

92435

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

**TOM 19-NR 2'92**  
(105 – 184)

# Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

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

Rada Redakcyjna:

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

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

---

**Fundacja •Rozwój SGGW-AR•**

Ark. wyd. 7,25 Ark. druk.5,0 Oddano do składu w marcu 1992 r. Podpisano do druku w maju 1992 r. Druk ukończono w czerwcu 1992 r.

---

**■ W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •**

- Cytogenetyczna rola heterochromatyny i wysoce powtarzalnych sekwencji DNA w chromosomach żyta została omówiona w artykule S. Rogalskiej (s. 107).
- Stymulacja limfocytów T może być modelem transdukcji sygnału przez błonę komórkową. O roli kationów w tym procesie można przeczytać na stronach: 117 i 139.
- Rolę kwasu glutaminowego oraz innych aminokwasów jako neurotransmiterów opisano w artykule S. Głazewskiego i W. Danysza (s. 145). Szczególną uwagę zwrócono na receptory dla tych neurotransmiterów.
- Istnienie swoistych receptorów na powierzchni komórki w znacznym stopniu ułatwia penetrację odpowiednich ligandów do wnętrza komórki. O mechanizmach tych procesów omówionych głównie na przykładzie hepatocytów można dowiedzieć się z artykułów P. Kapusty i A. M. Kordowiak (s. 163 i 179).

**■ W następnym zeszycie między innymi:**

- Rola receptora c-kit i jego ligandu w regulacji krwiotworzenia
- Poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej
- Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych
- Cytometria przepływowa



# CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I CYTOGENETYCZNA HETEROCHROMATYNY W CHROMOSOMACH ŻYTA (*SECALE CEREALE* L.)

## MOLECULAR CHARACTERISTICS AND CYTOGENETIC ROLE OF HETEROCHROMATIN IN CHROMOSOMES OF RYE (*SECALE CEREALE* L.)

Stanisława M. ROGALSKA

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono przegląd danych literaturowych dotyczących charakterystyki molekularnej heterochromatyny telomerycznej i interstycjalnej w chromosomach żyta uprawnego *Secale cereale* L. Chromosomy żyta uprawnego charakteryzują się obecnością prążków heterochromatynowych w jednym lub w obu telomerach u wszystkich chromosomów, zmienną liczbą prążków interstycjalnych w określonych chromosomach i w obszarach centromerowych. Za pomocą klonowania molekularnego i hybridyzacji in situ wykazano, że w heterochromatynie telomerycznej występuje 5 rodzin wysoce powtarzalnych sekwencji DNA, a mianowicie: 120 par zasad, 480 par zasad, 610 par zasad, 630 par zasad i 350 par zasad. W miejscach występowania prążków interstycjalnych zlokalizowano tylko dwie rodziny – 120 i 480 par zasad. Żadna z wymienionych rodzin nie występowała w obszarze NOR ani w rejonie centromeru. W pracy zaprezentowano też dyskusję nad cytoogenetyczną rolą heterochromatyny telomerycznej, jak i budujących ją wysoce powtarzalnych sekwencji DNA.

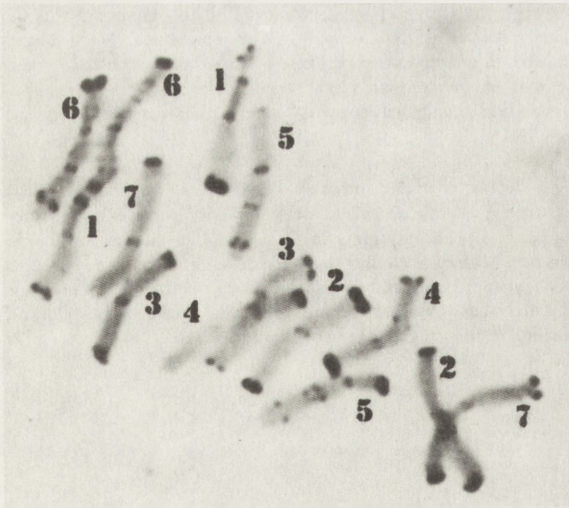
**Summary.** In this review the problems concerning molecular characteristics and cytogenetic role of telomeric and interstitial heterochromatin in chromosomes of cultivated rye *Secale cereale* L. are presented. The rye chromosomes have large telomeric bands at one or at both telomeres of all chromosomes. Small but distinguishable centromeric bands and interstitial bands vary in size and prominence. Molecular cloning and hybridization in situ have revealed presence of five families of highly repeated DNA sequences predominantly in telomeric heterochromatin. There were families: 120 bp, 480 bp, 610 bp, 630 bp and 350 bp. In places of interstitial bands there were families of 120 bp and 480 bp hybridized only. There was neither hybridization in NOR region nor in centromere areas.

### WSTĘP

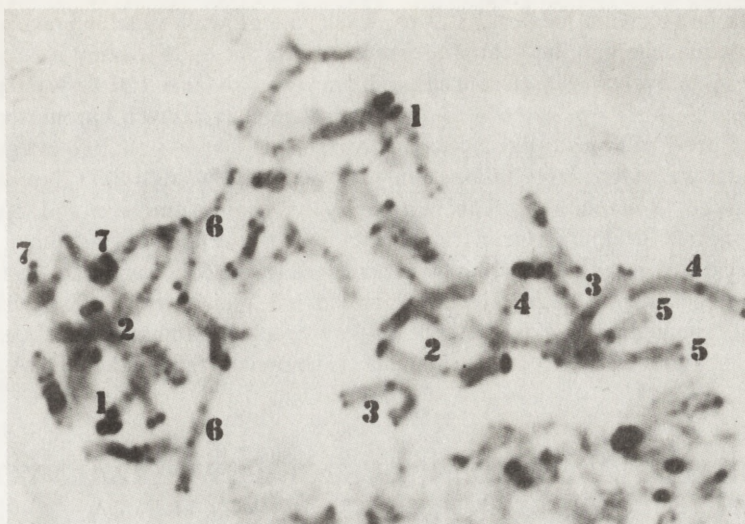
Chromosomy żyta uprawnego *Secale cereale* L. ( $2n=14$ ) charakteryzują się obecnością specyficznych prążków heterochromatynowych, widocznych w wyniku barwienia

odczynnikiem Giemsy. Wzór prążków heterochromatynowych tworzą: 1) duże, intensywnie wybarwione bloki heterochromatyny w obu lub w jednym z telomerów u wszystkich chromosomów; 2) małe, lecz widoczne prążki centromerowe oraz 3) prążki interstycjalne o różnej liczbie i wielkości [ 1, 6, 21, 24, 25, 27 ].

Genom *Secale cereale*, podobnie jak genomy innych gatunków z rodzaju *Secale*, charakteryzuje ogromna zmienność w zawartości i typie sekwencji nukleotydowych DNA w obrębie gatunku i pomiędzy gatunkami [ 6, 12, 15 ]. Wielkość genomu żyta uprawnego (*Secale cereale* L.) wynosi (1C DNA) 9,5 pg [5]. Dla porównania wielkość genomu muszki owocowej *Drosophila melanogaster* wynosi 0,14 pg, a człowieka 3 pg. Uważa się, że większy genom oznacza, że bardzo niewiele (ok. 1%) DNA składa się z sekwencji kodujących [10]. Pozostały DNA stanowi tzw. "wtórny" lub "reliktowy" DNA, zbudowany z powtarzalnych sekwencji nukleotydowych. U zbóż ponad 75% DNA stanowią powtarzalne lub wysoce powtarzalne sekwencje nukleotydowe [12, 18, 30, 31]. Przypuszcza się, że genomy roślin zbożowych zawierają setki lub nawet tysiące powtórzonych sekwencji nukleotydowych. Wykazano, że zmienność w ilości i w typach sekwencji nukleotydowych jest pozytywnie skorelowana ze zmiennością w ilości heterochromatyny konstytutywnej. Stąd też wysuwa się pogląd, że dodanie lub ubytek heterochromatyny staje się główną przyczyną zmian w zawartości DNA w genomach *Secale* [1, 6, 11, 15, 18, 24, 25]. Związek pomiędzy występowaniem określonych zbiorów powtarzalnych sekwencji nukleotydowych i heterochromatyny konstytutywnej w chromosomach wykazano po raz pierwszy u myszy [16, 23]. Potem stwierdzono to w chromosomach żyta (*Secale cereale* L.) [1]. W następstwie tego odkrycia, na podstawie analizy restrykcyjnej scharakteryzowano te zbiory (rys. 1). W wyniku klonowania molekularnego i hybrydyzacji in situ określono miejsce ich występowania w chromosomach gatunków z rodzaju *Secale* [1, 2, 3, 4, 20].



Rys. 1. Chromosomy żyta uprawnego (*Secale cereale* L. cv GAWAHR CZ – USA)  $2n=14$ ; cyframi oznaczono pary chromosomów homologicznych; widoczny charakterystyczny i zmienny wzór prążków heterochromatynowych



Rys. 2. Chromosomy pszenżyta (*X Triticosecale* Wittmack, cv Florico - USA)  $2n=6x=42$ ; cyframi oznaczono pary chromosomów należące do genomów żyta; widoczne odmienne rozmieszczenia heterochromatyny w chromosomach żyta i pszenicy

## CHARAKTERYSTYKA RODZIN WYSOCE POWTARZALNYCH SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA W GENOMIE *SECALE CEREALE* L.

