwie do polipeptydu o m. cz. 27 kDa (odpowiadającego 26 kDa wg Darr i wsp.). Autor uważa, że polipeptyd 25 kDa powstaje przez ograniczoną proteolizę polipeptydu 27 kDa prowadzącą do odcięcia N-końcowego fragmentu podlegającego fosforylacji.

Międzygatunkowe podobieństwo immunologiczne LHCPII zostało udokumentowane w szeregu prac. Thaler i Jay [56] stwierdzili, że monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko LHCPII grochu są zdolne do rozpoznawania LHCPII szpinaku, fasoli, jęczmienia, kukurydzy, paproci *Nephrolepis* oraz *Chlamydomonas reinhardii*. W ostatnim przypadku reakcja z najbliższym z trzech LHCPII była dość słaba. Z kolei Darr i wsp. [14] stwierdzili zdolność monoklonalnych przeciwciał przeciwko 26 i 28 kDa LHCPII grochu

do rozpoznawania odpowiednich polipeptydów pomidora. Również w naszym laboratorium (Li Dok Su, Jackowski i Schneider dane niepublikowane) stwierdziliśmy intensywną reakcję monospecyficzných, poliklonalnych przeciwciał przeciwko LHCPII goździka z LHCPII jęczmienia.

Wyjątkiem pod tym względem wydaje się *Euglena*, u której trzy LHCPII o masach cząsteczkowych mieszczących się w przedziale 26–28 kDa reagują bardzo słabo z poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko LHCPII szpinaku i *Chlamydomonas reinhardtii* [13].

Wszystkie wyżej przedstawione przypadki interpretuje się jako wyraz znacznego międzygatunkowego podobieństwa struktury aminokwasowej LHCPII, bowiem opisane wyniki pochodzą z doświadczeń, w których przeciwciałami sondowano polipeptydy całkowicie zdenaturowane, uprzednio poddane SDS-elektroforezie, w związku z czym mało prawdopodobne jest rozpoznawanie oparte na komplementarności domen konformacyjnych.

WEWNĄTRZGATUNKOWE PODOBIEŃSTWO CP29

Nieliczne informacje dotyczące wewnątrzgatunkowego podobieństwa apo-CP29 znajdują się w pracy Camm i Green [8]. Stwierdzono w niej, że monoklonalne przeciwciało MLH2 skierowane przeciwko LHCPII grochu (29 kDa) rozpoznawało obydwa białka CP29 szpinaku o m. cz. 26 i 27 kDa, ale reakcja ta była znacznie intensywniejsza dla cięższego polipeptydu. Zdaniem autorek jest możliwe, że obydwa białka CP29 są pochodnymi tego samego prekursora, ponadto lżejsze (26 kDa) z nich powstaje z cięższego przez odcięcie N-końcowego peptydu, co prowadzi do znacznego obniżenia powinowactwa do MLH2. Poparciem powyższej sugestii są wyniki cytowanych przez autorki niepublikowanych prac Pichersky'ego i współpracowników, stwierdzające, że 30 kDa prekursor białka CP29 syntetyzowany na matrycy sklonowanego genu białka CP29 pomidora podlega wewnątrz chloroplastu obróbce do dwóch polipeptydów po ok. 26 kDa.

WEWNĄTRZGATUNKOWE I MIĘDZYGATUNKOWE PODOBIEŃSTWO LHCI

Wewnątrzgatunkowe podobieństwo immunologiczne białek LHCI było badane przez Evans i Anderson [21] u szpinaku. Autorki te stwierdziły, że spośród czterech białek LHCI szpinaku jedno (25 kDa) jest rozpoznawane tylko przez jedno z grupy monospecyficzných, poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko pozostałym białkom LHCI. Układ reakcji immunologiczných pomiędzy pozostałymi białkami i monospecyficznymi przeciwciałami przedstawia tabela 2. Zawarte w niej wyniki wskazują na znaczne podobieństwo

TABELA 2. Wyniki reakcji immunologiczných polipeptydów LHCI szpinaku z monospecyficznymi, poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko tym polipeptydom [21]: [+] – reakcja, [-] – brak reakcji

Antygen kDa	Przeciwciało przeciwko		
	23kDa	24 kDa	25,8 kDa
23	+	-	+
24	+	+	+
25	+	-	-
25,8	+	+	+

immunologiczne LHCI z wyjątkiem polipeptydu 25 kDa i sugerują, że polipeptydy o m. cz. 23 i 24 kDa mogą być produktami proteolitycznej obróbki białka 25,8 kDa.

Williams i Ellis [60] pracując z grupą poliklonalnych i monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko LHCPI o m. cz. 23, 22 i 20 kDa, wykazali, że dwa najcięższe spośród wymienionych LHCPI grochu cechuje znaczny stopień pokrewieństwa immunologicznego, podczas gdy najlżejszy polipeptyd (20 kDa) jest słabo rozpoznawany przez przeciwciała dla dwóch pozostałych. Jednocześnie przeciwciała skierowane przeciw najlżejszemu polipeptydowi (20 kDa) bardzo słabo rozpoznaje obydwie cięższe, co wyklucza powstawanie polipeptydu 20 kDa przez obróbkę polipeptydów 23 i 22 kDa. Uzyskane dane wskazują, iż polipeptydy LHCI grochu należą do dwu grup kodowanych przez odrębne geny, które jednak wykazują pewien stopień pokrewieństwa sekwencyjnego. Wniosek ten potwierdza analiza wzorów trawienia LHCPI proteazą V8 ze *Staphylococcus aureus*, wskazująca, że wśród polipeptydów grochu istnieją dwie grupy podobieństw, identycznych z ustalonymi immunologicznie.

Międzygatunkowe podobieństwo immunologiczne LHCPI zostało wykazane przez Nechushtai i wsp. [46], którzy stwierdzili, że LHCPI *Lemna gibba* reagowały z przeciwciałem przeciwko LHC1b szpinaku. Z kolei Herrin i wsp. [27] ustalili, że przeciwciała anty 20 kDa LHCPI *Chlamydomonas reinhardtii* reagują z dwoma LHCPI grochu o m. cz. 20 i 22 kDa.

PODOBIEŃSTWO IMMUNOLOGICZNE POLIPEPTYDÓW RÓŻNYCH KOMPLEKSÓW ANTENOWYCH

Interesujący wydaje się problem pokrewieństwa immunologicznego białek różnych kompleksów antenowych. Wyniki badań na ten temat są dość kontrowersyjne. Lam i wsp. [36, 37] nie stwierdzili jakichkolwiek reakcji specyficznych, poliklonalnych przeciwciał anty LHCPII z LHCPI kukurydzy, a Williams i Ellis [60] używając przeciwciała zarówno mono-, jak i poliklonalne potwierdzili całkowity brak reakcji pomiędzy anty LHCPII a LHCPII grochu. Podobny brak reakcji monoklonalnego przeciwciała anty LHCPI z LHCPII u jęczmienia zaobserwowali Hoyer-Hansen i wsp. [31]. Wyniki uzyskane przy użyciu przeciwciał monoklonalnych całkowicie nie wykluczają immunologicznego pokrewieństwa LHCPI i LHCPII, bowiem oznaczają one tylko tyle, że żadne z białek jednego kompleksu nie zawiera domeny sekwencyjnej identycznej z domeną białka porównywanego kompleksu, przeciwko której monoklonalne przeciwciała wyprodukowano. Natomiast nie jest w tym przypadku wykluczone podobieństwo innych domen, możliwych do identyfikacji przy zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych. Wynika stąd ogólniejszy wniosek, że negatywny wynik doświadczenia nad pokrewieństwem immunologicznym białek jest znacznie pewniejszy, jeżeli uzyskany został przy użyciu przeciwciał poliklonalnych. W tym kontekście należy także rozpatrywać wspomnianą pracę Thaler i Jaya [56], którzy sondując białka tylakoidów szeregu gatunków monoklonalnym przeciwciałem anty LHCPII grochu, nie stwierdzili żadnej reakcji z LHCPI, pomimo intensywnej reakcji z LHCPII u wszystkich badanych gatunków.

W ostatnich 4 latach opublikowano jednak kilka prac wskazujących na wewnątrzgatunkowe podobieństwo immunologiczne polipeptydów LHCI i LHCII. W omówionej już wcześniej pracy Darr i wsp. [14] stwierdzili, że niektóre spośród kilkunastu monoklonalnych przeciwciał rozpoznających różne zestawy LHCPII grochu reagują także z LHCPI.

Opisano m.in. grupę 4 przeciwciał, które rozpoznają wszystkie LHCPII i jednocześnie wszystkie LHCPI. Kilka grup badawczych [8, 24, 31] przyjęło tezę, że opisany przez Darr i wsp. [14] przypadek immunopowinowactwa LHCPII i LHCPI jest wynikiem zanieczyszczenia LHCPII użytego do immunizacji polipeptydami CP29, które jako efektywne antygeny indukują przeciwciała anty apo-CP29. Wobec tego reakcja przeciwciał LHCPII z LHCPI jest w rzeczywistości reakcją przeciwciał anty CP29 z LHCPI. Białkiem CP29 zanieczyszczającym preparat LHCPII miałby być polipeptyd 28 kDa, podczas gdy LHCPII grochu miałby (zdaniem tych grup badawczych) obejmować tylko frakcje 26, 25 i 24,5 kDa. Hoyer-Hansen i wsp. [31] na poparcie tej tezy przytaczają argument, iż w ich pracowni stwierdzono intensywną reakcję przeciwciał anty apo-CP29 z PSI jęczmienia. Naszym zdaniem praca Darr i wsp. [14] przekonywująco wskazuje na pokrewieństwo immunologiczne LHCPII i LHCPI. Opisano w niej bowiem, poza już wymienionymi, przeciwciałem monoklonalne MLH10, które rozpoznaje wszystkie LHCPII z wyjątkiem 28 kDa i jednocześnie wszystkie trzy LHCPI (24, 23 i 21,5 kDa). Tego wyniku nie można już wytłumaczyć zanieczyszczeniem LHCPII stosowanego do immunizacji przez białko CP29. Poza tym sugerowany przez Darr i wsp. [14] wysoki stopień podobieństwa immunologicznego LHCPII i LHCPI znajduje potwierdzenie w czterech innych pracach. Evans i Anderson [21] stwierdziły, że poliklonalne przeciwciała monospecyficzne wobec poszczególnych LHCPI szpinaku rozpoznają w różnicowanym stopniu także LHCPII. Reakcja przeciwciał była intensywniejsza w przypadku antygeny immunizacyjnego niż polipeptydów reagujących krzyżowo. Autorki sugerują, że rozpoznawane przez anty LHCPI domeny sekwencyjne LHCPII różnią się nieco od odpowiednich domen LHCPI. Jest też możliwe, że przyczyną zróżnicowanej reakcji domen LHCPII i LHCPI z przeciwciałami są różnice sekwencji aminokwasowych sąsiadujących z tymi domenami.

Barbato i wsp. [4] potwierdzili reakcję przeciwciał anty LHCPI i LHCPII u szpinaku. Z kolei White i Green [59] donieśli o krzyżowej reakcji przeciwciał anty LHCPI z LHCPII u jęczmienia, co daje możliwość bezpośredniego odniesienia tych danych do przeczystawnych wyników Hoyer-Hansen i wsp. [31]. Doniesienie White'a i Green [59] wydaje się bardziej przekonujące wobec przeprowadzenia wiarygodnych doświadczeń kontrolnych potwierdzających, że:

- obserwowana reakcja nie wynika z zanieczyszczeń antygeny przez LHCPII,
- reakcja nie polega na podobieństwie immunologicznym CPI do LHCPII.

Wykluczenie ostatniej ewentualności było istotne, bowiem antygenem stosowanym do immunizacji był PSI = CPIa.

W doświadczeniach Hoyer-Hansen i wsp. [31] brak tego typu kontroli, a obecność dodatkowych prązków i smug na "immunoblokach" stawia pod znakiem zapytania specyficzność stosowanych przeciwciał. Tak więc podobieństwo domen sekwencyjnych LHCPI i LHCPII u jęczmienia można uważać za udowodnione przez White'a i Green [59]. Potwierdzają to wyniki badań Terao i wsp. [55], którzy stwierdzili intensywną reakcję krzyżową poliklonalnych przeciwciał anty LHCPII z LHCPI ryżu. Ponadto LHCPII i LHCPI tego gatunku miały wzory trawienia proteazą V8 u *Staphylococcus aureus* wskazujące na co najmniej jedną wspólną domenę sekwencyjną.

Badania własności immunologicznych białka CP29 wskazują dość jednoznacznie na podobieństwo sekwencyjne do LHCPI u jęczmienia [31,59] i szpinaku [4]. Natomiast, z wyjątkiem dyskusowanej wcześniej pracy Camm i Green [8], brak bezpośrednich dowodów na podobieństwo immunologiczne białek CP29 i LHCPII.

Z nielicznych badań dotyczących immunologicznych właściwości białka kompleksu CP26 wynika, że w przypadku szpinaku przeciwciała anty PSI reagują z polipeptydami CP26 [4]. W związku ze słabymi własnościami antygenowymi białek centrum reakcji PSI [59] można uznać, że powyższa reakcja zachodzi pomiędzy anty LHCPI i CP26. W innej pracowni [19] wykazano, również dla szpinaku, że polipeptydy CP26 reagowały krzyżowo z przeciwciałami anty CP29 i anty LHCPII.

Pomimo różnic poglądów co do stopnia pokrewieństwa immunologicznego białek LHCII, CP29, CP26 i LHCI słuszny wydaje się pogląd White'a i Green [59], że białka te mają pewne wspólne determinanty antygenowe. Sugeruje to, że geny kodujące białka kompleksów antenowych należą do wspólnej wielogenowej "superrodziny" (*extended family*).