Przeprowadzono analizę restrykcyjną genomu żyta przy pomocy endonukleaz restrykcyjnych typu II-EcoRI, AluI, Bam HI, BglI, BglII, Hae III, Taq i Mbo I. Następnie po oczyszczeniu uzyskanych fragmentów DNA, klonowaniu i selekcji klonów wyodrębniono 5 zbiorów powtarzalnych sekwencji nukleotydowych DNA żyta [2, 3, 4]. Kopię z każdej z pięciu rodzin powtarzalnych sekwencji nukleotydowych DNA włączono do odpowiednio przygotowanego DNA plazmidowego, uzyskując w ten sposób sondy molekularne, pozwalające na badania ilości i miejsca występowania tych rodzin w genomie żyta [2, 3, 4]. W doświadczeniach z udziałem żyta odmiany King II, Petkus, UC 90, linii addycyjnych Holdfast /King II oraz *Triticale* Rosner zastosowano następujące sondy molekularne: pSC210 z jednostką powtórzeń 480 par zasad, pSC34 z jednostką 610 pz, pSC119 z kopią 120 pz i pSC33 z kopią 630 par zasad [18, 19]. Doświadczenia wykazały, że rodziny wysoce powtarzalnych sekwencji DNA stanowią w przybliżeniu od 8 do 12% całej ilości DNA genomu żyta. Wśród nich oznaczono rodzinę powtórzeń jednostki liczącej 120 par zasad, która stanowi ok. 2% całego genomu. Wykazano jej obecność we wszystkich gatunkach *Secale*, a także w genomach *Triticum*, *Elymus*, *Agropyron*, *Hystrix* i *Haynaldia*. Uważana jest za najbardziej heterogeniczną i najstarszą ewolucyjnie rodzinę wysoce powtarzalnych sekwencji DNA. Drugą rodzinę stanowi zbiór powtórzeń jednostki liczącej 480 par zasad. Seria ta występuje w ilości 6% całego genomu i jest typowa dla gatunków z rodzaju *Secale*. Nie stwierdzono jej obecności w żadnym innym gatunku z plemienia *Triticeae*. Nie jest jednorodna i tworzą ją mniejsze podjednostki powtórzeń, będące równocześnie miejscami insercji.

Podobnie jak powtórzenia jednostki 120 pz, występuje głównie w telomerach wszystkich chromosomów danego garnituru chromosomowego żyta. Te dwie rodziny różnią się liczbą miejsc interstycjalnych w chromosomach, a mianowicie: rodzina 120 pz występuje w 8 i więcej miejscach, a 480 pz tylko w 1–3 miejscach interstycjalnych chromosomów żyta. Trzecia seria powtórzeń jednostki liczącej 610 par zasad stanowi ok. 3% całego genomu. Uważana jest za najbardziej homogeniczną rodzinę i występuje tylko w dużych, telomerycznych blokach heterochromatynowych chromosomów z rodzaju *Secale*. Charakteryzuje się strukturą złożoną z podjednostek sekwencji powtarzalnych. Rodzina czwarta, zwykle określana jako zbiór powtórzeń jednostki 630 par zasad, jest w istocie kompozycją trzech, różnej długości jednostek powtórzeń, a mianowicie: 120 pz, 350 pz i 630 pz. Ciekawe, że podjednostka 120 pz jest obecna we wszystkich gatunkach *Secale*, a sekwencje 350 pz i 630 pz tylko u *Secale cereale*. Rodzina ta stanowi ok. 0,5% całego DNA żyta.

## LOKALIZACJA RODZIN WYSOCE POWTARZALNYCH SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA W CHROMOSOMACH ODMIANY KING II [18, 19]

**Chromosom 1R** – jąderkowy – wszystkie cztery rodziny powtarzalnych sekwencji znajdowały się w obu telomerach. Dodatkowo seria 120 pz występowała w miejscu interstycjalnym na długim ramieniu. Tak więc, z wyjątkiem obszaru NOR, miejsca występowania rodzin powtarzalnych sekwencji odpowiadały wzorowi prążków C w tym chromosomie.

**Chromosom 2R** – zawierał wszystkie kopie powtórzeń w telomerze krótszego ramienia. W drugim telomerze były obecne trzy rodziny: 120 pz, 480 pz i 610 pz.

**Chromosom 3R** – wszystkie rodziny były obecne w obu telomerach i dodatkowo zbiór 120 pz był obecny w miejscu interstycjalnym prążka heterochromatynowego.

**Chromosom 4R/7R** – charakteryzował się obecnością wszystkich czterech rodzin powtarzalnych sekwencji DNA w obszarze heterochromatyny w telomerze krótszego ramienia. Natomiast w telomerze długiego ramienia była obecna tylko rodzina 480 pz. W interstycjalnym prążku na dłuższym ramieniu zlokalizowane były powtórzenia jednostki 120 par zasad.

**Chromosom 5R** – wykazywał hybrydyzację wszystkich czterech rodzin w telomerze na końcu krótkiego ramienia. Powtórzenia jednostki 480 pz hybrydyzowały w pozycji subtelomerycznej na długim ramieniu, podczas gdy rodzina 120 pz w różnych miejscach interstycjalnych bliżej centromeru. Występowanie serii powtarzalnych sekwencji odpowiadało, podobnie jak i w poprzednio opisanych chromosomach, wzorowi prążków C.

**W chromosomach 6R** – stwierdzono obecność wszystkich czterech typów powtórzeń w telomerze krótszego ramienia. W drugim telomerze i w miejscu subtelocentrycznym były obecne powtórzenia 480 par zasad. Rodzina 120 pz słabo hybrydyzowała w telomerze, a silnie w dwóch miejscach po stronie proksymalnej od środka długiego ramienia. Miejsca hybrydyzacji rodzin powtórzeń odpowiadały wzorowi prążków heterochromatynowych w tym chromosomie.



W chromosomie 7R/4R – wszystkie cztery serie wysoce powtarzalnych sekwencji DNA znajdowały się w obu telomerach i dodatkowo rodzina 120 pz była obecna w miejscu interstycjalnym dłuższego ramienia.

#### LOKALIZACJA RODZIN WYSOCE POWTARZALNYCH SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA W CHROMOSOMACH ŻYTA KING II DODANYCH DO GENOMÓW PSZENICY HOLDFAST [18, 19]

Chromosomy par 1R, 5R, i 6R żyta King II w liniach addycyjnych były takie same pod względem prążków C i lokalizacji rodzin powtarzalnych sekwencji DNA jak w odmianie King II. Chromosom 2R w linii addycyjnej miał deficycję części heterochromatyny z telomeru na krótszym ramieniu [9, 31] i nie stwierdzono tam obecności rodzin 610 pz i 630 pz. Powtórzenia jednostki liczącej 480 pz występowały tylko w telomerze długiego ramienia, w przeciwieństwie do rodziny 120 pz, która znajdowała się w obu telomerach. Wynika z tego, że w towarzystwie genomów pszenicy chromosom żyta King II – 2R utracił wraz z częścią heterochromatyny wszystkie kopie powtórzeń 610 pz i 630 pz oraz część sekwencji z rodziny 480 par zasad. Podobna sytuacja powstała w chromosomie 3R dodanym do pszenicy Holdfast. Otóż w środowisku pszenicznym został znacznie zredukowany prążek heterochromatynowy na końcu krótszego ramienia [31]. Jak wykazała hybrydyzacja *in situ*, stało się to za przyczyną deficycji części kopii rodziny 480 pz bez naruszenia pozostałych serii powtarzalnych sekwencji DNA obecnych w obu telomerach tego chromosomu. Następnym chromosomem, który wykazywał znaczną redukcję telomerycznej heterochromatyny na końcu krótszego ramienia, był chromosom 4R/7R [31]. Ubytkowi heterochromatyny towarzyszył brak hybrydyzacji powtórzeń 480 pz, 610 pz i 630 pz. Pozostałe powtórzenia sekwencji 120 pz hybrydyzowały w obu telomerach oraz w miejscu prążka interstycjalnego na dłuższym ramieniu.

W trzech różnych roślinach, z tej samej linii homozygotycznej obserwowano zmienność w występowaniu rodziny 610 pz w obrębie pary chromosomów 7R/4R, która powstała wskutek deficycji i duplikacji.

Przedstawiona powyżej charakterystyka chromosomów żyta King II dodanych lub inaczej umieszczonych w środowisku pszenicy Holdfast sugeruje, że obserwowano modyfikacje powstałe pod wpływem genomów pszenicy [31]. Ciekawe, że modyfikacyjnym oddziaływaniom genomów pszenicy uległy tylko niektóre chromosomy żyta, których jak gdyby dopasowanie było w pierwszym rzędzie konieczne albo te, które zawierały geny ważne dla dalszego procesu uzyskiwania równowagi genetyczno-cytogenetycznej.

Jeżeli chodzi o rodziny powtarzalnych sekwencji, to przede wszystkim usuwane były ze środowiska pszenicznego rodziny 610 pz i 630 pz, a potem częściowo także i sekwencje z rodziny 480 pz. To znaczy, że usuwane były z niektórych chromosomów żyta sekwencje typowe dla żyta, a zawsze pozostawała rodzina 120 pz, która nie jest obca pszenicy.

#### PORÓWNANIE WZORU HYBRYDYZACJI W CHROMOSOMACH ODMIAN PETKUS I UC 90 DO WZORU W CHROMOSOMACH ODMIANY KING II [18, 19]

Rodzina 120 par zasad hybrydyzowała w obu telomerach w dwóch medialnych chromosomach i w chromosomie jąderkowym u wszystkich odmian. Przynajmniej trzy pozostałe chromosomy, we wszystkich odmianach, wykazywały główne miejsca hybrydyzacji w interstycjalnych punktach długich ramion – 3R, 4/7R, 5R i 6R. Dwa interstycjalne miejsca

hybrydyzacji na długim ramieniu chromosomu 6R nie były widoczne w chromosomach u odmiany Petkus i UC 90. Widoczna też była heterozygotyczność w występowaniu tej rodziny w parach 5R w odmianie UC 90 i w chromosomie 1R u King II.

**Rodzina 480 par zasad** była obecna w telomerach nie u wszystkich chromosomów w odmianie UC 90. W różnych roślinach tej odmiany stwierdzono zmienność pomiędzy chromosomami, np. chromosom 1R w niektórych był heterozygotyczny pod względem obecności sekwencji powtórzeń 480 pz. Było to zbieżne z heterozygotycznością prążka heterochromatynowego występującego w tym miejscu chromosomu 1R. Ilościowe zróżnicowanie w oznakowaniu miejsc pomiędzy różnymi chromosomami było najbardziej widoczne u chromosomów w odmianie Petkus. U wszystkich trzech odmian wzór hybrydyzacyjny w chromosomach 5R i 6R był taki sam jak w liniach addycyjnych Holdfast/King II, to znaczy wszędzie rodzina ta występowała w pozycji proksymalnej do telomeru na końcu długiego ramienia. Obserwowane drobne zróżnicowania w hybrydyzacji były bardzo zbliżone do opisywanych zmienności w występowaniu wzorów prążków C w tych odmianach i pomiędzy odmianami [9, 13, 21].

Powtórzenia 610 par zasad zostały zlokalizowane w obu telomerach w trzech parach chromosomów w odmianach King II i UC 90 i tylko w dwóch chromosomach w odmianie Petkus. Poza tym te trzy odmiany były bardzo podobne pod względem braku hybrydyzacji tej rodziny w miejscach interstycjalnych w chromosomach. W odmianie UC 90 ilościowe zróżnicowanie w oznakowaniu było widoczne w obrębie pary chromosomów 2R.

Sekwencje z rodziny 630 par zasad nie hybrydyzowały z chromosomami żyta odmiany Petkus. Odmiany UC 80 i King II różniły się ilością ziaren srebra znajdującego się nad chromosomami po hybrydyzacji z podobną ilością sondy, co może wskazywać na zróżnicowaną liczbę sekwencji powtarzalnych DNA w chromosomach tych odmian.

## HYBRYDYZACJA IN SITU W CHROMOSOMACH ŻYTA W *TRITICALE* ROSNER [18,19]

W wyniku przeprowadzonej hybrydyzacji in situ z sondą pSCI9 zawierającą sekwencje 120 par zasad otrzymano wzór hybrydyzacyjny bardzo trudny do zinterpretowania. Przyczyną tego jest występowanie powtórzeń 120 par zasad także w chromosomach pszenicy, jakkolwiek w mniejszych ilościach niż w życie [3, 30]. Wszystkie czternaście chromosomów żyta charakteryzowało bardzo intensywne oznakowanie. Ponadto widocznych było o wiele więcej miejsc hybrydyzacji niż w samym życiu. Wynika to z faktu, że dla pewnych rodzin powtarzalnych sekwencji środowisko mieszańcowe i długość czasu ekspozycji autoradiograficznej może mieć główny wpływ na uwidocznienie się rozmieszczenia sekwencji w genomie.

Sekwencje rodziny 480 par zasad umieszczone w sondzie pSC 210 hybrydyzowały intensywnie z pięcioma parami chromosomów i słabo z jedną parą. Dyskusyjnym chromosomem był chromosom 2R, którego obecności nie oznaczono za pomocą prążków C [9]. Natomiast poprzez krzyżówkę z pszenicą heksaploidalną otrzymano mieszańce, u których w mejozie liczba bivalentów wskazywała na obecność wszystkich chromosomów z garnituru żytniego [9]. Wywnioskowano stąd, że zaistniała translokacja pomiędzy chromosomem żyta

2R i chromosomem pszenicy 2D i że w wyniku tego 2R utracił telomeryczną heterochromatynę, a wraz z nią rodziny powtarzalnych sekwencji DNA.

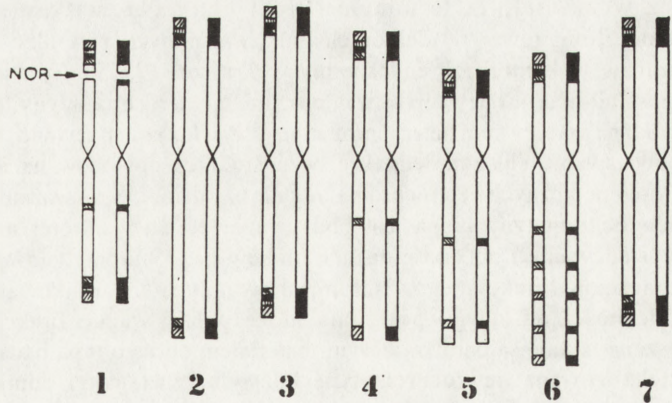
Zbiory powtarzalnych sekwencji 610 i 630 par zasad znajdujące się w sondach pSC 34 i pSC 33 odpowiednio hybrydowały tylko w pięciu chromosomach i tylko chromosom 1R wykazywał obecność tych rodzin w obu telomerach. Z powyższych doświadczeń wynika, że w *Triticale* Rosner pewne chromosomy żyta utraciły niektóre bloki powtarzalnych sekwencji DNA. Trudno jest stwierdzić, czy nastąpiło to pod wpływem genomów pszenicy, tak jak to obserwowano w liniach addycyjnych Holdfast/King II. Przyczyną tego jest nieznaną formą rodzicielską żyta dla *Triticale* Rosner, do której chromosomów można byłoby przyrównać obserwowane zmiany w chromosomach żyta w *Triticale* Rosner.

### WZAJEMNE UŁOŻENIE RODZIN WYSOCE POWTARZALNYCH SEKWENCJI NUKLEOTYDOWYCH DNA W TELOMERACH

Przytoczone wyżej cztery przykłady doświadczeń, w których badano występowanie i lokalizację rodzin wysoce powtarzalnych sekwencji DNA w chromosomach żyta, w różnych odmianach i w mieszańcach pszennożytnych wskazują na bardzo ścisłą zbieżność z wzorem prążków C w tych chromosomach. Wykazano, że telomery są miejscem występowania zarówno heterochromatyny, jak i wysoce powtarzalnych sekwencji DNA. Innymi słowy heterochromatynę telomeryczną w chromosomach żyta tworzą określone rodziny powtarzalnych sekwencji DNA [6, 20]. W prążkach centromerowych i w obszarze organizatora jąderkowego występuje inny typ heterochromatyny, zbudowany z innych rodzin powtarzalnych sekwencji DNA. Obserwacje delekcji partii heterochromatynowych wykazały ubytki całych rodzin lub części kopii. Ciekawe, że utrata określonej rodziny nie powodowała naruszenia innego zbioru powtarzalnych sekwencji DNA. Na przykład utrata wszystkich kopii 480 par zasad z telomerów chromosomów 2R<sup>S</sup> i 4R<sup>S</sup> w liniach addycyjnych nie spowodowała ubytku żadnej z pozostałych trzech rodzin. Możliwe, że każda z nich występuje w telomerach w postaci odrębnych bloków przylegających do siebie. Analiza tych delekcji posłużyła do

Rys. 3. Schematyczne przedstawienie prążków C i miejsc hybrydyzacji in situ rodzin powtarzalnych sekwencji DNA w chromosomach żyta cv King II [19]; w obrębie każdej pary chromosomu po lewej stronie mają zaznaczony wzór prążków C [9]; po lewej przedstawiono prawdopodobną lokalizację rodzin powtarzalnych sekwencji DNA:

▨ 480 pz. ▩ 610 pz. ▤ 120 pz.  
■ 630 pz



teoretycznego uszeregowania ich w telomerach (rys. 3). I tak wydaje się, że rodzina powtórzeń 120 par zasad jest najbardziej proksymalnie ułożona w stosunku do centromeru i do rodziny 480 par zasad i 350 par zasad. Obie te rodziny są ułożone najbardziej dystalnie. Pomiedzy nimi rodzina 630 par zasad sąsiaduje z rodziną 120 pz, a z drugiej strony ze zbiorem 610 par zasad, który z kolei przylega do rodziny 480 pz.

Ciekawą, cechą wspólną dla wymienionych wyżej wysoce powtarzalnych sekwencji DNA jest ich lokalizacja telomeryczna. Można domniemywać, że telomery są tymi miejscami w chromosomach żyta, w których te sekwencje i tworzona przez nie heterochromatyna mogą być tolerowane lub będąc właśnie tam mogą pełnić określone funkcje biologiczne.