LITERATURA

- [1] ANANDAN S, VAINSTEIN A, THORNBUR JP. Correlation of some published amino acid sequences for photosystem I polypeptides to a 17 kDa LHCI pigment-protein and to subunits III and IV of the core complex. *FEBS Lett* 1989; **256**: 150–154.
- [2] ANDERSON JM, GOODCHILD DJ. Transbilayer organization of the main chlorophyll a/b – protein of photosystem II of thylakoid membranes. *FEBS Lett* 1987; **213**: 29–33.
- [3] ARGYROUDI-AKOYOUNOGLOU J. The 77K fluorescence spectrum of the photosystem I pigment-protein complex CP Ia. *FEBS Lett* 1984; **171**: 47–53.
- [4] BARBATO R, RIGONI F, GIARDI MT, GIACOMETTI MT. The minor antenna complexes of an oxygen evolving photosystem II preparation: purification and stoichiometry. *FEBS Lett* 1987; **231**: 147–154.
- [5] BASSIR, HOYER-HANSEN G, BARBATO R, GIACOMETTI GM, SIMPSON DJ. Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 13333–13342.
- [6] BASSIR R, SIMPSON DJ. Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. *Eur J Biochem* 1987; **163**: 221–230.
- [7] BASSIR R, RIGONI F, BARBATO R, GICOMETTI G. Light-harvesting chlorophyll a/b proteins (LHC II) populations in phosphorylated membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **936**: 29–38.
- [8] CAMM EL, GREEN BR. The chlorophyll ab complex, CP 29 is associated with the photosystem II reaction center core. *Biochim Biophys Acta* 1989; **974**: 180–184.
- [9] CHITNIS P, HAREL E, KOHORN BD, TOBIN EM, THORNBUR JP. Assembly of the precursor and processed light-harvesting chlorophyll a/b protein in *Lemna* into the light-harvesting complex II of barley etiochloroplasts. *J Cell Biol* 1986; **102**: 982–988.
- [10] CHITNIS PR, THORNBUR JP. The major light-harvesting complex of photosystem II: aspects of its molecular and cell biology. *Photosynth Res* 1988; **16**: 41–63.
- [11] CLINE K, WERNER-WASHBURNE M, LUBBENTH, KEEGSTRA K. Precursors of two nuclear-coded chloroplast proteins bind to the outer envelope membrane before being imported into chloroplasts. *J Biol Chem* 1985; **260**: 3691–3696.
- [12] CORUZZI G, BROGLIE R, CASHMORE AR, CHUA NH. Nucleotide sequence of two pea cDNA clones encoding the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase and their major chlorophyll a/b - binding thylakoid polypeptide. *J Biol Chem* 1983; **258**: 1399–1402.
- [13] CUNNINGHAM FX, SCHIFF JA. Chlorophyll-proteins complexes from *Euglena gracilis* and mutant deficient in chlorophyll b. II Polypeptide composition. *Plant Physiol* 1986; **80**: 231–238.
- [14] DARR SC, SOMMERVILLE SC, ARNTZEN CJ. Monoclonal antibodies to the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II. *J Cell Biol* 1986; **103**: 733–740.
- [15] DARR SC, ARNTZEN CJ. Reconstitution of the light-harvesting complex into developing chloroplast membrane using a dialysable detergent. *Plant Physiol* 1986; **80**: 931–937.
- [16] DEISENHOFER J, EPP O, MIKI K, HUBER R, MICHEL H. Structure of protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* 1985; **318**: 618–624.

- [17] DEMMIN DS, STOCKINGER EJ, CHANG YC, WALLING LL. Phylogenetic relationships between the chlorophyll a/b binding protein (CAB) multigene family: An intra- and interspecies study. *J Mol Evol* 1989; **29**: 266–279.
- [18] DUNAHAY TG, STAEHELIN AL. 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] DUNSMUIR P. The *Petunia* chlorophyll a/b binding proteingenes: a comparison of Cab genes from different gene families. *Nucl Acid Res* 1985; **13**: 2503–2518.
- [21] EVANS PK, ANDERSON JM. The chlorophyll a/b binding proteins of PSI and PSII are immunologically related. *FEBS Lett* 1986; **199**: 227–233.
- [22] FULSON FR, CLINE K. A soluble factor is required in vitro for membrane insertion of the thylakoid precursor protein pLHCP. *Plant Physiol* 1988; 1146–1153.
- [23] GREEN BR. The chlorophyll-protein complexes of higher plant photosynthetic membranes. *Photosynth Res* 1988; **15**: 3–32.
- [24] HAYDEN DB, BAKER NR, PERCIVAL MP, BECKWITH FB. Modification of the photosystem II light-harvesting chlorophyll a/b protein complex in maize. *Biochim Biophys Acta* 1986; **851**: 86–93.
- [25] HAYDEN DB, COVELLO PS, BAKER NR. Characterization of a 31 kD polypeptide that accumulates in the light-harvesting apparatus of maize leaves during chilling. *Photosynth Res* 1988; **15**: 257–270.
- [26] HENRYSSON T, SCHROEDER WP, SPANGFORT M, ÅKERLUND HE. Isolation and characterization of the chlorophyll a/b protein complex CP29 from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1989; **977**: 301–308.
- [27] HERRIN DL, PLUMLEY FG, IKEUCHI M, MICHELS AS, SCHMIDT GW. Chlorophyll antenna proteins of photosystem I: topology, synthesis and regulation of the 20 kDa subunit of *Chlamydomonas* light-harvesting complex of photosystem I. *Archiv Biochem Biophys* 1987; **254**: 397–408.
- [28] HINZ UG, WELINDER K. The light-harvesting complex of photosystem II in barley. Structure and chlorophyll organization. *Carlsberg Res Commun* 1987; **52**: 39–54.
- [29] HOFFMANN NE, PICHERSKY E, MALIK VS, CASTRESANO C, KO K, DARR SC, CASHMORE AT. The sequence of the cDNA clone encoding a chlorophyll a/b binding protein of photosystem I shows homology to photosystem II Cab sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8847–8849.
- [30] HOULNE G, SCHANTZ R. Molecular analysis of the transcripts encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein in *Euglena gracilis*: unusual size of the mRNA. *Curr Genet* 1987; **12**: 611–616.
- [31] HOYER-HANSEN G, BASSI R, HONBERG LS, SIMPSON DJ. Immunological characteriation of chlorophyll a/b-binding proteins of barley thylakoids. *Planta* 1988; **173**: 12–21.
- [32] ISLAM K. The rate and extent of phosphorylation of the two light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex (LHC II) polypeptides in isolated spinach tylakoids. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 333–341.
- [33] KARLIN-NEUMANN GA, KOHORN BD, THORNER JP, TOBIN EM. A chlorophyll a/b-protein encoded by a gene containing an intron with characteristics of a transposable element. *J Mol Genet* 1985; **3**: 45–61.
- [34] KEEGSTRA K. Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 1989; **56**: 247–253.
- [35] KOHORN B, HAREL E, CHITNIS PR, THORNER JP, TOBIN EM. Functional and mutational analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of thylakoid membranes. *J Cell Biol* 1986; **102**: 972–981.
- [36] LAM E, ORTIZ W, MALKIN R. Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 1984; **166**: 10–14.
- [37] LAM E, ORTIZ W, MAYFIELD S, MALKIN R. Isolation and characterization of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex associated with photosystem I. *Plant Physiol* 1984; **74**: 650–655.
- [38] LAMPPA G, MORELLI G, CHUA NH. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Mol Cell Biol* 1985; **5**: 1370–1378.
- [39] 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* 1987; **894**: 59–68.
- [40] LEUTWILLER LS, MEYEROWITZ EM, TOBIN EM. Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acid Res* 1986; **14**: 4051–4064.
- [41] MATSUOKA M, KANO-MURAKAMI Y, YAMAMOTO N. Nucleotide sequence of DNA coding the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein from maize. *Nucl Acid Res* 1987; **15**: 6302–6308.
- [42] MATTOO AK, EDELMAN E. Intramembrane translation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32 kDa herbicide binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1497–1501.

- [43] MORRISEY PJ, GLICK RE, MELIS A. Supramolecular assembly and function of subunits associated with the chlorophyll a/b light harvesting complex II (LHC II) in soybean chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 335–344.
- [44] MULLET JE, ARNTZEN CJ. Stimulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment protein complex from chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1980; **598**: 100–117.
- [45] MULLET JE. The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J Biol Chem* 1983; **258**: 9941–9948.
- [46] NECHUSHTAI R, PETERSON C, PETER GF, THORNER JP. Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll a/b-protein of photosystem I in *Lemna gibba*. *Eur J Biochem* 1987; **164**: 345–350.
- [47] PICHESKY E, BERNATSKY R, TANSKLEY SD, BREIDENBACH RB, KAUSCH AP, CASHMORE AR. Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll a/b-binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Gene* 1985; **40**: 247–258.
- [48] PICHESKY E, BROCK TG, NGUYEN D, HOFFMAN NE, PIECHULLA B, TANSKLEY SD, GREEN BR. A new member of the Cab gene family: structure, expression and chromosomal location of Cab-8, the tomato gene encoding the type III chlorophyll a/b-binding polypeptide of photosystem I. *Plant Mol Biol* 1989; **12**: 257–270.
- [49] REMY R, AMBARD-BRETTEVILLE F, DUBERTRET G. Separation of phosphorylated from nonphosphorylated LHCP polypeptides by two dimensional electrophoresis. *FEBS Lett* 1985; **188**: 43–47.
- [50] RIKIN A, SCHWARTZBACH SD. Extremely large and slowly processed precursors to the *Euglena* light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins of photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5117–5121.
- [51] 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.
- [52] STYTON MM, BROSIO P, DUNSMUIR P. Characterization of full-length petunia cDNA encoding a polypeptide of the light-harvesting complex associated with photosystem I. *Plant Mol Biol* 1987; **10**: 127–131.
- [53] STEINBACK KF, BURKE JJ, ARNTZEN CJ. Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation-mediated control of chloroplast structure and function. *Archiv Biochem Biophys* 1979; **195**: 546–557.
- [54] TANAKA A, TANAKA M, TSUJI H. Resolution of chlorophyll a/b protein complexes by polyacrylamide gel electrophoresis: evidence for the heterogeneity of light-harvesting chlorophyll protein complexes. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 1537–1545.
- [55] TERAO T, MATSUOKA M, KATOH S. Immunological quantification of proteins related to the light-harvesting chlorophyll a/b protein complexes of two photosystems in rice mutants totally and partially deficient in chlorophyll b. *Plant Cell Physiol* 1988; **29**: 825–834.
- [56] THALER T, JAY FA. Monoclonal antibodies specific for the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHC). Detection of conserved antigenic determinants in LHC from different species. *FEBS Lett* 1985; **188**: 21–26.
- [57] WECHSLER T, SUTER F, FULLER RC, ZUBER H. The complete amino acid sequence of the bacteriochlorophyll c binding polypeptide from chlorosomes of the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Lett* 1985; **18**: 173–178.
- [58] WEISBEEK P, HAGEMAN J, CREMERS F, KEEGSTRA K, BAUERLE C, SMEEKENS S. Nuclear-encoded chloroplast proteins: genes, transport and localization. *Curr Top Plant Biochem* 1986; **5**: 88–104.
- [59] WHITE MJ, GREEN BR. Antibodies to the photosystem I chlorophyll a + b antenna cross-react with polypeptides of C 29 and LHCII. *Eur J Biochem* 1987; **163**: 545–551.
- [60] WILLIAMS RS, ELLIS RJ. Immunological studies on the light-harvesting polypeptides of photosystem I and II. *FEBS Lett* 1986; **203**: 295–300.

Otrzymano 3 kwietnia 1990 r.

Przyjęto 11 września 1990 r.

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

HYBRYDOCYTOCHEMIA W BADANIACH NAD REGULACJĄ GENU KALCYTONINOWEGO W KOMÓRKACH PARAFOLIKULARNYCH TARCZYCY

HYBRIDOCYTOCHEMISTRY IN STUDIES ON REGULATION OF CALCITONIN GENE IN THYROID PARAFOLLICULAR CELLS

Maciej ZABEL

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, AM Poznań

Streszczenie. Ekspresja genu kalcytoninowego zachodzi w wielu komórkach dokrewnych i nerwowych. Po transkrypcji tego genu powstają dwa różne mRNA odpowiednio dla kalcytoniny i CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), czyli CT-mRNA i CGRP-mRNA. Metodami hybrydocytochemicznymi i immunocytochemicznymi badano wpływ hiperkalcemii (wywołanej witaminą D) w warunkach *in vivo* oraz jonów wapnia i 1,25-dwuhydroksywitminy D₃ w warunkach *in vitro* na ekspresję genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy. Stwierdzono, że jony wapnia i 1,25-dwuhydroksywitamina D₃ zmieniają ilościowo, ale nie jakościowo formowanie obu mRNA.

Summary. Calcitonin gene expression takes place in multiple endocrine and nervous cells. The gene template yields two different mRNAs, for calcitonin and calcitonin gene-related peptide (CGRP) respectively (CT-mRNA and CGRP-mRNA). Using hybridocytochemistry and immunocytochemistry, effects of vitamin D-induced hypercalcemia *in vivo* conditions as well as effects of calcium ions and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ *in vitro* were studied on calcitonin gene expression in thyroid parafollicular cells. Calcium ions and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ altered the amounts of both mRNAs and hormones formed but not their ratio.

WPROWADZENIE

Komórki potrafią regulować ekspresję genów i wiadomo bardzo dużo na temat tych regulacji [6], jednak wiele zagadnień pozostaje dalej niepoznanych. Wiadomo m.in., że komórka może włączać i wyłączać pewne geny na stałe, a inne tylko czasowo. W komórkach

*Praca finansowana częściowo przez Komitet Cytobiologii PAN.

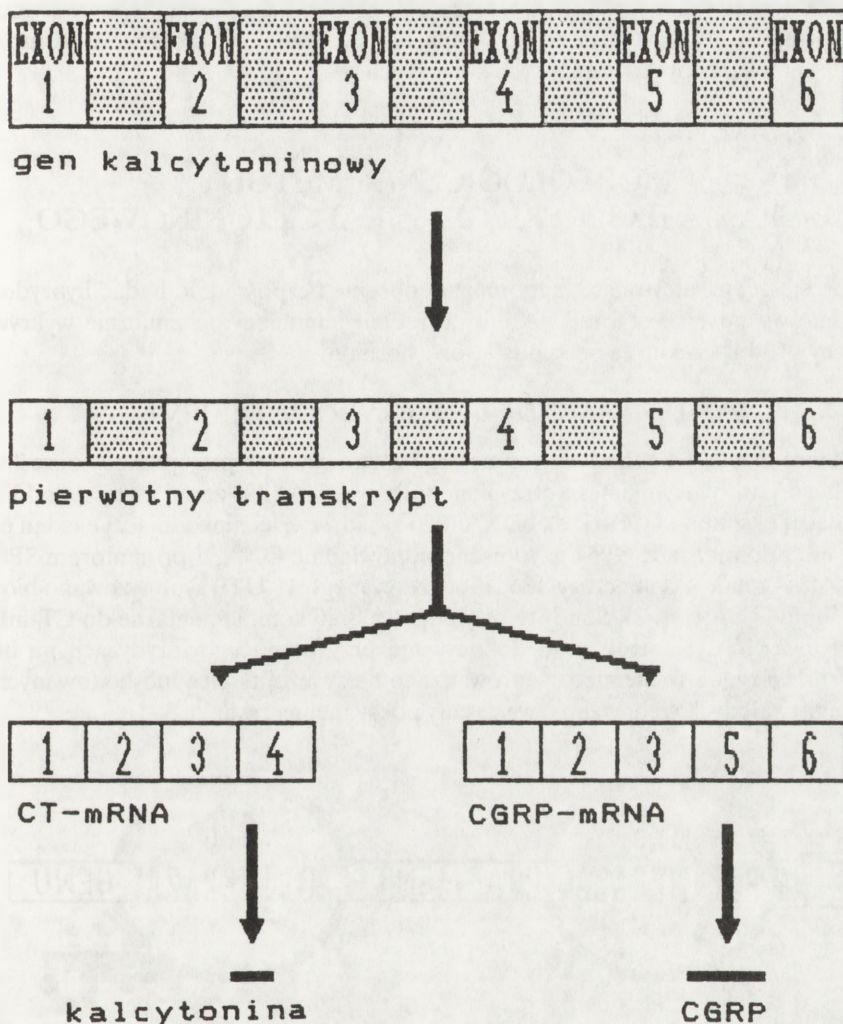
dokrewnych tego samego typu, np. komórkach parafolikularnych tarczycy wyłączenie lub włączenie genów dotyczyć może tylko części komórek całej populacji. U płodów i noworodków szczurzych większość komórek parafolikularnych produkuje somatostatynę, a jedynie w niektórych z nich dochodzi do ekspresji kalcytoniny. Stopniowo jednak sytuacja zmienia się wraz z wiekiem i u zwierząt dorosłych wszystkie komórki produkują kalcytoninę, a niektóre również somatostatynę [1, 11]. Nie dotyczy to różnych, lecz tych samych komórek, o czym łatwo przekonał się wykonując immunocytochemiczne badania z pomocą mikroskopu elektronowego na skrawkach seryjnych i przy użyciu podwójnego znakowania [8].

W ostatnich latach m.in. w komórkach dokrewnych i nerwowych stwierdzono wiele faktów dodatkowo komplikujących problemy regulacji ekspresji genów. Okazało się, że komórki dokrewne mogą produkować wiele hormonów polipeptydowych i to często z tego samego genu. Dalej okazało się, że komórki dokrewne mogą to robić przynajmniej dwoma różnymi sposobami. Pierwszy z nich został dokładnie poznany w komórkach kortykotropowych przysadki [4]. Z jednego genu produkowany jest jeden mRNA, który po translacji daje prohormon zwany proopiomelanokortyną. Z tego prohormonu w siateczce śródplazmatycznej i w aparacie Golgiego peptydazy wycinają wiele fragmentów i niektóre z nich są właściwymi hormonami. Spośród nich najbardziej znane są kortykotropina i lipotropina. Okazało się też, że proopiomelanokortyna produkowana jest również w innych komórkach, w których inne peptydazy wycinają inne fragmenty będące hormonami lub neurotransmiterami. W niektórych komórkach nerwowych dla przykładu powstają endorfiny i enkefaliny.

Drugi mechanizm, który nas szczególnie zainteresował, polega na produkcji kilku różnych mRNA z tego samego genu. Klasycznym już przykładem jest gen kalcytoninowy [7]. W prawidłowych warunkach ekspresja tego genu zachodzi w komórkach parafolikularnych tarczycy, komórkach dokrewnych płuc, żołądka i prostaty oraz w niektórych komórkach nerwowych.

BUDOWA GENU KALCYTONINOWEGO I FORMOWANIE mRNA

Na genie kalcytoninowym dochodzi do syntezy kilku hormonów. Klasycznymi hormonami są kalcytonina i CGRP (*calcitonin gene-related peptide*). Gen kalcytoninowy składa się z 6 eksonów rozdzielonych intronami [2,7] (rys. 1). Część eksonów ma także odcinki niekodujące. Na tym genie DNA-polimeraza II tworzy hnRNA, który ulega dalej skróceniu i poliadenylowaniu. Proces ten prowadzi jednak do powstania dwóch różnych pośrednich form mRNA, z których ostatecznie powstają dwa różne mRNA, mRNA dla kalcytoniny (CT-mRNA) i mRNA dla CGRP (CGRP-mRNA). CT-mRNA pochodzi z eksonów 1, 2, 3 i 4, a CGRP-mRNA z eksonów 1, 2, 3, 5 i 6, czyli dla CT-mRNA specyficzny jest odcinek powstający z eksonu 4, a dla CGRP-mRNA z eksonów 5 i 6. W komórkach parafolikularnych powstają CT-mRNA i CGRP-mRNA, a w komórkach nerwowych tylko CGRP-mRNA. Pojedyncze dotychczasowe obserwacje na temat jakościowego formowania mRNA z genu kalcytoninowego wniosły już nieco informacji. Emerson i wsp. [5] uważają, że gen kalcytoninowy w każdej tkance ma specyficzny element (*cis-active element*) znajdu-



Rys. 1. Schemat budowy genu kalcytoninowego i procesu formowania mRNA: w wyniku transkrypcji powstaje pierwotny transkrypt, z którego formowane są dwa różne mRNA dla kalcytoninu (CT-mRNA) lub CGRP (CGRP-mRNA); końcowe fragmenty mRNA zawierają odpowiedniki różnych eksonów, które są specyficzne dla każdego mRNA, z nich powstają niezależnie kalcytonina lub CGRP

jący się blisko końca eksonu 4, którego budowa decyduje ostatecznie o jakościowym powstaniu CT-mRNA lub CGRP-mRNA. Ponadto uważają oni, że na ten element (*cis-active element*) mogą wpływać i decydować o jakościowym jego formowaniu określone czynniki (tzw. *trans-active factors*). W komórkach parafolikularnych, w których formowane są oba mRNA, proces taki musi zachodzić samoistnie. Innymi słowami w komórkach tych muszą znajdować się endogenne czynniki (*trans-active factors*) regulujące ten proces. Z substancji egzogennych wpływ taki ma deksametazon, który w komórkach TT wzmacnia produkcję mRNA dla kalcytoniny, a obniża dla CGRP [3].

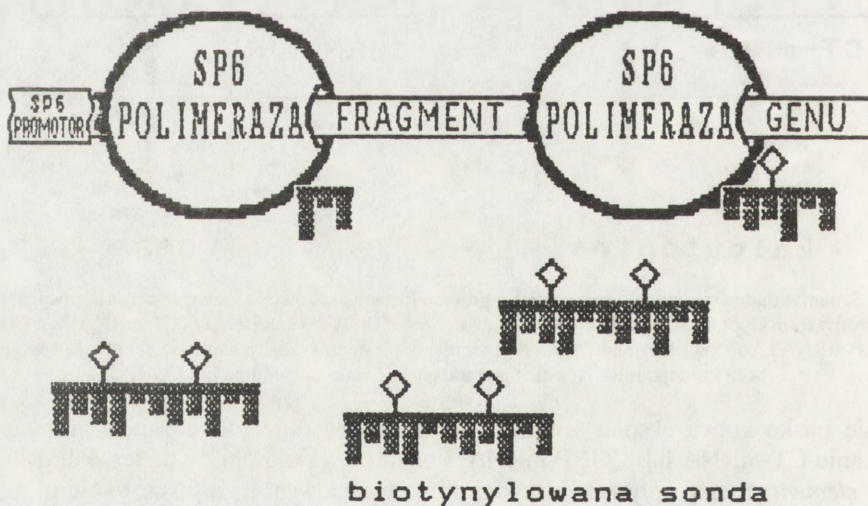
Zagadnieniem najbardziej nas interesującym było wykazanie, czy typowy stymulator komórek parafolikularnych (czyli jony wapnia) może zmieniać jakościowe formowanie mRNA z genu kalcytoninowego w tych komórkach.

MORFOLOGICZNE METODY BADANIA EKSPRESJI GENU KALCYTONINOWEGO

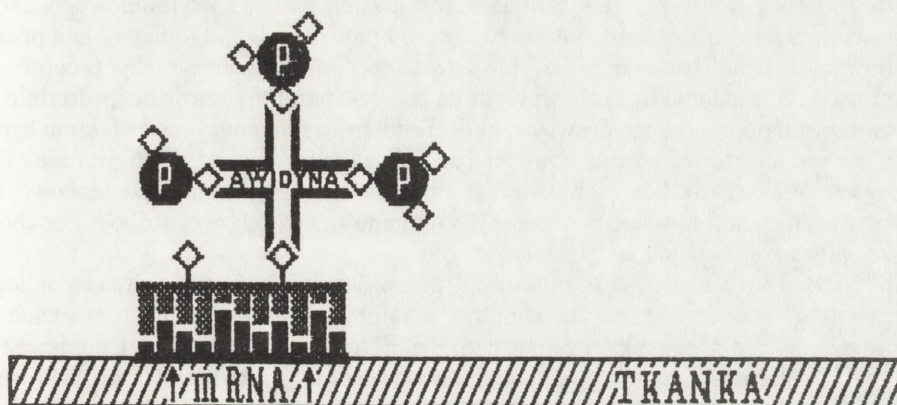
Ekspresję genu kalcytoninowego można obecnie bezpośrednio badać hybrydocytochemicznie wykrywając oba mRNA lub pośrednio immunocytochemicznie wykrywając ostateczny produkt, jakim są oba podstawowe hormony.

SYNTEZA SOND I HYBRYDOCYTOCHEMIA

Fragment ds-cDNA genu kalcytoninowego został rozcięty przy pomocy określonych endonukleaz [10]. W wyniku tego otrzymano CT ds-cDNA (298 zasad z części kodującej i niekodującej eksonu 4) i CGRP ds-cDNA (300 zasad z części niekodującej eksonu 6). Po wbudowaniu do plazmidu SP64 uzyskiwano odpowiednie DNA z promotorem SP6. Na tym DNA za pomocą polimerazy SP6 i biotynylowanego 11-UTP syntetyzowano biotynylowane sondy RNA (rys. 2). Sondy te były odpowiednio komplementarne do CT-mRNA lub CGRP-mRNA. Kontroli sond dokonywano przy pomocy hybrydyzacji na bibule (*dot-blot*). Hybrydocytochemię przeprowadzono na świeżej tkance lub hodowanych komórkach utrwalonych w formalinie wg zasady pokazanej na rysunku 3.



Rys. 2. Schemat syntezy sond do hybrydocytochemii: wykorzystując specyficzny fragment genu z wbudowanym promotorem SP6 syntetyzowano sondy przy pomocy polimerazy SP6; w środowisku znajdowało się biotynylowane UTP i dlatego otrzymywano biotynylowane sondy



Rys. 3. Zasada hybrydocytochemii: biotynylowane sondy hybrydyzowały z odpowiednim mRNA, biotynę w sondach wykrywano za pomocą kompleksu awidyna-biotynylowana peroksydaza

IMMUNOCYTOCHEMIA

Dodatkowo oba hormony wykrywano immunocytochemicznie stosując specyficzne przeciwciała i metodę awidyna-biotynylowana peroksydaza przy posługiwaniu się mikroskopią świetlną lub metody z kompleksami złota koloidalnego w przypadku stosowania mikroskopii elektronowej. Szczegóły tych metod przedstawiono w podręczniku immunocytochemii [12].

WPŁYW HIPERKALCEMII NA EKSPRESJĘ GENU KALCYTONINOWEGO

Początkowo wykonano badania *in vivo* polegające na stymulacji komórek parafolikularnych przy pomocy hiperkalcemii indukowanej aktywnym metabolitem witaminy D₂ (dihydrotachysteryny, czyli A.T.10). Badaniami immunocytochemicznymi stwierdzono w mikroskopie elektronowym, stosując zarówno podwójne znakowanie, jak i skrawki seryjne, że w warunkach kontrolnych wszystkie komórki parafolikularne produkują zarówno kalcytoninę, jak i CGRP. W mikroskopie świetlnym stwierdzono także, że komórki z kalcytoniną jak i z CGRP występują z taką samą częstością. Dokonano tego licząc immunopoztywne komórki zawierające każdy z hormonów. Ekspresję hormonów w tych samych komórkach potwierdzono w badaniach hybrydocytochemicznych wykrywając podobne liczby komórek zawierające odpowiedni mRNA. Po trzech dniach podawania A.T.10 stwierdzono u szczurów wyraźną hiperkalcemię i znacznie podniesiony poziom kalcytoniny we krwi. Mimo wyraźnej stymulacji komórek parafolikularnych nie stwierdzono jednak różnic w stosunku do kontroli, jeżeli chodzi o liczby immuno- i hybrydopoztywnych komórek. Wysłunięto więc wniosek, że hiperkalcemia nie wpływa w komórkach

parafolikularnych decydująco na jakościowe formowanie z genu kalcytoninowego, choć z pewnością wzrasta ilość obu mRNA powstających z tego genu [10]. Dopiero 2 lata później w hodowanych komórkach stwierdziliśmy, że komórki parafolikularne mają receptor dla witaminy D₃ i że witamina D₃ może wpływać na komórki parafolikularne bezpośrednio [9]. Tak więc wynik poprzedniego doświadczenia musiał być nakładającym się efektem hiperkalcemii z jednej strony i bezpośredniego działania aktywnego metabolitu witaminy D₃ z drugiej strony. Wyobrażaliśmy sobie więc, że albo obie substancje działają jednakowo, tzn. nie wpływają na jakościowe formowanie mRNA z genu kalcytoninowego albo też dochodzi do wzajemnego zniesienia ich działania.

Aby rozwiązać to zagadnienie, musieliśmy przeprowadzić badania *in vitro* na najlepiej do tej pory scharakteryzowanej linii komórek parafolikularnych, czyli na komórkach TT pochodzących z ludzkiego raka rdzeniastego. Nie był to także idealny model, ponieważ nie da się całkowicie wyeliminować jonów wapniowych ze środowiska hodowlanego. Stosując jednak adsorbowaną węglem aktywowanym surowicę można było wyeliminować działanie sterydów, w tym witaminy D₃.

Początkowo wykazano, że wszystkie komórki TT produkują zarówno kalcytoninę, jak i CGRP oraz że mają receptor dla aktywnego metabolitu witaminy D, czyli 1,25-dwuhydroksywitaminy D₃. Receptor ten immunocytochemicznie lokalizowaliśmy głównie na terenie jądra komórkowego i w mniejszym stopniu także w cytoplazmie. Dodatkowo obecność tego receptora potwierdzono w mikroskopie elektronowym. Badając wpływ jonów wapnia na sekrecję kalcytoniny stwierdzono, że ilość kalcytoniny i CGRP w środowisku wzrasta wprost proporcjonalnie do stężenia jonów wapnia. Immunocytochemicznie stwierdzono, że niezależnie od poziomu wapnia wszystkie komórki parafolikularne produkują oba mRNA i oba hormony. Zmienia się jednak nieznacznie nasilenie reakcji, co lepiej jest widoczne w przypadku badań immunocytochemicznych. Przy hipokalcemii ilość kalcytoniny i CGRP w komórkach jest większa niż w hiperkalcemii. Czyli z pewnymi zastrzeżeniami można było podtrzymać poprzedni wniosek, że jony wapnia nie wpływają decydująco na jakościowe, lecz jedynie ilościowe formowanie mRNA z genu kalcytoninowego.