## CYTOGENETYCZNA ROLA HETEROCHROMATYNY I WYSOCE POWTARZALNYCH SEKWENCJI DNA W CHROMOSOMACH ŻYTA

Charakterystyczna lokalizacja głównych bloków heterochromatyny i tworzących ją rodzin wysoce powtarzalnych sekwencji DNA w telomerach chromosomów żyta nasuwa pytanie o ich rolę, jaką pełnią w komórce i w organizmie. Wydaje się, że występowanie tych samych rodzin powtarzalnych sekwencji w różnych chromosomach garnituru żyta może mieć związek z przestrzennym ułożeniem chromosomów w jądrze komórkowym [10, 18, 19]. Według modelu Bennetta [8], haploidalny zespół chromosomów żyta jest ułożony w określonym porządku w postaci łańcucha, w którym ramię chromosomu  $1^L$  łączy się z  $3^L$ ,  $3^S-7^S$ ,  $7^L-2^L$ ,  $2^S-4^S$ ,  $4^L-6^L$  i  $6^S-5^S$  (L=długie ramię chromosomu; S=krótkie ramię). Jeden koniec łańcucha stanowi ramię  $1^S$ , a z drugiej strony  $-5^L$ . Jeżeli teraz porównamy zbiory powtarzalnych sekwencji w telomerach ramion przylegających do siebie, to okaże się, że są one bardziej podobne niż w ramionach nie przylegających do siebie. I tak na przykład zbiory rodzin 120 par zasad, 610 pz i 630 pz są obecne we wszystkich telomerach, z wyjątkiem telomerów na końcach długich ramion 4R/7R, 6R i 5R. Jeżeli faktycznie miejsca występowania powtarzalnych sekwencji DNA są wynikiem sposobu organizacji przestrzennej chromosomów w jądrze oraz wzajemnego ich współdziałania, mogłoby to również wskazywać na sposób rozprzestrzeniania się ich pomiędzy różnymi chromosomami. Uważano też wcześniej, że terminalne bloki heterochromatyny są miejscami aktywności neocentromerowej w niektórych liniach wsobnych żyta albo że powodują zakłócenia w mitozie w komórkach endospermy w *Triticale* [7, 29]. W wielu liniach żyta, w mejozie crossing-over nie występował w obszarach heterochromatyny telomerycznej [13, 15, 17], a tylko na granicy eu- i heterochromatyny. Stąd też podejrzewano, że heterochromatyna blokuje powstawanie chiazm. Jednakże bezpośrednich dowodów na istnienie takich właściwości cytogenetycznych heterochromatyny nie uzyskano. W rozważaniach nad cytogenetyczną rolą heterochromatyny brana jest pod uwagę teoria, w której myśl w pewnych sytuacjach występowanie i obecność dużych bloków heterochromatynowych może nie mieć żadnego znaczenia selekcyjnego. Natomiast w innych uwarunkowaniach heterochromatyna w zależności od swego położenia może pełnić ważne funkcje biologiczne. Mieszańce pszennożytnie są bardzo dobrym materiałem do tego typu badań ze względu na odmiennie zlokalizowaną heterochromatynę konstytutywną, jak i odmienny skład rodzin wysoce

powtarzalnych sekwencji DNA w chromosomach żyta i pszenicy. Obserwowana ogromna zmienność w występowaniu i w ilości heterochromatyny w chromosomach żyta, w samym życie nie powoduje żadnych ujemnych skutków w przebiegu mejozy ani nie wpływa negatywnie na inne cechy fenotypowe [21, 25, 33]. Natomiast w mieszańcach pszennożytnych sprawa jest znacznie bardziej trudna do zinterpretowania. Otóż w wielu formach pszenżyta, wysokoplennych, płodnych i zawiązujących dorodne ziarniaki, pewne chromosomy żyta wykazują ubytki heterochromatyny telomerycznej [7, 14, 22, 26, 28, 32]. Wygląda to tak, jak gdyby "dopasowywały się" morfologicznie do chromosomów pszenicy. Obserwacje te, zwłaszcza we wczesnym etapie ewolucji *Triticale*, były podstawą do sformułowania hipotezy, że chromosomy żyta w środowisku genomów i cytoplazmy pszenicznej są modyfikowane pod względem ilości heterochromatyny telomerycznej i że warunkuje to wysoką płodność i zawiązywanie dorodnych ziarniaków przez rośliny pszenżyta. Jednakże w miarę upływu czasu powstawały nowe formy i odmiany pszenżyta. Wiele z nich było badanych pod względem kariotypów prążków C i wówczas okazało się, że nie zawsze odmiany bardzo dobrze plonujące i o dorodnych ziarniakach mają małe prążki telomeryczne w swoich chromosomach żytnich. W wielu takich formach pszenżyta obserwowano duże bloki heterochromatyny telomerycznej na wszystkich chromosomach żyta. W związku z tym mechanistyczne podejście do roli heterochromatyny w biologii chromosomów i w przemianach jądrowych stało się niewystarczające i wręcz nieaktualne. Obserwowana bowiem zmienność w występowaniu heterochromatyny w populacjach żyta i pszenżyta wskazuje na istnienie czynnika genotypowego kontrolującego aktywność biologiczną heterochromatyny. Jego zmienność może powodować supresorujący i/lub aktywujący wpływ heterochromatyny telomerycznej na wiele cech związanych z biologią chromosomów i w następstwie tego na szereg cech fenotypowych roślin. Można powiedzieć, że jeżeli istnieje jakakolwiek aktywność komórkowa warunkowana czy regulowana przez wysoce powtarzalne sekwencje DNA zgrupowane w blokach heterochromatynowych ze względu na to miejsce ich występowania, liczbę kopii czy sekwencje, to wówczas zmienność ich może wpływać na fenotyp organizmu w populacji. Wpływ sekwencji DNA, które ulegają gwałtownym zmianom ilościowym, na określone aktywności komórkowe mogłyby być wówczas zarówno źródłem, jak i regulatorem zmienności w naturalnych populacjach.

## LITERATURA

- [1] APPELLS R, DRISCOLL C, PEACOCK WJ. Heterochromatin and highly repeated DNA sequences in rye (*Secale cereale*). *Chromosoma* (Berl) 1978; 70: 67–89.
- [2] APPELLS R, MORAN LB, GUSTAFSON JP. Rye heterochromatin. I. Studies on cluster of the major repeating sequences and identification of a new dispersed repetitive sequence element. *Can J Genet Cytol* 1986; 28: 645–657.
- [3] BEDBROOK JR, JONES J, O'DELL M, THOMPSON RD, FLAVELL RB. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. *Cell* 1980a; 19: 545–580.
- [4] BEDBROOK JR, O'DELL M, FLAVELL RB. Amplification of rearranged sequences in cereal plants. *Nature* (Lond) 1980b; 288: 133–137.
- [5] BENNETT MD, SMITH JB. Nuclear DNA in Angiosperms. *Phil Trans Roy Soc London B* 1976; 274: 227–274.
- [6] BENNETT MD, GUSTAFSON JP, SMITH JB. Variation in nuclear DNA in the genus *Secale*. *Chromosoma* (Berl) 1977; 61: 149–176.
- [7] BENNETT MD. Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shrivelling in wheat-rye genotypes. *Heredity* 1977; 39: 411–419.

- [8] BENNETT MD. Nucleotypic basis of the spatial ordering of chromosomes in eukaryotes and the implications of the order for genome evolution and phenotypic variation. [w] Genome evolution. GA Dover, RB Flavell (red) London, Academic Press 1982.
- [9] DARVEY NL, GUSTAFSON JP. Identification of rye chromosomes in wheat-rye addition lines and triticale by heterochromatin bands. *Crop Sci* 1975; **15**: 239–243.
- [10] FLAVELL RB. Molecular changes in chromosomal DNA organisation and origins of phenotypic variations. *Chromosomes Today* 1980; **7**: 42–54.
- [11] FLAVELL RB, RIMPAU J, SMITH DB. Repeated DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosoma* (Berl) 1977; **63**: 205–222.
- [12] FLAVELL RB, BEDBROOK JR, JONES J, O'BELL M, GERLACH W, DYER TA, THOMPSON RD. Molecular events in cereal genome evolution. [w] The 4th John Innes Symp. 1982: 15–30.
- [13] GIRALDEZ R, CERMENO MC, ORELLANA J. Comparison of C-banding pattern in the chromosomes of inbred lines and open pollinated varieties of rye. *Z Pflanzenzuchtung* 1979; **83**: 40–48.
- [14] GUSTAFSON JP, BENNETT MD. The effect of telomeric heterochromatin from *Secale cereale* on *Triticale* / X *Triticosecale*. I. The influence of the loss of several blocks of telomeric heterochromatin on early endosperm development and kernel characteristics at maturity. *Can Genet Cytol* 1982; **24**: 83–92.
- [15] HINGGARDNER R. Evolution of genome size. [w] Molecular Evolution Ayala FJ. (red.) 1976: 179–199.
- [16] JONES KW. Chromosomal and nuclear location of mouse satellite DNA in individual cells. *Nature* (Lond) 1970; **25**: 9–12.
- [17] JONES GH. Giemsa C-banding of rye meiotic chromosomes and the nature of "terminal chiasmata". *Chromosoma* (Berl) 1978; **66**: 45–57.
- [18] JONES JDG, FLAVELL RB. The structure, amount and chromosomal localisation of defined repeated DNA sequences in species of the genus *Secale*. *Chromosoma* (Berl) 1982a; **86**: 613–641.
- [19] JONES JDG, FLAVELL RB. The mapping of highly repeated DNA families and their relationships to C-bands in chromosomes of *Secale cereale*. *Chromosoma* (Berl) 1982b; **86**: 595–612.
- [20] KOEBNER RM, APPELS R, SHEPHERD KW. Rye heterochromatin. II. Characterisation of a derivative from chromosome 1DS/1RL with reduced amount of the major repeating sequence. *Can J Genet Cyt* 1986; **28**: 658–664.
- [21] LELLEY T, JOSIFEK K, KALTSIKES PJ. Polymorphism in the Giemsa C-banding pattern of rye chromosomes. *Can J Genet Cyt* 1978; **20**: 307–312.
- [22] MERKER A. The cytogenetic effect of heterochromatin in hexaploid triticale. *Hereditas* 1976; **83**: 215–222.
- [23] PARDUE ML, GALL JG. Chromosomal localisation of mouse satellite DNA. *Science* 1970; **168**: 1356–1358.
- [24] ROGALSKA SM. Identification of rye heterochromatin in lines of hexaploid triticale. *Gen Polon* 1977; **18**: 4: 317–324.
- [25] ROGALSKA SM. Rozmieszczenie heterochromatyny w chromosomach kilku odmian diploidalnego żyta *Secale cereale* L. *Hodowla Roślin Biul Branż* 1978; **5**: 6–10.
- [26] ROGALSKA SM. Przebieg mejozy w *Triticale* (2n=42) w zależności od rodzaju tworzonych jąderki i zawartości heterochromatyny telomerycznej w chromosomach żyta. *Roczniki Nauk Akad Roln w Poznaniu, Rozpr Nauk* 1981; **113**: 5–35.
- [27] ROGALSKA SM, KRUPKA P. Differentiation in the size of telomeric heterochromatin bands in rye chromosomes of oktoploid triticale. *Gen Pol* 1982; **23**: 9–15.
- [28] ROGALSKA SM. The influence of the amount of telomeric heterochromatin on the course of meiosis in PMCs of hexaploid triticale. *Gen Pol* 1983; **24**: 227–237.
- [29] REES H. Genotypic control of chromosome behaviour in rye. I. Inbred lines. *Heredity* 1955; **9**: 93–116.
- [30] RIMPAU J, SMITH DB, FLAVELL RB. Sequence organisation analysis of the wheat and rye genomes by interspecies DNA/DNA hybridisation. *J Mol Biol* 1978; **123**: 327–359.
- [31] SINGH RJ, ROBBELEN G. Giemsa banding technique reveals deletions within rye chromosomes in addition lines. *Z Pflanzenzuchtung* 1976; **76**: 11–18.
- [32] THOMAS JB, KALTSIKES PJ. A possible effect of heterochromatin on chromosome pairing. *Proc Nat Acad Sci USA* 1974; **71**: 2787–2790.
- [33] WEIMARCK A. Heterochromatin polymorphism in the rye karyotype as detected by the Giemsa C-banding technique. *Hereditas* 1975; **79**: 293–300.