W dalszym etapie postanowiono przebadąć wpływ 1,25-dwuhydroksywitaminy D₃. Badania te nie zostały jeszcze ukończone, ale stwierdzono, że 1,25-dwuhydroksywitamina D₃ hamuje wyraźnie wydzielanie zarówno kalcytoniny, jak i CGRP do środowiska hodowlanego. Należy więc przypuszczać, że 1,25-dwuhydroksywitamina D₃ także nie będzie jakościowo wpływała na formowanie mRNA z genu kalcytoninowego. Z literatury wiadomo, że 1,25-dwuhydroksywitamina D₃ hamuje proporcjonalnie formowanie CT-mRNA i CGRP-mRNA [2]. Autorzy ci przeprowadzili eksperymenty badając jednak całkowitą ilość obu mRNA w homogenatach komórek TT. Metoda ta daje bardzo dobre ilościowe wyniki sumaryczne, ale nie pozwala wnioskować o jakościowym wpływie na formowanie mRNA z genu kalcytoninowego w poszczególnych komórkach.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALUMETS J, HAKANSON R, LUNDQUIST G, SUNDLER F, THORELL J. Ontogeny and ultrastructure of somatostatin and calcitonin cells in the thyroid gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1980; **206**: 193-201.

- [2] COTE GJ, ABRUZZESE RV, LIPS CJM, GAGEL RF. Transfection of calcitonin gene regulatory elements into cell culture model of the C cell. *J Bone Mineral Res* 1990; **5**: 165–171.
- [3] COTE JG, GAGEL RF. Dexamethasone differentially affects the level of calcitonin and calcitonin gene-related peptide mRNAs expressed in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Biol Chem* 1986; **261**: 15524–15528.
- [4] DARNELL J, LODISH H, BALTIMORE D. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books Inc. New York 1986.
- [5] EMESON RB, HEDJARN F, YEAKLEY JM, GUISE JW, ROSENFELD M. Alternative production of calcitonin and CGRP mRNA is regulated at the calcitonin-specific splice acceptor. *Nature* 1989; **341**: 76–80.
- [6] HORST A. Regulacja ekspresji genów eukariotów. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 161–196.
- [7] STEENBERGH PH, HOPPENNER JW, ZANDBERG J, VISSER A, LIPS CJM, JANSZ HS. Structure and expression of the human calcitonin/CGRP genes. *FEBS Lett* 1986; **209**: 97–103.
- [8] ZABEL M. Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of the rat. *Histochem J* 1984; **16**: 1265–1272.
- [9] ZABEL M, DIETEL M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ decreases calcitonin secretion from a human medullary carcinoma via specific receptor action. *Acta Endocrin* 1991 (w druku).
- [10] ZABEL M, SCHAFER H. Localization of calcitonin and calcitonin gene-related peptide mRNAs in rat parafollicular cells by hybridocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1988; **36**: 543–546.
- [11] ZABEL M, SURDYK J, BIELA-JACEK I. Immunocytochemical studies on thyroid parafollicular cells in postnatal development of the rat. *Acta Anat* 1987; **130**: 251–256.
- [12] ZABEL M (red.). *Immunocytochemia*. PWN Warszawa 1990.

Otrzymano w styczniu 1991 r.

Przyjęto w lutym 1991 r.

Adres Autora: ul. Święcickiego 6, 699-181 Poznań

PODŁOŻE ZJAWISK AUTOIMMUNOLOGICZNYCH THE BACKGROUND OF AUTOIMMUNITY

Jan K. CZYŻYK

Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna, Warszawa

Streszczenie. Zjawiska autoimmunologiczne często doprowadzają do pojawienia się chorób autoimmunologicznych. W chorobach tych układ immunologiczny jako obce rozpoznaje autoantygeny, którymi mogą być składniki błon komórkowych, cytoplazmy, jądra komórkowego i wiele innych substancji. W omawianej grupie schorzeń zwraca uwagę różnorodność mechanizmów doprowadzających do autoagresji. Może do niej dojść w przebiegu zarówno nieswoistej (nieprawidłowa aktywacja alternatywnej drogi dopełniacza w nocnej napadowej hemoglobinurii), jak i swoistej odpowiedzi immunologicznej.

Summary. The autoimmune reactions often lead to the development of autoimmune disorders. In autoimmune diseases immune system recognizes as foreign autoantigens which can be: fragments of cell membrane, cytoplasm, nucleus and many other substances. In discussed group of diseases it is worth stressing that the large number of mechanisms underlying autoimmunity exists. It may be the result of both nonspecific (unproper activation of alternative way of complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria) and specific immune response.

WSTĘP

Na początku dwudziestego wieku Paul Ehrlich stworzył koncepcję znaną jako *horror autotoxicus*, przyjmując istnienie mechanizmu, który ochrania ustrój przed autoimmunizacją. Wielki autorytet tego uczonego powodował, że przez długi czas negowano możliwość jakiegokolwiek reakcji autoimmunologicznej, chociaż istniały kliniczne sugestie, że może ona powodować schorzenia. Dopiero wprowadzenie w 1945 r. testu Coombsa umożliwiającego wykrywanie autoprzeciwciał opłaszczających krwinki czerwone zapoczątkowało okres wykrywania kolejnych chorób autoimmunologicznych a wraz z nimi stale zwiększającej się liczby autoantygenów. Z tego też powodu coraz bardziej oczywisty staje się fakt, że każda struktura organizmu może być obiektem ataku układu immunologicznego. *Horror autotoxicus* stał się nieaktualną koncepcją w swojej pierwotnej postaci, ponieważ

autoimmunizacja jest zjawiskiem, które może zachodzić, a przy tym często i w każdym organizmie (także zdrowym).

NIEKTÓRE REAKCJE AUTOIMMUNOLOGICZNE BIORĄCE UDZIAŁ W UTRZYMANIU HOMEOSTAZY

Omawiając zagadnienia autoagresji należy podkreślić, że procesy autoimmunologiczne mają nie tylko znaczenie patogenne, ale niektóre z nich są pożądane dla normalnego funkcjonowania organizmu [19,36]. Znany jest fakt pojawienia się przeciwciał skierowanych przeciwko aktynie i miozynie po zawale mięśnia sercowego oraz po operacjach kardiologicznych [13]. Być może zadaniem tych przeciwciał jest opsonizowanie składników martwiczej tkanki i usuwanie ich z uszkodzonego mięśnia sercowego w drodze immunofagocytozy.

Dokładniej poznanym przykładem korzystnego działania autoprzeciwciał jest usuwanie erytrocytów z krwioobiegu. Na starych krwinkach czerwonych, wskutek działania wolnych rodników tlenowych [37], a także w następstwie wiązania składników błony komórkowej przez hemichromy – zdenaturowane cząsteczki hemoglobiny [45] pojawiają się nowe determinanty antygenowe. Tworzą się one w drodze rozpadu, tj. utraty cytoplazmatycznego fragmentu końca N transbłonowej glikoproteiny erytrocytów odpowiedzialnej za transport błonowy anionów i glukozy. Przeciwciała klasy IgG wiążą pozostały, przytwierdzony do błony komórkowej peptyd 62000 stanowiący zewnętrzny fragment końca C powyższej glikoproteiny. Opsonizowane erythrocyty są usuwane w drodze immunofagocytozy. Nie dochodzi zatem do hemolizy, która prowadziłaby do podwyższenia poziomu żelaza w surowicy, co z kolei wzmagałoby wirulencję mikroorganizmów oraz nasilało procesy oksydacji. Autoprzeciwciała biorą więc wtedy udział w utrzymaniu homeostazy [36].

Grupa francuskich badaczy twierdzi, że każdy zdrowy organizm jest nosicielem autoprzeciwciał. W surowicy zdrowych ludzi wykazano obecność immunoglobulin reagujących z tubuliną, aktyną, tyreoglobuliną, mioglobuliną, fetuiną, transferyną, albuminą, cytochromem c i kolagenem [26]. Również u w pełni zdrowych myszy BALB/c wykryto klony limfocytów B produkujących przeciwciała o zakresie swoistości zbliżonym do tego, jaki występuje u zdrowych ludzi [17, 18]. Autoprzeciwciała te stanowią istotną składową krążących przeciwciał naturalnych i cechują się słabym powinowactwem w stosunku do różnych autoantygenów. Przypuszcza się, że "okryte" determinanty autoantygenów przez naturalne autoprzeciwciała stają się niedostępne dla limfocytów T i przeciwciał wysoce swoistych wobec tych determinant. W ten sposób nie dochodzi do uszkodzenia struktur, na których znajdują się autoantygeny [19].

OGÓLNY PODZIAŁ CHORÓB AUTOIMMUNOLOGICZNYCH I WYBRANE PRZYKŁADY AUTOANTYGENÓW

Choroby autoimmunologiczne dzielą się na tzw. narządowo specyficzne i narządowo niespecyficzne. Roitt [63] przedstawia je razem w postaci szerokiego spektrum (rys. 1). Na

CHOROBY NARZĄDOWO SPECYFICZNE

Choroba Hashimoto

Anemia złośliwa – Choroba Gravesa Basedowa

Choroba Addisona – Nużliwość mięśniowa

Zespół Goodpasture'a – Cukrzyca typu 1

Pęcherzyca zwykła – Pemfigoid

– Pierwotna marskość żółciowa

Wrzodzące zapalenie jelita grubego – Zespół Sjögrena

Twardzina – Reumatoidalne zapalenie stawów

Zapalenie skórnomięśniowe

Układowy toczeń rumieniowaty

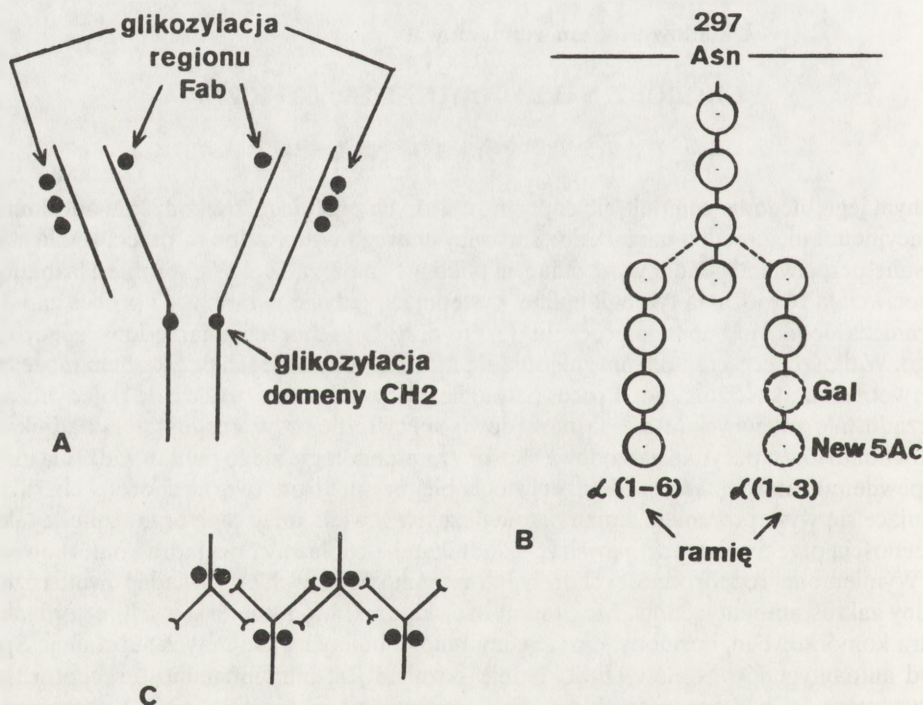
CHOROBY NARZĄDOWO NIESPECYFICZNE

Rys. 1. Spektrum chorób autoimmunologicznych

jednym jego biegunie znajdują się choroby, w których przebiegu uszkodzeniu autoimmunizacyjnemu ulega jeden narząd, a w surowicy chorego wykrywalne są przeciwciała skierowane przeciw antygenom występującym tylko w tym narządzie. W chorobie Hashimoto przeciwciała rozpoznają tyreoglobulinę występującą jedynie w tarczycy i proces zapalny ogranicza się jedynie do tego gruczołu. Jest to przykład schorzenia narządowo specyficznego. W dalszej części spektrum znajdują się inne choroby, których przykładem może być pierwotna marskość żółciowa. Proces patologiczny ogranicza się tu także do pojedynczego narządu, ale przeciwciała nie są narządowo specyficzne, gdyż reagują ze składnikami mitochondriów. Specyfika narządowa choroby z immunologicznego punktu widzenia ulega tu pewnemu zatarciu. Wreszcie przeciwległy biegun spektrum tworzą choroby charakteryzujące się występowaniem zmian patologicznych w wielu miejscach organizmu, a także obecnością przeciwciał reagujących ze składnikami cytoplazmy oraz jądra komórkowego.

Wymienionej różnorodności chorób autoimmunologicznych odpowiada również różnorodny zakres autoantygenów. Mogą nimi być składniki błon komórkowych, cytoplazmy, jądra komórkowego, hormony, enzymy, immunoglobuliny i wiele innych substancji. Spośród autoantygenów błonowych dokładnie poznana jest immunogenność receptora nikotynowego. Choć receptor składa się z pięciu podjednostek $\alpha 2\beta\Gamma\delta$, to epitopy rozpoznawane są głównie na podjednostkach α [30, 77]. Przeciwciała reagują z zewnątrzkomórkową sekwencją od 67 do 76 aminokwasu łańcucha peptydowego podjednostki α [81]. Sekwencja ta należy do głównego obszaru immunogennego MIR (z ang. *main immunogenic region*) rozpoznawanego przez odpowiedź humoralną w nużliwości mięśniowej. Z kolei sekwencje tej podjednostki rozpoznawane przez receptory limfocytów T pomocniczych zostały zlokalizowane pomiędzy pozycją 85 a 142 [52].