Otrzymano: 10.12.1991 r.

Przyjęto: 08.01.1992 r.

Adres autora: 61-625 Poznań, ul. Wojska Polskiego 71c.

**UDZIAŁ KATIONÓW W TRANSDUKCJI SYGNAŁU  
W STYMULOWANYCH LIMFOCYTACH T.  
I. KATIONY METALI  
I ZMIANY POTENCJAŁU BŁONOWEGO**

**CATION PARTICIPATION AT SIGNAL TRANSDUCTION  
IN STIMULATED T LIMPHOCYTES.**

**I. METAL IONS AND TRANSMEMBRANE POTENTIAL CHANGE**

Jacek M. WITKOWSKI

Katedra i Zakład Histologii Akademii Medycznej w Gdańsku

*Streszczenie.* W pracy przedstawiono przegląd aktualnych informacji dotyczących udziału zmian stężeń kationów  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  w procesie stymulacji limfocytów T. W szczególności omówiono błonowe mechanizmy biorące udział w transporcie wymienionych jonów przez błonę komórkową, a zwłaszcza błonowe kanały jonowe. Ze względu na istotny udział  $\text{K}^+$ , a w mniejszym stopniu także  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  w tworzeniu spoczynkowego i czynnościowego potencjału błonowego tych komórek osobny rozdział poświęcono zagadnieniu roli tych potencjałów w czynnościach limfocytów T.

*Słowa kluczowe.* limfocyty T, aktywacja mitogenami  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , zmiany potencjału błonowego, kanały błonowe.

*Abstract.* A review of the current information concerning  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  cation fluxes in resting and stimulated human and animal T cells is given. Specific membrane mechanisms of cation transport, namely ion channels and some ATP - dependent ion pumps are characterized. Considering participation of  $\text{K}^+$ , and to lesser degree also  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$ , in the generation of both resting and activation-related potential of the T lymphocyte membrane, separate paragraph is devoted to description of this phenomena and their role in function of T cells.

*Keywords.* T lymphocytes, mitogen activation,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , membrane potential changes, ion channels.

## WSTĘP

Zjawiska, zachodzące w aktywowanych grasiczo-zależnych komórkach limfatycznych (limfocytach T) pomiędzy początkowym kontaktem ze stymulatorem (antygenem, mitogenną lektyną lub innym czynnikiem) a rozpoczęciem przez te komórki biosyntezy interleukin (IL2 lub IL4), określane są jako wczesny, pre-replikacyjny etap aktywacji immunologicznej [47]. Okres ten trwa, przynajmniej w najlepiej pod tym względem opisanych limfocytach T ludzi i myszy, od kilku (2–7) do kilkunastu (12–15) godzin [47, 96, 97]. W tym czasie następują procesy, których ostatecznym celem jest "wyprowadzenie" komórki ze spoczynkowej fazy  $G_0$  cyklu, charakterystycznej dla większości małych, recyrkulujących limfocytów T [47]. Ich kulminacją jest aktywacja szeregu procesów biochemicznych związanych głównie z derepresją DNA [18], biosyntezą różnych rodzajów mRNA [55] i białek [47], metabolizmem nukleotydów purynowych [4] i poliamin [64].

Wiele procesów typowych dla tego wczesnego etapu aktywacji limfocytów T to zjawiska zachodzące w błonie komórkowej lub pośrednio z nią związane. Należy tu wymienić przede wszystkim aktywację szeregu enzymów będących albo stałymi składnikami błony, albo też wymagających kontaktu z błoną dla swej aktywności. Do pierwszej grupy zaliczyć należy cyklazy: adenylanową i guanylanową [56] oraz całą grupę kinaz, których przykładem może być kinaza tyrozylowa składnika p21 receptora TcR [61]. Charakterystycznym i dość dobrze poznany składnikiem drugiej grupy jest zależna od wapnia i fosfolipidów kinaza białkowa C, która w celu uzyskania aktywności musi ulec asocjacji z lipidami błony komórkowej limfocyta [69]. Charakterystycznym zjawiskiem bezpośrednio związanym z błoną komórkową limfocytów T ulegających aktywacji jest wzrost ekspresji różnorodnych antygenów powierzchniowych, takich m.in. jak receptor dla interleukiny 2 [11], transferyny [82] i insuliny [9], a także kwas hialuronowy i siarczan chondroityny [103].

Zjawiskom tym towarzyszy lub nawet poprzedza je w sekwencji zmian zachodzących w aktywowanych komórkach T wzrost aktywności wielu mechanizmów transportujących różne substancje przez błonę komórkową. Niektórym zjawiskom tego typu oraz ich konsekwencjom dla fizjologii aktywowanej komórki T poświęcony jest niniejszy przegląd.

## WZROST TRANSPORTU KATIONÓW W STYMULOWANYCH KOMÓRKACH T

Limfocyty T, zarówno pochodzące z narządów limfatycznych różnych gatunków zwierząt doświadczalnych jak też z ludzkiej krwi obwodowej, zdolne są do aktywacji w wyniku działania sygnału fizjologicznego (antygen zaprezentowany na powierzchni komórki prezentującej antygen w kontekście odpowiedniego antygeny MHC) lub czynników нефизјологічных, takich jak mitogenne lektyny roślinne ConA, PHA i inne przeciwciała skierowane przeciwko kompleksowi receptora dla antygeny (TcR-CD3), a także niektórym tzw. "antygenom aktywacyjnym" (jonofory wapniowe, np. jonomycyna, A23187 i estry forbolu zwykle stosowane w kombinacji) czy wreszcie procedura składająca się z potraktowania komórek neuraminidazą i oksydazą galaktozy.



Odpowiedź na wszystkie wymienione wyżej czynniki charakteryzuje się występującym bardzo wczesnie wzrostem transportu (zwykle, choć nie wyłącznie, w kierunku do cytoplazmy) tak różnorodnych substancji, jak jony metali [33, 40, 50], aminokwasy [85], nukleozydy [24], poliaminy [57] i cukry [120].

Przenikanie jonów przez błonę komórkową jest składnikiem złożonego mechanizmu transdukcji sygnału aktywującego komórkę T. Natomiast pozostałe mechanizmy transportowe dostarczają aktywowanej komórce substratów dla ulegających nasileniu procesów biochemicznych i nie będą przedmiotem niniejszego omówienia.

## WAPŃ

Dotychczasowe badania przypisują wzrostowi stężenia kationów wapniowych w cytoplazmie  $[Ca^{2+}]_c$  aktywowanych limfocytów największe znaczenie fizjologiczne. Pierwsze obserwacje dotyczące zmian stężenia wapnia w komórkach limfatycznych pochodzą z połowy lat siedemdziesiątych [34, 49, 118]. W związku z tym nasza wiedza o "zachowaniu się" wapnia w limfocytach jest znacznie pełniejsza niż dotycząca innych kationów. Kationy  $Ca^{2+}$  są uniwersalnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnału i induktorem wczesnych procesów aktywacyjnych w limfocytach T (patrz niżej). Pomiar zmian  $[Ca^{2+}]_c$  w małych komórkach, jakimi są limfocyty, stał się możliwy dopiero stosunkowo niedawno, wraz z wprowadzeniem do użytku barwników fluorescencyjnych wrażliwych na stężenie wapnia w ich otoczeniu, takich jak QUIN 2, FURA 2, INDO 2 i FLUO 3 [40]. Związki te różnią się głównie długością fali (barwą) oraz intensywnością fluorescencji emitowanej w obecności  $Ca^{2+}$ , długością fali światła absorbowanego (pobudzającego) oraz stałą dysocjacji ich kompleksów z wapniem. Powoduje to, że niektóre z nich (QUIN 2, FURA 2) stosowane są raczej w technikach mikroskopii fluorescencyjnej (ostatnio także do ilościowej oceny zmian  $[Ca^{2+}]_c$  w pojedynczych komórkach z zastosowaniem cyfrowej analizy obrazu [34, 40], a pozostałe w cytofotometrii przepływowej.

Omawiając wielkości dotyczące stężeń metali w żywych komórkach należy pamiętać, że mamy tu do czynienia z trzema różnymi parametrami. Są to: całkowita zawartość danego pierwiastka w komórce (mierzona precyzyjnie przy pomocy spektrometrii absorpcji atomowej), całkowita pula wymiennalna tego pierwiastka (ang. *total exchangeable amount*), do którego oceny używa się zwykle radioaktywnego izotopu tego samego metalu, oraz zawartość (stężenie, aktywność) wolnych jonów badanego metalu w cytoplazmie, oznaczane zwykle jako  $[Me^{n+}]_c$  (gdzie Me zastępowane jest symbolem pierwiastka, a *n* oznacza wartościowość jonu) [34, 76, 111]. Ta ostatnia wielkość jest istotna fizjologicznie jako parametr ulegający szybkim, dynamicznym zmianom w odpowiedzi na pobudzenie [34, 40, 111].