Ciekawa hipoteza została przedstawiona na temat immunogenności przeciwciał w takich chorobach, jak: reumatoidalne zapalenie stawów, młodzieńcze zapalenie stawów, gruźlica, choroba Leśniowskiego-Crohna i toczeń układowy z współistniejącym jednocześnie zespołem Sjögrena [60]. Wydaje się, że przeciwciała klasy IgG wykazując nieprawidłowy skład oligosacharydów przytwierdzonych do asparaginy w pozycji 297 łańcucha ciężkiego domeny CH2 fragmentu Fc (rys. 2A) mogłyby mieć cechy autoantygeny. Nieprawidłowość ta polega na braku końcowych reszt kwasu siałowego i galaktozy w 1-6 i 1-3 α glikozydowym ramieniu oligosacharydu (rys. 2B). Spowodowałoby to odsłonięcie epitopów domeny CH2, a w konsekwencji wytworzenie przeciwciał, których miejsca wiążące antygen rozpoznają elementy immunogenne tej domeny. Prowadzi to do uformowania kompleksów immunologicznych złożonych z samych przeciwciał (rys. 2C). Inną możliwością powstania kompleksów tego typu może być oddziaływanie odsłoniętej N-acetyloglukozaminy fragmentu Fc z kwasem siałowym i galaktozą fragmentu Fab. W tym przypadku



Rys. 2. Glikozylacja domeny CH2 przeciwciał klasy IgG: A – rozmieszczenie cukrowców w obrębie fragmentu Fab oraz domeny CH2 immunoglobuliny; B – budowa oligosacharydu przytwierzonego do reszty asparaginy łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (schemat); w niektórych chorobach autoimmunologicznych brakuje terminalnie położonych cząsteczek kwasu siałowego i galaktozy; C – kompleksy immunologiczne złożone z samych przeciwciał klasy IgG (Asn – asparagina, Gal – galaktoza, Neu5Ac – kwas siałowy)

przeciwciała łączyłyby się ze sobą nie jako antygen z przeciwciałem, ale w drodze interakcji samych cukrowców z pominięciem oddziaływania aminokwasów. Proponuje się, że przy-

czyną zmian glikozylacji przeciwciał jest być może zmniejszona aktywność β galaktozylo transferazy [3]. Enzym ten występuje w limfocytach B, gdzie przenosi urydynodifosfogalaktozę na cząsteczki IgG. Interesujący aspekt powyżej przytoczonej hipotezy polega na tym, że sugeruje się możliwość istnienia zaburzenia na poziomie enzymatycznym, podczas gdy odpowiedź autoimmunologiczna stanowiłaby już tylko konsekwencję tej zmiany metabolicznej. Nie byłaby ona spowodowana zaburzoną autotolerancją, ale wynikiem prawidłowo rozwijającej się odpowiedzi immunologicznej wobec nieprawidłowo glikozylowanych immunoglobulin.

Odrębną grupę autoantygenów, występujących w chorobach układowych, stanowią składniki cytoplazmy, jądra komórkowego i jąderka. Wiele z nich pełni ważne funkcje na poziomie syntezy kwasów nukleinowych i białek. Licznie reprezentowanymi są enzymy. Obecny w twardzinie antygen Sc170 jest topoizomerazą I DNA [50, 71], która odpowiada za relaksację nici chromatyny, antygen PCNA zaś (z ang. *proliferating cell nuclear antigen*) rozpoznawany w toczniu układowym stanowi pomocnicze białko dla polimerazy δ [10, 58]. Immunogenne są także cząsteczki oznaczone jako: Sm, SS-A/Ro i SS-B/La [41, 42]. Stanowią one rybonukleoproteiny złożone z małych cząsteczek RNA i białek, które w przypadku Sm biorą udział w usuwaniu intronów z pre-mRNA [47, 70]. Natomiast białka nukleoprotein SS-A/Ro i SS-B/La wpływają na ostateczną postać takich form kwasu rybonukleinowego, jak: tRNA, 5S RNA, a także Y RNA [15, 62].

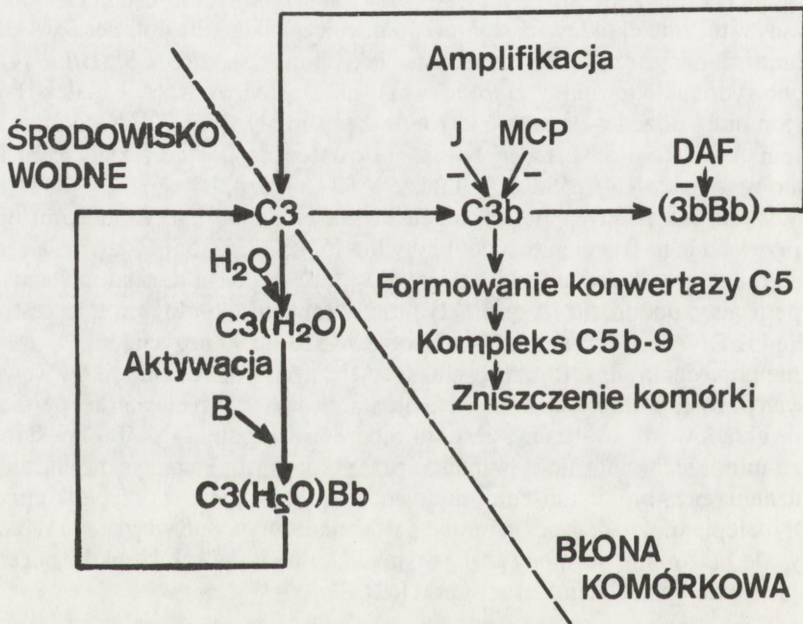
W powyższych, jak i innych połączeniach kwasu nukleinowego z białkami epitopy występują przeważnie na fragmentach polipeptydów [5, 12, 27, 53, 55]. Zdarzają się jednak przeciwciała reagujące z sekwencjami nukleotydów, np.: w poli- i dermatomyositis z 7–9 zasadami pętli antykodonu tRNA Ala [11] oraz w toczniu układowym z przestrzenną konformacją U1 RNA utworzoną przez nukleotydy od 5i do 90 pozycji [16].

Znaczenie pojawienia się autoprzeciwciał specyficznych wobec składników wewnątrzkomórkowych pozostaje nie wyjaśnione. Obecnie stanowią one jedynie markery w diagnostyce tocznia układowego, twardziny, zespołu Sjögrena i zapalenia skórnomięśniowego. Hipoteza, że autoprzeciwciała mogą przenikać przez błony cytoplazmatyczne, nie znajduje szerszego uznania przy braku konkretnych dowodów [78]. Jedynie w przypadku przeciwciał anty-DNA lepiej poznane jest znaczenie patogenne. Mogą one wiązać nie tylko kwas nukleinowy, ale także inne antygeny [20], w tym składniki komórek kłębków nerkowych przyczyniając się do upośledzenia pracy nerki [61].

SPONTANICZNA AKTYWACJA DOPEŁNIACZA I WYNIKAJĄCE Z NIEJ ZAGROŻENIA

Układ dopełniacza ma zdolność ciągłego, spontanicznego aktywowania się, w tym również na komórkach gospodarza [2]. Dotyczy to drogi zarówno klasycznej, jak i alternatywnej. W tym drugim przypadku stała aktywacja składnika C3 wiąże się z występowaniem niestabilnego wiązania tioestrowego w obrębie jego łańcucha α . Hydroliza tioestru prowadzi do zmian konformacyjnych w obrębie C3, które upodabniają C3(H₂O) do C3b [28]. Zhydrolizowana postać reaguje z czynnikiem B, tworząc konwertazę C3. Powoduje ona rozpad C3 na C3a i C3b. Fragment C3b dzięki wiązaniu tioestrowemu może gromadzić się na powierzchniach błonowych, cukrowcach i kompleksach immunologicznych (rys. 3).

Zapoczątkowanie drogi alternatywnej ma charakter nieswoisty. Może dokonać się na strukturach zarówno makro-, jak mikroorganizmu. Jednakże mikroorganizm w przeciwieństwie do mikroorganizmu ma błonowe czynniki regulacyjne zdolne do ograniczenia (wytlumienia) amplifikacji dopełniacza: DAF (z ang. *decay accelerating factor*), MCP (z ang. *membrane cofactor protein*) oraz CR1 [2, 31, 40] (rys. 3). Na ogół odpowiedź immunologiczna traktowana jest jako zdolność wytwarzania swoistych receptorów limfocytów T i przeciwciał wobec antygenów obcych (*non self*) przy jednoczesnym braku tego typu struktur w stosunku do autoantygenów (*self*). Ten uznany od dawna sposób rozpoznawania antygenów oparty jest na zupełnie innej zasadzie funkcjonowania aniżeli ten, który prezentuje powyżej opisane działanie alternatywne aktywowanego dopełniacza. W tym



Rys. 3: Alternatywna droga aktywacji dopełniacza: etap pierwszy przebiega spontanicznie (autoaktywacja) w środowisku wodnym; cząsteczki wody powodują hydrolizę wiązania tioestrowego, które występuje w łańcuchu α składnika C3, zhydrolizowana jego postać: $C3(H_2O)$ może przyłączyć czynnik B; po zadziałaniu czynnika D (niezaznaczona na rysunku proteoliza serynowa) na czynnik B powstaje konwertaza C3, tj. $C3(H_2O)Bb$, enzym ten powoduje rozpad kolejnych cząsteczek C3 na C3a i C3b, fragmenty C3b mają właściwość przytwierdzania się do powierzchni komórki, gdzie przy współdziałaniu czynnika B następuje wytwarzanie kolejnych cząsteczek konwertazy C3, amplikuje to gromadzenie się coraz większych ilości fragmentów C3b; uczestniczą one w tworzeniu konwertazy C5, a tym samym pośrednio przyczyniają się do formowania kompleksów transbłonowych C5b-9; komórki organizmu mają czynniki ograniczające amplifikację; czynnik I oraz MCP będący jego kofaktorem powodują rozpad C3b, DAF doprowadza zaś do rozpadu konwertazy C3; objaśnienia znaków: C3 – trzeci składnik dopełniacza, $C3(H_2O)$ – składnik C3 mający zhydrolizowane wiązanie tioestrowe, $C3(H_2O)Bb$ – konwertaza C3 w fazie wodnej, C3bBb – konwertaza C3 występująca na błonach i ścianach komórkowych, B – czynnik B, Ba – składnik Ba, I – czynnik I, MCP – kofaktor dla czynnika I, DAF – czynnik destabilizujący konwertazę C3

drugim przypadku nie dochodzi w fazie wstępnej do rozróżnienia elementów własnych od obcych. Dopełniacz działa w sposób niewybiórczy, aktywuje się wszędzie. Różnica zaś pomiędzy tym, co obce a tym, co własne opiera się na istnieniu mechanizmów samoograniczających rozpoczęty proces aktywowania, a obecnych na strukturach własnych (*self*). Bakterie (*non self*) nie zdołały wykształcić inhibitorów dopełniacza, co pozwala na jego pełną aktywację i lizę czynnika patogenego.

Zdarzają się jednak choroby, w których aktywność układu dopełniacza jest podwyższona. W nocnej napadowej hemoglobinurii – PNH (z ang. *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*) obserwowany jest niedobór DAF [54], ograniczającego samorzutne powstawanie konwertazy oraz innego białka błonowego HRF (z ang. *homologous restriction factor*), które hamuje formowanie kompleksu C5–9, C5–8 i poliC9 [85]. Doprowadza to do nadmiernej wrażliwości erytrocytów i innych elementów morfotycznych krwi na lityczne działanie dopełniacza [51]. Przyczyną obniżonych ilości DAF jest najprawdopodobniej brak lub ograniczenie potranslacyjnego przyłączania tego białka do glikolipidu, który przytwierdza go do błony komórkowej, nie zaś mutacja genu kodującego DAF i powstawanie nieprawidłowych form mRNA [76].

UDZIAŁ GRASICY W UTRZYMANIU STANU AUTOTOLERANCJI

W procesie dojrzewania tymocytów na terenie grasicy kształtowany jest skład (repertuar) swoistości receptorów limfocytów T. Burnet wysunął teorię delekcji klonów komórkowych, tzn. usuwania tych linii komórkowych, które w życiu płodowym miały sposobność zetknięcia się z antygenami (w tym również z pochodzącymi z organizmu). Ominięcie drogi eliminacji i pojawienie się na obwodzie tzw. klonów zakazanych miało tłumaczyć fakt powstawania chorób autoimmunologicznych. Jednakże w miarę poznawania coraz większej liczby schorzeń tego typu autoagresja przestała być traktowana jako zjawisko wyjątkowe, a teoria Burneta nie może dłużej stanowić generalnego wytłumaczenia stanu autotolerancji i autoagresji.

Jednym z podstawowych problemów jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, jak może dojść do delekcji grasicznych limfocytów T rozpoznających wszystkie możliwe autoantygeny przy braku możliwości przedostania się tych ostatnich do grasicy z powodu istnienia bariery grasiczej. Bariera ta oddziela naczynia włosowate od części korowej grasicy i uniemożliwia przedostawanie się antygenów ze światła łożyska naczyniowego na zewnątrz. Jednym z proponowanych mechanizmów ominięcia tej bariery jest przenikanie cząsteczek różnych substancji z naczyń włosowatych torebki łącznotkankowej grasicy do strefy podtorebkowej tego narządu i dalsze ich rozprzestrzenianie się w całej korze grasicy wraz z płynem śródmiąższowym [82].

Ostatnio pojawiły się prace dostarczające dowodów rzeczywistego istnienia delekcji klonalnej zachodzącej w grasicy wobec niektórych antygenów: I–E, MIs^a, H–Y [34, 35, 38, 46]. Delekcja doprowadza w przypadku dwóch pierwszych z wymienionych antygenów do usunięcia limfocytów T z receptorami $\alpha\beta$, których fragmenty kodowane są odpowiednio przez geny: V β 17 oraz V β 8.1 i V β 6. Brak efektywnego wykorzystania tych genów obniża różnorodność repertuaru receptorów T, co z jednej strony może ułatwiać utrzymanie stanu

tolerancji immunologicznej wobec niektórych autoantygenów, z drugiej zaś mając na uwadze różnorodność patogenetycznych czynników środowiskowych jest zjawiskiem niekorzystnym [49, 59].

Zaburzenie procesu selekcji negatywnej może spowodować autoimmunizację. Do takich zaburzeń dochodzi w wyniku doświadczalnego podania noworodkom mysim leku immunosupresyjnego – cyklosporyny A [24, 33]. Doprowadza to do pojawienia się zespołu chorobowego o podłożu autoimmunologicznym. Rozważane są przynajmniej dwie możliwości autoimmunizacyjnego działania cyklosporyny A. Albo usuwa ona z grasicy w okresie dojrzewania układu immunologicznego prekursorzy limfocytów kontrolujących klony autoreaktywne (osłabienie supresji) [65], albo też hamuje apoptozę tymocytów zdolnych do rozpoznawania autoantygenów. Apoptoza – ACID (z ang. *activation induced cell death*) jest formą śmierci komórki o charakterystycznym obrazie cytologicznym. Zachodzi ona po aktywowaniu receptorów TCR $\alpha\beta$ (z ang. *T cell receptor*) znajdujących się na niedojrzałych tymocytach [75]. Taka sytuacja może pojawić się wówczas, gdy receptory niedojrzałych tymocytów rozpoznają w grasicy odpowiednie autoantygeny. Zahamowanie apoptozy przez cyklosporynę prowadziłoby do przejścia dojrzałych tymocytów autoreaktywnych na obwód i zasiedlenia przez nie narządów obwodowych układu chłonnego [72].

UDZIAŁ ANTYGENÓW ZGODNOŚCI TKANKOWEJ W INDUKCJI CHOROÓB AUTOAGRESYJNYCH

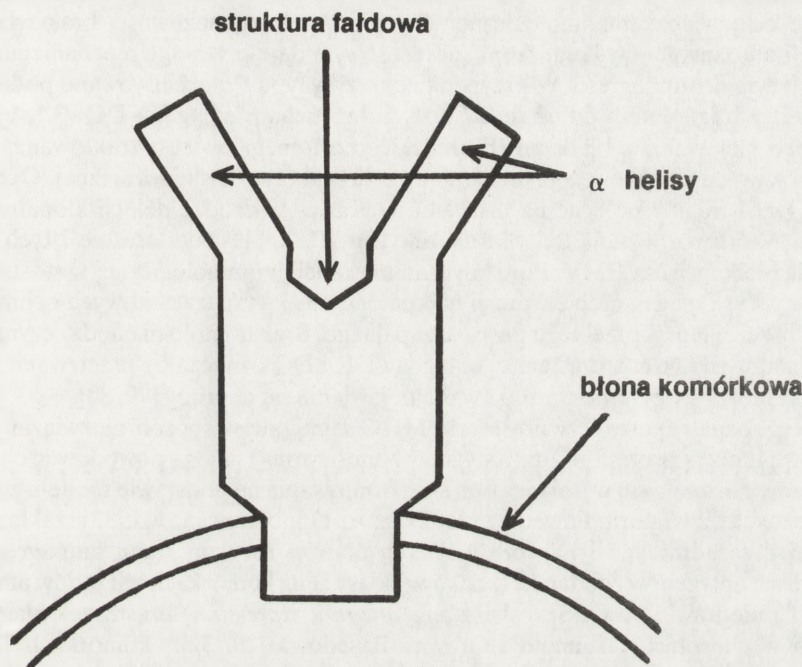
U osób z chorobami autoimmunologicznymi stwierdza się częstsze występowanie niektórych alleli głównego układu zgodności tkankowej MHC (z ang. *major histocompatibility complex*) w porównaniu z populacją ludzi zdrowych. Początkowo kojarzenie się antygenów z chorobami obserwowano w zakresie antygenów MHC klasy I. Jednakże allele tej klasy znane u człowieka jako antygeny HLA-A,B,C występują w sprzężeniu odmiennym od oczekiwanego, znanym też jako tzw. niezrównoważenie sprzężeń (z ang. *linkage disequilibrium*) z antygenami MHC klasy II (DR, DQ i DP). Ponieważ te ostatnie kojarzą się w większym stopniu z chorobami autoimmunologicznymi aniżeli antygeny klasy I uważa się obecnie, że antygeny DR, DP i DQ zwiększają ryzyko choroby, natomiast antygeny HLA-A,B,C nie mają decydującego znaczenia i są jedynie znacznikami czynnika odpowiedzialnego za rozwój choroby.

Badania kryształów antygeny HLA-A2 uzyskanych z kilkusetlitrowych hodowli komórkowych wykazały istnienie specjalnie zbudowanej struktury wiążącej fragmenty prezentowanych antygenów. Składa się ona z trzech elementów: dwu α helis i jednej struktury typu β w postaci pofałdowanej kartki. Całość tworzy zagłębienie – kieszonkę, której długość wynosi 25 Å, szerokość 10 Å i głębokość 11 Å [7] (rys. 4). Jednocześnie większość reszt polimorficznych decydujących o rodzaju allelu zlokalizowana jest w opisanej kieszonce [6]. Determinują one rodzaj wiązanych i prezentowanych epitopów.

Kojarzenie się antygenów klasy II z autoagresją analizowane jest na podstawie ich sekwencji aminokwasowych, a także przestrzennej budowy tych cząsteczek.

Przy założeniu podobieństwa budowy antygenów MHC klasy I i II, trzeci obszar wybitnie zmienny łańcucha β antygenów klasy II przypada na pozycje pomiędzy 57 a 85 aminokwasem α helisy [84]. Antygeny DQ i DR predysponujące do zapadalności na

choroby autoimmunologiczne mają poszczególne aminokwasy, jak i całe sekwencje polimorficzne wspólne w obrębie kieszonki, różniące się jednak od tych, które występują na antygenach MHC – wykładnikach zmniejszonej zapadalności na te choroby.



Rys. 4. Budowa cząsteczki MHC (schemat) – miejsce prezentujące peptyd receptorom limfocytów T utworzone jest przez dwie struktury helikalne i jedną strukturę faldową

Kojarzące się z reumatoidalnym zapaleniem stawów (r. z. s.) antygeny DR4–Dw4, DR4–Dw14 i DR1, jak również DRw10 i DRw53 mają te same reszty aminokwasowe od pozycji 67 do 74. Zastąpienie w antygenie DR4–Dw10 w pozycjach: 67 – leucyny izoleucyną, 70 – glutaminy kwasem asparaginowym i 71 – lizyny/argininy kwasem glutaminowym powoduje, że antygen ten nie zwiększa ryzyka zachorowania na r. z. s. [79, 84]. Ponadto, w przypadku r. z. s. osoby o fenotypie z allelem DR4 są także nosicielami innego antygeny – DQw3.1 (DQw7) [73]. Z kolei ten sam antygen, tj. DQw3.1 z kwasem asparaginowym w 57 pozycji łańcucha β, który zwiększa ryzyko zachorowania na r. z. s., obniża ryzyko zachorowania na inną chorobę autoimmunologiczną – cukrzycę typu pierwszego. W przeciwieństwie do DQw3.1 antygeny: DQw3.2 (DQw8), DQwAZH i DQw1.9 w tej samej, 57 pozycji mają nie kwas asparaginowy, lecz aminokwasy obojętne: alaninę, walinę bądź serynę i wszystkie zwiększają ryzyko zachorowania na cukrzycę [79, 80]. Obecnie wydaje się, że w cukrzycy insulinozależnej antygeny DQ mają związek przyczynowy z chorobą, natomiast antygeny DR pozostają tylko markerami zwiększonego ryzyka zachorowania. Nie można jednak wykluczyć współdziałania kilku antygenów MHC klasy II. W populacji Amerykanów chorych na cukrzycę, DQw3.2 wydaje się występować jedynie w kontekście DR4–Dw4. Natomiast DR4–Dw14 w nieznanym sposobie znosi diabetogenny wpływ DQ [69].

Nadal jednak pozostaje niewyjaśnione, na czym polega udział antygenów DQ i DR w indukowaniu autoimmunizacji. Być może niektóre antygeny HLA dzięki określonym aminokwasom w kieszonce mają szczególną zdolność prezentowania określonych determinant autoantygenów, co umożliwi rozpoznanie ich przez limfocyty pomocnicze i zainicjowanie odpowiedzi immunologicznej [79, 80, 84]. Inna możliwość, brak właściwej prezentacji autoantygenów komórkom supresorowym daje przewagę mechanizmom doprowadzającym do autoagresji. W przypadku cukrzycy typu I zaobserwowano podobieństwo pomiędzy fragmentem od 52 do 57 pozycji łańcucha β antygeny DQw3.1, ujemnie sprzężonego z chorobą, a białkiem IE2 ludzkiego cytomegalowirusa traktowanego jako jeden z możliwych czynników doprowadzających do cukrzycy insulinozależnej. Ochronny wpływ DQw3.1 miałyby polegać na usuwaniu w grasicy w drodze delekcji klonalnej tych tymocytów, które rozpoznają ten właśnie antygen HLA, ale jednocześnie i tych, które rozpoznają białka wirusa CMV. Powstały stan tolerancji immunologicznej w stosunku do antygenów wirusa ulegających ekspresji na komórkach B wysp trzustkowych ochraniałyby je przed zniszczeniem w przebiegu procesu zapalnego. Brak homologii między czynnikiem zewnątrzśrodowiskowym a cząsteczką antygeny DR i DQ oznaczałyby przetrwanie odpowiednich klonów i stworzenie warunków dla pojawienia się choroby [79, 80].

Wreszcie rozpatruje się, czy cząsteczki MHC same, ale w sposób niezwiązany z ich podstawową funkcją prezentowania antygenów limfocytom T, mogą powodować chorobę. Takie pytanie nasunęło się w trakcie prób skonfrontowania na podstawie modelu zwierząt transgenicznych teorii sformułowanej przez Botazzo. Opublikowana w 1983 r. zakłada ona, że jednym z zasadniczych i najwcześniejszych etapów rozwoju stanu autoagresji jest pojawienie się antygenów zgodności tkankowej klasy II na komórkach narządów atakowanych [9]. Ta nieprawidłowa ekspresja (z ang. *aberrant expression*) cząsteczek klasy II na tyrocytach w chorobie Hashimoto i Gravesa-Basedowa [29, 32], komórkach B wysp trzustkowych w cukrzycy [8,23] i nabłonku przewodów żółciowych w pierwotnej marskości żółciowej [4] powoduje, że komórki nabłonkowe same mogą prezentować antygeny [44]. Patologiczna prezentacja dużych ilości autoantygeny może zaburzyć istniejącą tolerancję.

Myszy transgeniczne, które wykazywały w trzustce nadmierne ilości antygenów transplantacyjnych, chorowały na cukrzycę z niedoboru insuliny. Jednocześnie brak było u nich jakichkolwiek oznak autoagresji i typowego obrazu histopatologicznego w postaci *insulitis*, spotykanego u ludzi chorych na cukrzycę typu 1 oraz w wielu modelach doświadczalnych tego typu cukrzycy [1, 43, 66]. Być może cząsteczki MHC reagują już wewnątrz komórki z cząsteczkami insuliny, hamują jej potranslacyjną obróbkę, a w konsekwencji sekrecję hormonu do przestrzeni międzykomórkowej [56]. Jeżeli zatem przyjąć koncepcję, że ekspresja antygenów MHC jest wydarzeniem inicjującym zmiany patogenetyczne, to niekoniecznie musi to polegać na stymulowaniu odpowiedzi immunologicznej.

Antygeny zgodności tkankowej są glikoproteinami, które mogą wiązać składniki cytoszkieletu, białka wydzielane, a także receptory. Tak więc zmiana ilości wytwarzanych antygenów MHC może zmienić stan funkcjonalny całej komórki. Antygeny MHC to struktury, których działanie nie ogranicza się wyłącznie do pracy układu immunologicznego, ale ma ogólniejszy charakter biologiczny [22].

NIEKTÓRE MECHANIZMY ODPOWIEDZI AUTOIMMUNOLOGICZNEJ

Poza genetycznym uwarunkowaniem wystąpienia choroby autoimmunologicznej istnieje szereg mechanizmów, które doprowadzają do odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko autoantycynom. Jedną z możliwości jest odpowiedź pomocniczych limfocytów T rozpoznających determinanty antygenów własnych. Przełamanie istniejącej tolerancji może zajść w drodze zaburzenia sekwestracji antygenów i stworzeniu możliwości rozpoznania ich przez receptory limfocytów T (prezentowanie dostatecznie dużych ilości antygenów dzięki wzmożonej ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy I i II na komórkach nie należących do układu immunologicznego) [29]. Także osłabienie supresji może współodpowiadać za rozwój autoimmunizacji. Jedną z form supresji jest hamowanie odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem końcowych jej produktów, tj. przeciwciał.

Kompleksy immunologiczne: antygen – przeciwciało mogą wiązać jednocześnie na powierzchni pojedynczej komórki B receptory dla fragmentu Fc oraz receptory dla antygeny (czyli tzw. immunoglobuliny powierzchniowe – IgR). Związanie krzyżowe FcR i IgR doprowadza do wytłumienia odpowiedzi immunologicznej przez inaktywację limfocytów B. Supresja ta działa na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego, a przyczyny jej zaburzenia mogą być różne:

(1) Nieprawidłowa glikozylacja domeny CH₂ przeciwciał klasy IgG występująca w niektórych chorobach autoimmunologicznych osłabia powinowactwo tych przeciwciał do receptora Fc.

(2) Czynniki reumatoidalne klasy IgM wiążące fragmenty Fc innych przeciwciał hamują oddziaływanie Fc z odpowiednimi receptorami (FcR).

(3) Liczne kompleksy immunologiczne IgM–IgG wiążą się tylko z receptorami FcR z pominięciem wiązania IgR.

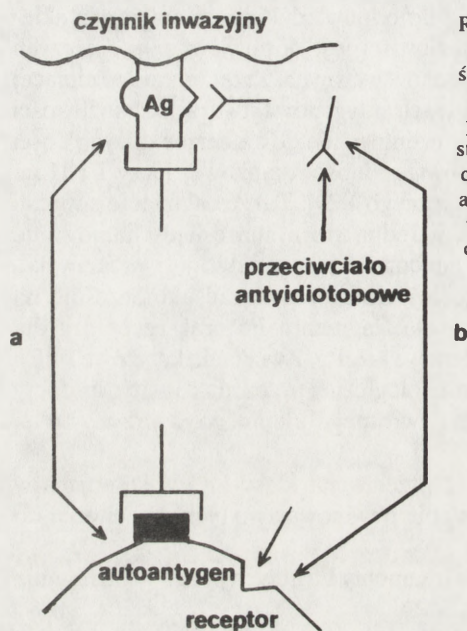
Powyższe trzy możliwości mogą przyczyniać się do upośledzonego hamowania limfocytów B [74].

Drugi wariant to rozwój autoagresji z pominięciem autoreaktywnych limfocytów T (*T cell bypass*) [64]. Choroba pojawia się, mimo że komórki T nadal pozostają w stanie tolerancji. Jednym z postulowanych tu mechanizmów jest szeroko rozumiana reakcja krzyżowa. Odpowiedź immunologiczna jest początkowo skierowana przeciwko antygenowi zewnętrznemu. Jednak na skutek podobieństwa w budowie tego antygeny z autoantycygenem wytworzone uprzednio przeciwciała i komórki efektorowe są w stanie wiązać również autoantycygen. W ten sposób odpowiedź immunologiczna zostaje "przeniesiona" z antygenów obcych (*non self*) na antygeny własne (*self*) (rys. 5a). Homologia obu struktur może dotyczyć zaledwie kilku aminokwasów i ma znaczenie wówczas, gdy jest rozpoznana przez układ immunologiczny [39, 68].