W cytoplazmie nie pobudzonych limfocytów T  $[Ca^{2+}]_c$  jest bardzo niskie i wynosi ok. 130 nM [95, 119]. W aktywowanych komórkach stężenie to gwałtownie rośnie, osiągając wartości 500 – 600 nM [95, 118]. Tak wysokie  $[Ca^{2+}]_c$  obserwowano już po 30 sekundach od stymulacji receptora dla antygeny (TcR-CD3) odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym [121]. Równie szybki jest wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  w odpowiedzi na kontakt limfocytów T z lektynami: konkanawaliną A (Con A) i fitohemaglutyniną (PHA) [118, 119]. W przypadku stymulacji lektynami, wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  dotyczy prawie wyłącznie populacji naiwnych (ang. *naive, virgin*) limfocytów T o fenotypie  $CD45RA^+$  (u człowieka; u myszy odpowiada mu  $CD45RB^+$ ) podobnie komórki pamięci immunologicznej o fenotypie  $CD45RO^+$  odpowiadają wzrostem

cytoplazmatycznego stężenia wapnia na stymulację swoistym dla nich antygenem [2, 91, 92]. Natomiast praktycznie wszystkie ( $CD3^+$ ) limfocyty T generują "sygnał wapniowy" w odpowiedzi na działanie przeciwciała anti- $CD3$  [95].

Również *cross-linking* niektórych tzw. antygenów aktywacyjnych limfocytów T prowadzi do wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$ . Do antygenów tych należą między innymi:  $CD2$  [122],  $CD4$ ,  $CD5$ ,  $CD6$ ,  $CD7$ ,  $CD8$  i  $CD28$  [70, 71, 122]. Komórki te reagują wzrostem  $[Ca^{2+}]_c$  także na insulinę, a także na pobudzenie receptorów dla tego hormonu znajdujących się w ich błonach [9].

Stwierdzono, że wczesny wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  w limfocytach T jest dwufazowy i składa się z bardzo szybkiego (1–2 minuty) "szczytu" i trwającego dłużej *plateau* charakteryzującego się wartościami  $[Ca^{2+}]_c$  pośrednimi między wartością maksymalną a stężeniem spoczynkowym [33, 49, 95, 111]. W związku z tym wykazano, że kationy wapniowe pojawiające się w cytoplazmie stymulowanych limfocytów T pochodzą z dwu źródeł (podobnie jak w przypadku innych komórek). I tak, część  $[Ca^{2+}]_c$  ulega mobilizacji z "magazynów" wewnątrzkomórkowych. W przypadku fizjologicznego pobudzenia limfocytów T, magazyn ten stanowi siateczka śródplazmatyczna [45, 51]. Mitochondria, które również są zdolne do gromadzenia wapnia, mają tu mniejsze znaczenie, raczej jako bufor przeciwdziałający nadmiernemu wzrostowi  $[Ca^{2+}]_c$ ; gromadzenie wapnia zaczyna się w nich, gdy jego stężenie w cytoplazmie limfocytu przekroczy  $1 \mu M$ , co w przypadku fizjologicznej odpowiedzi zdarza się rzadko [45].

Stwierdzono, że uwalnianie kationów wapniowych z cystern siateczki indukowane jest przez produkty metabolizmu fosfatydylo-inozytolu zawartego w błonach pobudzonych komórek (przede wszystkim, chociaż nie wyłącznie, trifosforan inozytolu –  $IP_3$ ), powstające dzięki wczesnej aktywacji błonowej fosfolipazy C [45, 74, 117].  $IP_3$ , a także inne polifosforany inozytolu można wykryć w mysich limfocytach T stymulowanych Con A już po kilkunastu sekundach kontaktu z mitogenem [74]. Wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  zależny od otwarcia kanałów wapniowych w cysternach siateczki pod działaniem  $IP_3$  ma być szybki, ale stosunkowo krótkotrwały (prawdopodobnie ze względu na niewielką pojemność siateczki limfocytów T dla wapnia) i jest odpowiedzialny za pierwszą, "szczytową" fazę sygnału wapniowego [51, 111]. Natomiast podtrzymanie stosunkowo wysokiego  $[Ca^{2+}]_c$ , które, jak się uważa, jest niezbędne dla prawidłowego przebiegu dalszych faz odpowiedzi komórki na pobudzenie, zależy od napływu  $Ca^{2+}$  ze środowiska pozakomórkowego [51, 60]. W tej fazie można wyróżnić dwa kolejne (niższe od pierwszego) szczyty wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$ : pomiędzy 4 a 6 i pomiędzy 20 a 24 godziną stymulacji, co ma odpowiadać kolejno wyjściu komórki z fazy  $G_0$  i  $G_2$  cyklu komórkowego [60, 81].

Wapń przenika ze środowiska do cytoplazmy limfocytów T dzięki obecności w ich błonach komórkowych odpowiednich białek kanałowych, przewodzących kationy  $Ca^{2+}$  zgodnie z gradientem stężeń, a więc do wnętrza komórki. Badania elektrofizjologiczne wykonane przy pomocy techniki "potencjału stabilizowanego łutki błony" (ang. *voltage patch clamp* [48]) nie wykazały jednak obecności w limfocytach T typowych kanałów wapniowych spotykanych np. w tkance mięśniowej czy gruczołowej [66, 67]. Opisywane są natomiast kanały błonowe przewodzące nieswoiście różne rodzaje kationów dwuwartościowych (w tym  $Ca^{2+}$  i  $Mg^{2+}$ ), które w warunkach fizjologicznych stężeń tych jonów powinny przewodzić głównie wapń [66]. Podobnie jak w przypadku innych białek kanałowych, charakteryzowanych w limfocytach T metodą "potencjału stabilizowanego łutki" (patrz niżej), ilość kanałów przewodzących wapń oceniana jest na 100–1000 cząsteczek w błonie pojedynczej, nie pobudzonej komórki T [67]. Przynajmniej niektóre z tych kanałów ulegają otwarciu pod

wpływem IP3 i innych polifosforanów inozytoli, podobnie jak kanały wapniowe w siateczce śródplazmatycznej; mają one natomiast słabo odpowiadać na zmiany potencjału błonowego, a także być niewrażliwe na ligandy zewnątrzkomórkowe [67]. Postulowana jest także możliwość, że wapń dostaje się do cytoplazmy stymulowanych limfocytów T poprzez jeszcze bardziej nieselektywny, "uniwersalny" typ kanałów przewodzących także kationy potasowe i – prawdopodobnie – sodowe (patrz niżej) [10, 12, 20, 128].

Podobnie jak w innych komórkach, wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  w limfocytach T musi podlegać precyzyjnemu ograniczeniu zarówno jego wielkości, jak też czasu trwania ze względu na toksyczny w stosunku do metabolizmu tych komórek wpływ długotrwałego, wysokiego  $[Ca^{2+}]_c$ . Takie nadmierne podwyższenie stężenia kationów wapniowych w cytoplazmie stymulowanych limfocytów T może nastąpić w wyniku działania zbyt wysokich (supramitogennych) dawek jonoforów wapniowych lub lektyn Con A i PHA, a także przedłużonej, niefizjologicznej modulacji receptora CD3 przy użyciu skierowanego przeciwko niemu przeciwciała [19]. Także w procesie niszczenia wrażliwych tymocytów przez glikokortykosterydy dominujący letalny efekt zależy od nadmiernej aktywacji endogennej nukleazy przez trwale podwyższone  $[Ca^{2+}]_c$ ; prowadzi to do typowego, gwałtownego niszczenia struktury chromatyny uszkodzonych komórek i obrazu tzw. "programowanej śmierci", czyli apoptozy [84].

Istnieją trzy mechanizmy kontrolujące lub ograniczające niebezpieczeństwo nadmiernego wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$ . Pierwszym z nich, integralnie związanym z rolą  $Ca^{2+}$  jako przekaźnika sygnału i induktora zachodzących w procesie aktywacji limfocytów T reakcji metabolicznych jest wiązanie kationów wapniowych ze specyficznymi białkami o wysokim powinowactwie do  $Ca^{2+}$ . Do tej grupy nie w pełni scharakteryzowanych białek występujących w cytoplazmie limfocytów T należą białka tak znane, jak kalmodulina, która w formie kompleksu z wapniem jest induktorem wielu kinaz limfocytarnych [43, 78], a także mniej znane, dopiero niedawno wykryte i opisane w limfocytach T – kalpaktyna I (p33) i endoneksyna (p28) [62]. Kationy  $Ca^{2+}$  są także niezbędne dla aktywacji kinazy białkowej C, która jest istotną, stałą częścią procesu odpowiedzi limfocytów T na pobudzenie [62, 69].

Mechanizmami bezpośrednio przeciwdziałającymi nadmiernemu wzrostowi  $[Ca^{2+}]_c$  są "pompy wapniowe" – enzymy, które wykorzystują energię hydrolizy ATP do transportu  $Ca^{2+}$  poza komórkę lub do wnętrza siateczki śródplazmatycznej [52, 77, 111]. Wykazano, że pompa wapniowa zawarta w cysternach siateczki limfocytów T ma odmienne właściwości biochemiczne (kinetykę reakcji, wrażliwość na inhibitory) niż enzym występujący w błonie powierzchniowej [52, 77, 111]. Dotychczas (grudzień 1991) nie opublikowano danych określających, czy mamy tu do czynienia z izoenzymami tego samego enzymu, czy też z kompletnie odmiennymi strukturami.