W zeszytniającym zapaleniu kręgosłupa, jak również w chorobie Reitera odpowiednio ponad 90 i 80% chorych jest nosicielami antygeny HLA–B27. Jednocześnie często są oni zarażeni bakteriami gramujemnymi, w tym pałeczkami *Klebsiella pneumoniae*. Analiza sekwencji białek wykazała podobieństwo pomiędzy 6 aminokwasami hiperzmiennego fragmentu antygeny B27 a nitrogenazą bakteryjną. Jest to przykład współistnienia dwóch czynników, z których żaden z osobna nie jest w stanie wywołać choroby. Musi wpraw-

zaistnieć odpowiednia infekcja, aby potem mogło zajść przeniesienie odpowiedzi immunologicznej na właściwy autoantygen [68].

Autoimmunizacyjny komponent w patogenezie zespołu nabytego upośledzenia odporności – AIDS (z ang. *acquired immunodeficiency syndrome*) wydaje się znajdować po-



Rys. 5: Reakcja krzyżowa: a – reakcja krzyżowa zachodząca pomiędzy autoantygenem a antygenem pochodzącym ze środowiska zewnętrznego; przeciwciało —□ bezpośrednio jest odpowiedzialne za odpowiedź autoimmunologiczną, ponieważ rozpoznaje ono te same struktury lub podobne struktury na antygenie Ag oraz na autoantygenie; b – reakcja krzyżowa zachodząca pomiędzy receptorem błonowym a przeciwciałem idiotopowym —◁, przeciwciało antyidiotopowe → rozpoznaje receptor (forma autoantygeny) oraz przeciwciało idiotopowe, które rozpoznaje fragment antygeny Ag

twierdzenie w odkryciu sekwencji: Gly-Thr-Glu/Asp-Arg-Val. Znajduje się ona w C-końcowej części glikoproteidu gp41 wirusa HIV 1, jak również w niepolimorficznym fragmencie pierwszej domeny łańcucha β antygenów HLA-DR i DQ. Oznacza to, że pewne przeciwciała antywirusowe mogą w tym przypadku reagować także z antygenami zgodności tkankowej. Obecność u ponad 1/3 chorych na AIDS przeciwciał anty HLA klasy II wskazuje na prawdopodobny ich udział w usuwaniu komórek prezentujących antygen (a więc tych rodzajów komórek, które są nosicielami antygenów MHC klasy II) na skutek cytotoksyczności zależnej od przeciwciał (ADCC) czy też lizy z udziałem dopełniacza [25].

Fakt zakażenia nieproporcjonalnie małej liczby limfocytów T pomocniczych wirusem AIDS przy jednoczesnym zniszczeniu bardzo wielu komórek tego typu próbuje się tłumaczyć także w inny sposób [14]. Białko wirusowe gp120 przyłącza się do markera limfocytów pomocniczych – CD4. Przeciwciała antyidiotopowe reagujące z przeciwciałami antywirusowymi o swoistości anty gp120, rozpoznają CD4 i w ten sposób stają się bezpośrednią przyczyną porażenia układu odpornościowego.

Powyższa hipoteza opiera się na istnieniu tzw. przeciwciał antyidiotopowych, które reagują z receptorami błon komórkowych [57]. Zgodnie z teorią immunogenności idiotypów przeciwciało (Ab2), które rozpoznaje miejsce wiążące przeciwciała antyhormonalnego (Ab1) może imitować swoją budową ten fragment cząsteczki hormonu bądź wirusa, który spowodował wytworzenie Ab1.

Immunizacja insulinią wykonana eksperymentalnie lub w czasie leczenia cukrzycy powoduje wytworzenie immunoglobulin o charakterze umiarkowanych agonistów w stosunku do receptorów insulinowych [48, 67]. Autoantydypowa etiologia brana jest pod uwagę przynajmniej w dwu znanych schorzeniach autoagresyjnych: nużliwości mięśniowej oraz nadczynności gruczołu tarczowego. O ile w tej pierwszej antygen rozpoczynający kaskadę reakcji jest nieznan, o tyle w chorobie Gravesa-Basedowa sądzi się, że taką rolę spełnia hormon tyreotropowy, natomiast przeciwciała anty-antyTSH imitujące sam TSH wiążą się z receptorem dla tego hormonu i stymulują pęcherzyki tarczycy do wydzielania trijodotyroniny i tyroksyny [21]. Powyżej opisane zostały dwa rodzaje homologii: jedna pomiędzy antygenem a autoantygenem, druga pomiędzy antygenem a przeciwciałem antydypowym (rys. 5a i 5b).

PODSUMOWANIE

Choroby autoimmunologiczne mogą być wywołane na skutek zaburzenia odpowiedzi immunologicznej na różnych etapach jej przebiegu. Zarówno składowa nieswoista (nadmierna aktywacja dopełniacza), jak i swoista (nieprawidłowe dojrzewanie komórek immunologicznych w grasicy oraz na obwodzie, niewłaściwa ekspresja antygenów MHC, zaburzenie supresji i regulacji idiotypowej, wreszcie udział czynników środowiska zewnętrznego: wirusów, bakterii, leków i innych substancji chemicznych) mogą stać się przyczyną choroby. Autoagresyjne uszkodzenie narządu jest procesem wieloetapowym i stanowi wypadkową kilku mechanizmów patologicznych [83]. Wydaje się, że nie ma jednej teorii, która tłumaczyłaby genezę wszystkich chorób określanych jako autoimmunologiczne. Ich różnorodny obraz patogenetyczny jest odzwierciedleniem zróżnicowanej etiologii omówionej grupy schorzeń.

LITERATURA

- [1] ALLISON J, CAMPBELL IL, MORAHAN G, MANDEL TE, HARRISON LC, MILLER JFA. Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of class I histocompatibility molecules in pancreatic β cells. *Nature* 1988; 333: 529–533.
- [2] ATKINSON JP, FARRIES T. Separation of self from non-self in the complement system. *Immunol Today* 1987; 8: 212–215.
- [3] AXFORD JS, MACKENZIE L, LYYARD PM, HAY FC, ISENBERG DA, ROITT IM. Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1987; 2: 1486–1487.
- [4] BALLARDINI G, MIRAKIAN R, BIANCHI FB, PISI E, DONIACH D, BOTAZZO GF. Aberrant expression of HLA-DR antigens on bile duct epithelium in primary biliary cirrhosis: relevance to pathogenesis. *Lancet* 1984; 2: 1009–1013.
- [5] BEN-CHETRIT E, CHAN EKL, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52 kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1560–1571.
- [6] BJORKMAN PJ, SAPER MA, SAMARAOUI B, BENNETT WS, STROMINGER JL, WILEY DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329: 512–518.
- [7] BJORKMAN PJ, SAPER MA, SAMARAOUI B, BENNETT WS, STROMINGER JL, WILEY DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506–511.

- [8] BOTAZZO GF, DEAN BM, MCNALLY JM, MACKAY EH, SWIFT PGF, GAMBLE DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Eng J Med* 1985; **313**: 353–359.
- [9] BOTAZZO GF, PUJOL-BORRELL R, HANAFUSA T, FELDMANN M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983; **2**: 1115–1118.
- [10] BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, MACDONALD-BRAVO H. Cyclin-PCNA is the auxillary protein of DNA polymerase α . *Nature* 1987; **326**: 515–517.
- [11] BUN CC, MATHEWS MB. Autoreactive epitope defined as anticodon region of alanine transfer RNA. *Science* 1987; **238**: 1116–1119.
- [12] CHAN EK, FRANCOEUR AM, TAN EM. Epitopes, structural domains and asymmetry of amino acid residues in SS-B/La nuclear protein. *J Immunol* 1986; **136**: 3744–3749.
- [13] DE SCHEERDER J, VANDERKERCKHOVE J, ROBRECHT J, ALGOED L, DE BUYZERE M, DE LONGHE J, DE SCHRUIJER G, CLEMENT D. Post-cardiac injury and an increased humoral immune response against the major contractile proteins (actin and myosin). *Amer J Cardiol* 1985; **56**: 631–633.
- [14] DELGUERICO P, ZANETTI M. The CD4 molecule, the human immunodeficiency virus and antiidiotypic antibodies. *Immunol Today* 1987; **8**: 204–205.
- [15] DEUTSCHER SL, HARLEY JB, KEENE JD. Molecular analysis of the 60 kDa human Ro ribonukleo-protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9479–9483.
- [16] DEUTSCHER SL, KEENE JD. A sequence specific conformational epitope on U1 RNA is recognized by a unique autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3299–3303.
- [17] DIGHIERO G, LYMBERI P, HOLMERG D, LUNDQUIST I, COUTINHO A, AVRAMEAS S. High frequency of natural autoantibodies in normal newborn mice. *J Immunol* 1985; **134**: 765–771.
- [18] DIGHIERO G, LYMBERI P, MAZIE JC, ROUYRE S, BUTLER-BROWNE GS, WHALEN RG, AVRAMEAS S. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J Immunol* 1983; **131**: 2267–2272.
- [19] DIGHIERO G, LYMBERI P, GUILBERT B, TERNYNCK T, AVREMAS S. Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* 1986; **475**: 135–145.
- [20] EILAT D. Cross-reactions of anti-DNA antibodies and the central dogma of lupus nephritis. *Immunol Today* 1985; **6**: 123–128.
- [21] ERLANGER BF, CLEVELAND WL, WASSERMAN NH, KU HH, HILL BL, SARANGARAJAN R, RAJAGOPALAN R, CAYANIS E, EDELMAN JS, PENN AS. Auto-anti-idiotype: A basis for autoimmunity and a strategy for anti-receptor antibodies. *Immunol Rev* 1986; **94**: 23–38.
- [22] FEHLMANN M, SAMSON M, PEYRON JF. Nonimmunological functions of the major histocompatibility complex. [w] Immunogenetics of Endocrine Disorders. Alan R. Liss, Inc. 1988: 77–88.
- [23] FOULIS AK, FARQUHARSON MA. Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing β cells in recent – onset type I diabetes mellitus. *Diabetes* 1986; **35**: 1224–1226.
- [24] GAO EK, LO D, CHENEY R, KANAGAWA O, SPRENT J. Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporine A. *Nature* 1988; **336**: 176–179.
- [25] GOLDING H, ROBEY FA, GALES FT, LONDER W, BEINING PR, HOFFMAN T, GOLDING B. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II β 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp 41 derived peptide and patient sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med* 1988; **167**: 914–923.
- [26] GUILBERT B, DIGHIERO G, AVRAMEAS S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation, and characterization. *J Immunol* 1982; **128**: 2787–27899.
- [27] HABETS WJ, BERDEN JHM, HOCH SO, VAN VENROOIJ WJ. Further characterization and subcellular localization of Sm and U1 ribonukleoprotein antigens. *Eur J Immunol* 1985; **15**: 992–997.
- [28] HACK CE, PAARDEKOOPEL J, SMEENK RJT, ABBINK J, EERENBERG AJM, NUYENS JH. Disruption of the internal thioester bond in the third component of (C3) results in the exposure of neodeterminants also present on activation products of C3: analysis with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1988; **141**: 1602–1609.
- [29] HANAFUSA T, PUJOL-BORRELL R, CHIOVATO L, RUSSELL RCG, DONIACH D, BOTAZZO GF. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves disease: Relevance for autoimmunity. *Lancet* 1983; **2**: 1111–1115.
- [30] HOHLFELD R, TOYKA KV, TZARTOS SJ, CARSON W, CONTI-TRONCONI BM. Human T-helper lymphocytes in myasthenia gravis recognize the nicotinic receptor α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5379–5383.

- [31] HOLERS VM, COLE JL, LUBLIN DM, SEYA T, ATKINSON JP. Human C3b – regulatory and C4b – regulatory proteins – a new multigene family. *Immunol Today* 1985; 6: 188–192.
- [32] JANSSON R, KARLSSON A, FORSUM U. Intrathyroidal HLA – thyrotoxicosis, Hashimoto's thyroiditis and nodular colloid goitre. *Clin Exp Immunol* 1984; 58: 264–272.
- [33] JENKINS MK, SCHWARTZ RH, PARDOLL DM. Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 1988; 241: 1655–1658.
- [34] KAPPLER JW, ROEHN N, MARRACK P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49: 273–280.
- [35] KAPPLER JW, STAERZ U, WHITE J, MARRACK PC. Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 1988; 332: 35–40.
- [36] KAY MB. Autoimmunity and aging. *Concepts Immunopathol* 1987; 6: 136–192.
- [37] KAY MB, BOSMAN GJC, SHAPIRO SS, BENDICH A, BAS-SEL PS. Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2463–2467.
- [38] KISIELOW P, BLÜTHMANN H, STAERZ UD, STEINMETZ M, von BOEHMER H. Tolerance in T-cell receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 1988; 333: 742–746.
- [39] KRAUS W, OHYAMA K, SNYDER S, BEACHEY EH. Autoimmune sequence of Streptococcal M proteins shared with the intermediate filament protein, vimentin. *J Exp Med* 1989; 169: 481–492.
- [40] LAMBRIS JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today* 1988; 9: 387–392.
- [41] LERNER MR, BOYLE JA, HARDIN JA, STEITZ JA. Two novel class of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 1981; 211: 400–402.
- [42] LERNER MR, STEITZ JA. Antibodies to small nuclear RNAs complex with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5495–5499.
- [43] LO D, BURKLY LC, WIDERA G, COWING C, FLAVELL RA, PALMITER RD, BRINSTER RL. Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class II MHC molecules in pancreatic beta cells. *Cell* 1988; 53: 159–168.
- [44] LONDEIM, LAMB JR, BOTAZZO GF, FELDMANN M. Epithelial cells expressing aberrant MHC class II determinants can present antigen to cloned human T cells. *Nature* 1984; 312: 639–641.
- [45] LOW PS, WAUGH SM, ZINKE K, DRENCKHAM D. The role of hemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 1985; 227: 531–533.
- [46] MACDONALD HR, SCHNEIDER R, LEES RK, HOWE RC, ACHA-OBERA H, FESTENSTEIN H, ZINKERNAGEL RM, HENGARTNER H. T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls-encoded antigens. *Nature* 1988; 332: 40–44.
- [47] MANIATIS T, REED R. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* 1987; 325: 673–677.
- [48] MARON R, ELIAS D, DE JONGH BM, BRUINING GJ, van ROOD JJ, SHECHTER Y, COHEN IR. Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes. *Nature* 1983; 303: 817–818.
- [49] MARRACK P, KAPPLER J. The T cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol Today* 1988; 9: 308–315.
- [50] MAUL GG, FRENCH BT, van VENROOIJ WJ, JIMENZ SA. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: Enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 5145–5149.
- [51] MEDOF ME, KINOSHITA T, SILBER R, NUSSENWEIG V. Amelioration of lytic abnormalities of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with decay-accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2980–2984.
- [52] MELMS A, CHRESTEL S, SCHALKE BCG, WEKERLE H, MAURON A, BALLIVERT M, BARKOS T. Autoimmune lymphocytes – T in myasthenia gravis – determination of target epitopes using T – lines and recombinant products of the mouse nicotinic acetylcholine receptor gene. *J Clin Invest* 1989; 83: 785–790.
- [53] MIMORI T, HARDIN JA, STEITZ JA. Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patient with rheumatic disorders. *J Biol Chem* 1986; 261: 2274–2278.
- [54] NICHOLSON-WELLER A, MARCH JP, ROSENFELD SJ, AUSTEN KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 5066–5070.
- [55] OGATA K, OGATA Y, TAKASAKI Y, TAN EM. Epitopes on proliferating cell nuclear antigen recognized by human lupus autoantibodies and monoclonal autoantibody. *J Immunol* 1987; 139: 2942–2946.
- [56] PARHAM P. Intolerable secretion in tolerant transgenic mice. *Nature* 1988; 333: 500–503.