Ostatnim czynnikiem regulacyjnym, ograniczającym zwłaszcza napływ  $Ca^{2+}$  ze środowiska, są szczególne właściwości przenoszących wapń kanałów białkowych w błonach limfocytów T. Jak wcześniej wspomniano, nie są to typowe kanały wapniowe, podobne do znajdujących w innych tkankach, a raczej nieselektywne kanały dla kationów dwuwartościowych. Wykazano, że są one w specyficzny sposób regulowane przez zmiany potencjału błony komórkowej stymulowanego limfocytu T. I tak, w odpowiedzi na depolaryzację tylko nieznacznie zwiększa się prawdopodobieństwo stanu otwartego, natomiast hiperpolaryzacja komórki prowadzi do istotnego wzrostu prawdopodobieństwa zamknięcia i inaktywacji tych kanałów [36, 66, 67].

W pierwszym okresie badań tego zagadnienia opisywano także w limfocytach T aktywność antyportu ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ ), który miał również pełnić rolę regulatora  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  [37, 38]. Najnowsze badania wskazują jednak, że to, co brano za aktywność takiego wymiennika, da się wyjaśnić samym działaniem "pomp wapniowych" oraz następującą w tym samym czasie aktywnością wymiennika ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) [40, 52, 111].

$[\text{Ca}^{2+}]_c$  w limfocytach T może być także regulowane w sposób pośredni. Rosoff i wsp. wykazali na przykład, że wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  indukowany przez modulację receptora CD3 jest hamowany przez obniżone stężenie jonu chlorkowego ( $\text{Cl}^-$ ) w środowisku pozakomórkowym [101]. Efekt ten może zależeć od hiperpolaryzacji błony komórkowej limfocyta powstającej w wyniku nie wyrównanego obniżenia stężenia chlorków na zewnątrz komórki; możliwe także, że bierze w nim udział aktywność stosunkowo niedawno opisanych w ludzkich i mysich limfocytach T kanałów chlorkowych [101].

Równoległe z poznaniem zjawisk, których konsekwencją jest przejściowy wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  w cytoplazmie limfocytów T, poszerzeniu ulega wiedza o kluczowej roli  $\text{Ca}^{2+}$  w coraz większej liczbie procesów zachodzących w aktywowanych komórkach T. Wiele wniosło do tej wiedzy zastosowanie jonoforów wapniowych – lipofilowych antybiotyków zdolnych do przenoszenia  $\text{Ca}^{2+}$  przez błony komórkowe *Eucaryota*: A23187 (kalcymycyny) i jonomycyny. Wykazano, że obydwa jonofory, stosowane w submikromolarnych stężeniach stymulują podziały komórkowe ludzkich i mysich limfocytów T; efekt ten jest znacznie nasilony przez równoczesną stymulację estrami forbolu. Należy tu podkreślić, że ta sama kombinacja czynników jest mitogenna dla limfocytów B; komórki te nie dzielą się natomiast w odpowiedzi na wyłączone stosowanie jonoforów, niezależnie od dawki [13, 31]. Już wczesne badania z użyciem A23187 wykazały, że stymulujący efekt tej substancji polega na zwiększeniu  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  w komórkach poddanych jej działaniu poprzez wprowadzenie wapnia ze środowiska otaczającego komórkę, a więc na naśladowaniu naturalnego procesu towarzyszącego, a właściwie warunkującego odpowiedź immunologiczną komórek T [34, 76]. Pod działaniem mitogennych dawek jonoforów wapniowych dochodzi do zwiększenia płynności błony komórkowej limfocytów T – zjawisko to jest także charakterystyczne dla transformacji blastycznej tych komórek w odpowiedzi na antygeny i mitogeny roślinne, a wynika prawdopodobnie z nasilenia zależnego (częściowo) od wapnia procesu fosforylacji składników błony oraz zmienionych relacji pomiędzy integralnymi białkami błony a związanym z nią cytoszkieletem komórki [31]. Jonofory wapniowe indukują reaktywność ludzkich limfocytów T wobec IL2 poprzez stymulację ekspresji powierzchniowych receptorów dla tej interleukiny; nie powodują natomiast wzrostu syntezy IL2 w limfocytach poddanych ich działaniu [13]. To ostatnie zjawisko zachodzi dopiero, gdy równoległe ze sztucznie wywołanym wzrostem  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  w limfocytach T dojdzie do pobudzenia aktywności kinazy białkowej C, co następuje pod wpływem użycia estrów forbolu [54, 58]. Co ciekawe, pomiędzy  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  a liczbą cząsteczek receptora TcR w błonie komórkowej wydaje się istnieć coś w rodzaju ujemnego sprzężenia zwrotnego: wzrostowi  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  towarzyszy zmniejszenie ilości cząsteczek mRNA dla łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  TcR [80]. Stwierdzono także, że wysokie (1–10  $\mu\text{M}$ ) stężenie A23187 powoduje rozpoczęcie produkcji gamma-interferonu przez ludzkie limfocyty T [3, 23]. Indukowany Con A lub jonomycyną wzrost  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  powoduje aktywację kinaz białkowych zależnych od kalmoduliny [34]. Towarzyszy temu, prawdopodobnie również bezpośrednio zależne od wapnia, nasilenie transportu leucyny i być może innych aminokwasów do cytoplazmy [87]. Wreszcie, wzrostowi cytoplazmatycznego stężenia kationów wapniowych w limfocytach T towarzyszy gwałtowna i radykalna zmiana potencjału

błonowego tych komórek – przejście (w ciągu kilku minut) od stanu względnej depolaryzacji do hiperpolaryzacji (patrz niżej). Wydaje się więc, że wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  w limfocytach T jest istotny, zanim komórka rozpocznie biosyntezę IL2; wapń nie jest natomiast prawdopodobnie przekaźnikiem sygnału w komórkach odpowiadających na IL2, a więc znajdujących się już w późnej fazie  $G_1$  cyklu komórkowego [63, 68]. O tym, że późny wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  w stymulowanych mitogenami ludzkich limfocytach T jest niezbędny dla ich prawidłowej proliferacji świadczą doniesienia mówiące o jej zahamowaniu (mierzonego zmniejszeniem wbudowywania  $^3H$ -tymidyny) pod wpływem blokerów kanałów wapniowych: werapamilu, nifedypiny i diltiazemu [14, 34, 78]. Własne badania autora wskazują, że efekt ten występuje w ludzkich komórkach T nie tylko *in vitro*, ale także gdy werapamil jest stosowany klinicznie, a limfocyty, których proliferacja w odpowiedzi na mitogeny jest oceniana, pochodzą od leczonych nim pacjentów [131, 132].

Jak wspomniano wyżej, kontakt receptora dla antygeny (kompleksu TcR-CD3) z odpowiednim antygenem lub przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko epitopom tego kompleksu jest wystarczającym warunkiem wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$  w limfocytach T [51]. Wykazano, że transdukcja sygnału stymulującego z receptora dla antygeny do wnętrza komórki poprzez wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  następuje u myszy już w niedojrzałych funkcjonalnie limfocytach T i tymocytach, chociaż wielkość sygnału jest mniejsza niż w komórkach dojrzałych [30]. Proponowanym wyjaśnieniem tej obserwacji jest mniejsza gęstość przewodzących wapń kanałów w błonach niedojrzałych komórek lub niepełne wykształcenie aktywności kinazy pośredniczącej pomiędzy kompleksem receptorowym a białkiem kanałowym [30]. Osobnym i jak dotychczas mało poznanym zagadnieniem jest tu różnica w dynamice generowania "sygnału wapniowego" pomiędzy "naiwnymi" limfocytami T a komórkami pamięci immunologicznej. Wydaje się jednak, że optymalna wielkość tego sygnału w poszczególnych komórkach obu typów jest podobna, a tylko (jak już wspomniano) różnią się one zdolnością do odpowiedzi na z jednej strony swoiste antygeny, z drugiej zaś na nieswoiste stymulatory, takie jak przeciwciało anti-CD3 i mitogeny roślinne [2, 91, 92].

## SÓD

Pierwsze doniesienia o możliwości udziału przemieszczeń kationów  $Na^+$  przez błonę komórkową w procesie aktywacji limfocytów wiązały się z obserwacją znacznego wzrostu aktywności błonowej (Na, K)ATP-azy ("pompy sodowej") w komórkach T stymulowanych mitogenami, a także zahamowania postępu aktywacji, o ile limfocyty te poddano działaniu glikozydu nasercowego ouabainy (strofantyny G), blokującego aktywność (Na, K)ATP-azy [25, 94, 114]. Ouabaina ma wywierać hamujący wpływ na proliferację limfocytów T poprzez zablokowanie ekspresji receptora dla IL2 na powierzchni stymulowanych komórek [25]. W badaniach wykonanych z zastosowaniem trytowanej ouabainy wykazano, że na powierzchni ludzkich limfocytów T znajduje się przeciętnie 10–20 tysięcy cząsteczek tego enzymu [88]. Aktywacja "pompy sodowej" w aktywowanych mitogenami limfocytach T zależy od obserwowanego w ciągu pierwszych kilkunastu godzin stymulacji wzrostu  $[Na^+]_c$  w cytoplazmie, a także od towarzyszącej utraty  $K^+$  [110].

Spoczynkowe  $[Na^+]_c$  w limfocytach T pochodzących od ludzi, myszy i innych zwierząt doświadczalnych waha się w dość szerokich granicach 10–35 mM [110, 111, 112]. Stężenie to roślinie do dalsze 5–10 mM w wyniku stymulacji komórek przez PHA i Con A, przy czym okres podwyższonego  $[Na^+]_c$  w stymulowanych limfocytach T ma trwać od kilku minut [110]

do 5 godzin [112]. Możliwe zresztą, że podobnie jak w przypadku wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$ , także zależny od stymulacji wzrost  $[Na^+]_c$  jest dwufazowy (patrz niżej).