- [57] PLOTZ PH. Autoantibodies are anti-idiotypic antibodies to antiviral antibodies. *Lancet* 1983; 2: 824–834.
- [58] PRELICH G, TAN CK, KOSTURA M, MATHEWS MB, SO AG, DOWNEY KM, STILLMAN B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase delta auxiliary protein. *Nature* 1987; 326: 517–520.
- [59] PULLEN AM, MARRACK P, KAPPLER JW. The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 1988; 335: 796–801.
- [60] RADEMACHER TW, PAREKH RJ, DWEK RA, ISENBERG D, ROOK G, AXFORD JS, ROITT I. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1988; 10: 231–249.
- [61] RAZ E, BREZIS M, ROSEMANN E, EILAT D. Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. *J Immunol* 1989; 142: 3076–3082.
- [62] RINKE J, STEITZ JA. Precursor molecules of both human 5S ribosomal and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La antibodies. *Cell* 1982; 29: 149–159.
- [63] ROITT IM. *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford 1988: 238–241.
- [64] ROITT IM, MALE DK, COOKE A, LYDYARD PM. Idiotypes and autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol* 1983; 6: 51–66.
- [65] SAKAGUSHI S, SAKAGUSHI N. Organ-specific autoimmune disease induced in mice by eliminating of T-cell subsets. V. Neonatal administration of cyclosporine A causes autoimmune disease. *J Immunol* 1989; 142: 471–480.
- [66] SARVETNICK N, LIGGITT D, PITTS SL, HENSEN SE, STEWART TA. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon gamma. *Cell* 1988; 52: 773–782.
- [67] SCHECHTER Y, MARON R, ELIAS D, COHEN IR. Autoantibodies to insulin receptor spontaneously develop as anti-idiotypes in mice immunized with insulin. *Science* 1982; 216: 542–545.
- [68] SCHWIMBECK PL, YU DTY, OLDSTONE MBA. Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease. *J Exp Med* 1987; 166: 173–181.
- [69] SEGALL M. HLA and genetics of IDDM. *Diabetes* 1988; 37: 1005–1008.
- [70] SHARP PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 1987; 235: 766–771.
- [71] SHERO JH, BORDWELL BB, ROTHFIELD NF, EARNSHAW WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Sc1-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986; 231: 737–739.
- [72] SHI Y, SAHAI BM, GREEN DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; 339: 625–626.
- [73] SINGAL DP, D'SOUZA M, REID B, BENSON WG, KASSAM YB, ADACHI JD. HLA-DQ beta-chain polymorphism in HLA-DR4 haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1987; 2: 1118–1120.
- [74] SINCLAIR NRS, PANOSKALTSIS A. The immunoregulatory apparatus and autoimmunity. *Immunol Today* 1987; 9: 260–265.
- [75] SMITH CA, WILLIAMS GT, KINGSTON R, JENKINSON EJ, OWEN JJT. Antibodies to CD3/T-cell receptor induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* 1989; 337: 181–184.
- [76] STAFFORD HA, TYKOCINSKI ML, LUBLIN DM, HOLERS VM, ROSSE WF, ATKINSON JP, MEDOF ME. Normal polymorphic variations and transcription of the decay accelerating factor gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 880–884.
- [77] TAMI JA, URSO OE, KROSLICK KA. T cell hybridomas reactive with the acetylcholine receptor and its subunits. *J Immunol* 1987; 138: 732–738.
- [78] TAN EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 136–138.
- [79] TODD JA, ACHA-ORBERA H, BELL JI, CHAO N, FRONEK Z, JACOB CO, MCDERMOTT M, SINHA AA, TIMMERMAN L, STEIMAN L. A molecular basis for MHC class associated autoimmunity. *Science* 1988; 240: 1003–1009.
- [80] TODD JA, BELL JI, MCDEVITT HO. A molecular basis for genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends in Genetic* 1988; 4: 129–134.
- [81] TZARTOS SJ, KOKLA A, WALGRAVE SL, CONTI-TRONCONI BM. Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67–76 of the α subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2899–2903.
- [82] WAGENAAR JPA, NIEUWENHUIS P, STET RJM, WUBBENA AS, KAMPINGA J, KARRENBELD A. The transcapsular route – a new way for (self-) antigens to bypass the blood thymus barrier? *Immunol Today* 1988; 9: 372–375.

- [83] WICK G, KROMER K, NEU N, FASSLER R, ZIEMICKI A, LLER RG, GINZEL M, BELADII I, KUHR T, HALA K. The multifactorial pathogenesis of autoimmune disease. *Immunol Lett* 1987; **16**: 249–256.
- [84] WINCHESTER RJ, GREGERSEN PK. The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis: The conformational equivalence hypothesis. *Springer Semin Immunopathol* 1988; **10**: 119–139.
- [85] ZALMAN LS, WOOD LM, FRANK MM, MULLER-EBERHARD HJ. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1987; **165**: 572–577.

Otrzymano: 13 lipca 1990 r.

Przyjęto: 14 marca 1991 r.

Adres Autora: ul Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

KRONIKA

STANOWISKO ŚRODOWISK NAUKOWYCH W SPRAWIE ETYCZNYCH ZAGADNIEŃ ZWIĄZANYCH Z BADANIAMi GENETYCZNYMI

W dniach 22-27 lipca 1990 roku w japońskim mieście Inuyama odbyła się konferencja okrągłego stołu na temat etycznych problemów związanych z badaniami genetycznymi, a zwłaszcza z badaniami nad: ludzkim genomem, cechami genetycznymi populacji, profilaktyką chorób dziedzicznych i nad metodami terapeutycznymi zawierającymi aspekty genetyczne. Konferencję zorganizował CIOMS z udziałem Rady Badań Naukowych Japonii. Sponsorami tego wydarzenia były Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Światowa Organizacja ds. Edukacji, Nauki i Kultury (UNESCO). Było to piąte z kolei międzynarodowe spotkanie dyskusyjne, zajmujące się polityką zdrowotną w świetle wartości etycznych i humanistycznych. W konferencji uczestniczyło 102 uczestników z 24 krajów ze wszystkich kontynentów. Poza lekarzami i uczonymi zajmującymi się badaniami biomedycznymi w dyskusjach uczestniczyli psycholodzy, socjolodzy, epidemiolodzy, prawnicy, filozofowie i teolodzy różnych wyznań. W czasie dyskusji plenarnych i w spotkaniach grup roboczych prezentowano poglądy i doświadczenia pochodzące z różnych systemów służby zdrowia, z uniwersytetów i placówek badawczych, z przemysłu i rządowych placówek legislacyjnych. W wyniku tych dyskusji uzgodniono poglądy w kilku sprawach związanych z nowoczesnymi tendencjami w nauce światowej i sformułowano deklarację znaną jako "Deklaracja z Inuyamy". Pełny, oryginalny tekst deklaracji jest zamieszczony poniżej. Niemniej chciałbym przedstawić w kilku zdaniach zasadnicze treści tego dokumentu.

Deklaracja podkreśla, że ogromny wysiłek naukowy jest obecnie podejmowany w sprawie ustalania miejsca i sekwencji genów ludzkich (mapowanie genomu). Wiedza ta może być z dużym pożytkiem wykorzystana w poznawaniu biologii i patologii człowieka, a zwłaszcza w wyjaśnieniu ich zasadniczych mechanizmów. Rozwój tej wiedzy jest bardzo wartościowy i nie stwarza specyficznych, nowych problemów etycznych. Rozwój ten powinien jednak być uzyskiwany zgodnie ze znanymi i stosowanymi w nauce zasadami

etycznymi. Wiedza ta powinna być powszechnie dostępna i wykorzystywana dla dobra zdrowia człowieka.

Niekiedy są zgłaszane obawy, że pogłębiane badania genetyczne u ludzi zredukują pojęcie człowieczeństwa do określenia kolejności par zasad w DNA. Ale pogłębiona wiedza prowadzi nie tyle do redukcji pojęcia człowieczeństwa, co do wzniesienia się rozważań na wyższy, inny jakościowo poziom. Już obecnie poziom badań pozwala na zmiany w genomie komórek somatycznych, które to zmiany nie są dziedziczone i dotyczą jedynie osobnika leczonego. Perspektywa modyfikacji genomu komórek rozrodczych jest odleglejsza i z pewnością wymaga znacznie większej ostrożności przy ewentualnych próbach zastosowań terapeutycznych.

Wyniki diagnostycznych badań genetycznych wpływają na życie osób badanych i dlatego powinny być chronione przed niepożądanym ujawnieniem. Nosiciele genów, od których zależy dziedziczenie chorób, powinni być poinformowani przez lekarzy, że nie koniecznie trzeba samemu być chorym, aby przekazać potomstwu chorobę uwarunkowaną genetycznie.

Pracownicy nauki i lekarze są obciążeni bardzo poważną odpowiedzialnością za etyczne wykorzystanie technik i metod służących poznaniu i wykorzystaniu w terapii cech genetycznych człowieka.

Wydaje się, że Deklaracja z Inuyamy zawiera ważne treści, które powinny być powszechnie znane w związku ze znacznym zainteresowaniem możliwościami stwarzanymi przez współczesną genetykę.

Prof. dr Janusz Komender
Polska Akademia Nauk, VI Wydział Nauk Medycznych, Warszawa

THE DECLARATION OF INUYAMA

1 Discussion of human genetics is dominated today by the efforts now under way on an international basis to map and sequence the human genome. Such attention is warranted by the scale of the undertaking and its expected contribution to knowledge about human biology and disease. At the same time, the nature of the undertaking, concerned as it is with the basic elements of life, and the potential for abuse of the new knowledge which the project will generate are giving rise to anxiety. The Conference agrees that efforts to map the human genome present no inherent ethical problems but are eminently worthwhile, especially as the knowledge revealed will be universally applicable to benefit human health. In terms of ethics and human values, what must be assured are that the manner in which gene mapping efforts are implemented adheres to ethical standards of research and that the knowledge gained will be used appropriately, including in genetic screening and gene therapy.

2 Public concern about the growth of genetic knowledge stems in part from the misconception that while the knowledge reveals an essential aspect of humanness it also diminishes human beings by reducing them to mere base pairs of deoxyribonucleic acid (DNA). This misconception can be corrected by education of the public and open discussion, which should reassure the public that plans for the medical use of genetic findings and techniques will be made openly and responsibly.

3 Some types of genetic testing or treatment not yet in prospect could raise novel issues – for example, whether limits should be placed on DNA alterations in human germ cells because such changes would affect future generations, whose consent cannot be obtained and whose best interests would be difficult to calculate. The Conference concludes, however, that for the most part present genetic research and services do not raise unique or even novel issues, although their connection to private matters such as reproduction and personal health and life prospects, and the rapidity of advances in genetic knowledge and technology accentuate the need for ethical sensitivity in policymaking.

4 It is primarily in regard to genetic testing that the human genome project gives rise to concern about ethics and human values. The identification cloning, and sequencing of new genes without first needing to know their protein products greatly expand the possible scope for screening and diagnostic tests. The central objective of genetic screening and diagnosis should always be to safeguard the welfare of the person tested: test results must always be protected against unconsented disclosure, confidentiality must be ensured at all costs, and adequate counselling must be provided. Physicians and others who counsel should endeavour to ensure that all those concerned understand the difference between being the carrier of a defective gene and having the corresponding genetic disease. In autosomal recessive conditions, the health of carriers (heterozygotes) is usually not affected by their having a single copy of the disease gene; in dominant disorders, what is of concern is the manifestation of the disease, not the mere presence of the defective gene, especially when years may elapse between the results of a genetic test and the manifestation of the disease.

5 The genome project will produce knowledge of relevance to human gene therapy, which will very soon be clinically applicable to a few rare but very burdensome recessive disorders. Alterations in somatic cells, which will affect only the DNA of the treated individual, should be evaluated like other innovative therapies. Particular attention by independent ethical review committees is necessary, especially when gene therapy involves children, as it will for many of the disorders in question. Investigations should be limited to conditions that cause significant disability and not employed merely to enhance or suppress cosmetic, behavioural or cognitive characteristics unrelated to any recognized human disease.

6 The modification of human germ cells for therapeutic or preventive purposes would be technically much more difficult than that of somatic cells and is not at present in prospect. Such therapy might, however, be the only means of treating certain conditions, so continued discussion of both its technical and its ethical aspects is therefore essential. Before germ-line therapy is undertaken, its safety must be very well established, for changes in germ cells would affect the descendants of patients.

7 Genetic researchers and therapists have a strong responsibility to ensure that the techniques they develop are used ethically. By insisting on truly voluntary programmes designed to benefit directly those involved, they can ensure that no precedents are set for eugenic programmes or other misuse of the techniques by the State or by private parties. One means of ensuring the setting and observance of ethical standards is continuous multidisciplinary and transcultural dialogue.

8 The needs of developing countries should receive special attention, to ensure that they receive their due share of the benefits that ensue from the human genome project. In particular, methods and techniques of testing and therapy that are affordable and easily accessible to the populations of such countries should be developed and disseminated whenever possible.

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 przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednon stronnie 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 zestawiać 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 niezmienionej 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 nadtęk.

TREŚĆ

ZEMAN K., MAJEWSKA E.: Receptory granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilii) krwi obwodowej. I. Charakterystyka struktury i biologicznej funkcji receptorów	1
ZEMAN K., KANTORSKI J.: Receptory granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilii) krwi obwodowej. II. Mechanizmy przekazywania i rozprzestrzeniania się sygnału	19
JACKOWSKI G., SCHNEIDER J.: Immunochemiczne właściwości białek tylakoidowych anten energetycznych	31
ZABEL M.: Hybrydocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy	47
CZYŻYK J. K.: Podłoże zjawisk autoimmunologicznych	55
KOMENDER J.: Stanowisko środowisk naukowych w sprawie etycznych zagadnień związanych z badaniami genetycznymi	73
The declaration of Inuyama	75

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