Jony sodowe napływają do cytoplazmy aktywowanych limfocytów T kilkoma drogami o różnych właściwościach, dynamice transportu i znaczeniu fizjologicznym. Pierwsza z nich polega na – znanym z komórek "pobudliwych", tj. nerwowych i mięśniowych – napływie  $Na^+$  do cytoplazmy przez białkowe kanały błonowe. Typowe (podobnie do wykrytych we wspomnianych wyżej typach komórek) kanały sodowe wykryto metodą "potencjału stabilizowanego łatki błonowej" jednak tylko na powierzchni mniej niż 10% limfocytów T myszy i w poniżej 5% ludzkich komórek T [12, 20, 72]. Ukazało się zresztą doniesienie, które obecność tego typu kanałów błonowych ogranicza do populacji komórek naturalnie cytotoksycznych NK [79]. Również badania wpływu swoistych blokerów kanałów sodowych – tetrodotoksyny (TTX) i saksitoksyny (STX) na proliferację stymulowanych mitogenami limfocytów T ludzi i myszy nie dały jak dotychczas jednoznacznych wyników, przy czym na ogół uważa się, że TTX nie wywiera istotnego działania hamującego proliferację komórek T, co ma świadczyć o braku w nich ważnych czynnościowo kanałów sodowych [21]. Z kolei obserwacja, że aktywator kanału sodowego *breylium tosylate* powoduje wzrost potencjału błonowego uprzednio zdepolaryzowanych ludzkich, mysich i szczurzych limfocytów T oraz że efekt ten występuje jedynie w środowisku zawierającym  $Na^+$  i jest znoszony przez TTX, wydaje się świadczyć na rzecz tezy o powszechnym występowaniu przewodzących sód kanałów w limfocytach T [93]. Nie jest jednak wykluczone, że  $Na^+$  penetruje do cytoplazmy stymulowanych limfocytów T przez nieswoiste, aktywowane  $Ca^{2+}$  kanały błonowe, konkurując z opuszczającymi tą drogą komórki jonami  $K^+$  (patrz niżej). Własne badania autora niniejszej pracy wskazują, że działanie STX wobec ludzkich limfocytów T stymulowanych Con A może być dwukierunkowe: synergistyczne z mitogenem przy stosunkowo niskim stężeniu STX, zaś antagonistyczne w przypadku wyższego stężenia tego blokera [131].

Selektywny napływ kationów sodowych do cytoplazmy poprzez przewodzące je kanały w błonach stymulowanych limfocytów T powinien powodować zauważalną (jakkolwiek krótkotrwałą) depolaryzację tych komórek. Większość autorów, którzy dotychczas zajmowali się zmianami potencjału błonowego w trakcie aktywacji limfocytów T, nie obserwowała jednak wyraźnej depolaryzacji w żadnym ze stadiów aktywacji (patrz rozdział poświęcony zmianom potencjału błonowego w stymulowanych limfocytach T).

Dobrze udokumentowane jest istnienie i czynność w trakcie aktywacji limfocytów T błonowego wymiennika sodowo-protonowego ( $Na^+/H^+$ ) [33, 37, 40, 112]. Ze względu na podstawową czynność tego wymiennika, jaką jest przeciwdziałanie nadmiernemu zakwaszeniu cytoplazmy aktywowanej komórki, szerszy opis jego właściwości znajdzie Czytelnik w towarzyszącym artykule poświęconym roli  $H^+$  i zmian pH w trakcie aktywacji limfocytów T.

Oprócz antyportu  $Na^+/H^+$  w limfocytach T wykazano także istnienie niewrażliwego na amilorid i  $Li^+$  wymiennika  $Na^+/Na^+$ , blokowanego przez kwas etakrynowy, a więc analogicznego do wykrytego w komórkach mięśniowych [37, 38]. Wymiennik ten ma współdziałać z systemami kotransportu typu  $Na^+$ /związki organiczne [40]. Nowe badania nie potwierdziły natomiast postulowanego wcześniej istnienia w limfocytach T ludzi i zwierząt kotransportera  $Na^+/K^+/Cl^-$  ani antyportu  $Na^+/Ca^{2+}$  [37, 38, 40].

Badania, w których farmakologicznie modyfikowane jest działanie struktur błonowych transportujących  $Na^+$  do cytoplazmy komórki T, dają zróżnicowane wyniki w zależności od

"punktu uchwytu" zastosowanego modulatora. Ogólnie wydają się one wskazywać na niezbędność wzrostu  $[Na^+]_c$  dla prawidłowej aktywacji limfocytów T. Taka interpretacja może być jednak błędna lub przynajmniej niepełna; należy bowiem uwzględnić fakt, że w większości związanych z przewodzeniem sodu transporterów błonowych w limfocytach T (a być może nawet we wszystkich, o ile komórki te mają być pozbawione kanałów sodowych) transport  $Na^+$  jest "partnerem" transportu innych jonów lub metabolitów. Dotyczy to opisanego wyżej wymiennika ( $Na^+/H^+$ ), a także przynajmniej jednego z mechanizmów wprowadzających aminokwasy do cytoplazmy stymulowanych limfocytów – tzw. systemu A, będącego kotransporterem  $Na^+$ /aminokwas [5]. W związku z tym, chociaż sód, a konkretnie gradient jego stężenia przez błonę komórkową jest niezbędny jako "napęd" tych procesów, kationy  $Na^+$  per se uważane są za nie biorące czynnego udziału w procesach metabolicznych w takim sensie, jak opisany wyżej w przypadku  $Ca^{2+}$ . Jednak, wyniki badań grupy Severiniego wskazują, że aktywacja procesów naprawy uszkodzeń (pęknięć) DNA, która poprzedza jego replikację w stymulowanych limfocytach T, wymaga obecności podwyższonego stężenia  $Na^+$ , którego nie można zastąpić innym kationem alkalicznym [112]. Ci sami autorzy wykazali także, że wzrost  $[Na^+]_c$  jest bezpośrednim induktorem wzrostu stężenia  $NAD^+$  w stymulowanych lektynami limfocytach T [112].

#### POTAS

Podobnie jak w przypadku sodu, najwcześniejsze sugestie na temat roli zmian stężenia kationów potasowych  $[K^+]_c$  w procesie aktywacji limfocytów T wiążą się z obserwacjami nasilonej aktywności (Na,K)ATP-azy w komórkach stymulowanych mitogenami PHA i Con A, z czym wiązano zwiększony napływ  $K^+$  do cytoplazmy tych komórek [25, 94, 114]. (Na,K)ATP-aza wykazuje dużą aktywność także w ludzkich komórkach T znajdujących się w spoczynku; jest to prawdopodobnie związane z koniecznością przeciwdziałania obniżeniu spoczynkowego  $[K^+]_c$  związanemu ze stałą, spontaniczną aktywnością niektórych kanałów błonowych dla tych jonów (patrz niżej) [126]. Badania autora, wykonane z użyciem izotopu rubidu  $^{186}Rb$  (który jest wygodniejszym w manipulacji doświadczalnej analogiem potasu) wykazały, że spoczynkowa aktywność "pompy sodowej" w ludzkich limfocytach krwi obwodowej jest odpowiedzialna tylko za 70–80% całkowitego napływu  $K^+$  do komórki [126]. Przemawia to za współistnieniem (przynajmniej w ludzkich limfocytach T) innego mechanizmu transportującego kationy  $K^+$  do cytoplazmy. Mechanizmem tym mógłby być kotransport  $Na^+/K^+/2Cl^-$  opisywany w innych komórkach, jednak jak dotychczas nie wykazano jego obecności w błonach limfocytów ludzkich; natomiast w limfocytach T myszy zastosowanie odpowiednich swoistych blokerów tego transportu pozwoliło wykazać jego nieobecność [40].

Wartości bezwzględne zarówno spoczynkowego, jak też zmienionego przez aktywację  $[K^+]_c$  w limfocytach badano głównie metodą radioizotopową z użyciem izotopu potasu  $^{42}K$  oraz metodą fotometrii płomieniowej. Badania te wykazały, że spoczynkowe stężenie potasu w cytoplazmie limfocytów T wynosi 125–150 mM (średnio ok. 140 mM) [53, 89, 108, 109, 110]. Według większości z cytowanych tutaj badaczy potas występuje w cytoplazmie limfocytów głównie w formie zjonizowanej  $K^+$ . W późniejszym opracowaniu Negendank twierdzi jednak, że duża część wewnątrzkomórkowego potasu w limfocytach jest zaadsorbowana (głównie na grupach karboksylowych polipeptydów), co ma w pewnym stopniu utrudniać jego wymianę ze środowiskiem i obniżać efektywne  $[K^+]_c$  [90].

Pomimo stwierdzonego, prawie dwukrotnego wzrostu szybkości napływu  $K^+$  do cytoplazmy limfocytów T stymulowanych PHA (z 20 na 38 milimoli na litr wody komórkowej i na godz. [108]),  $[K^+]_c$  wydaje się nie ulegać zmianie, co sugeruje równoczesne, znaczne nasilenie odpływu  $K^+$  z cytoplazmy do środowiska [108, 109, 110]. Badania zmian potencjału błonowego stymulowanych mitogenami komórek T wskazują jednak, że przynajmniej w początkowym okresie odpowiedzi na pobudzenie wypływ  $K^+$  z cytoplazmy nie jest równoważony jego napływem ani też napływem wystarczającej ilości innych kationów, co prowadzi do dającej się zaobserwować przejściowej hiperpolaryzacji stymulowanych komórek [125, 130].

Zastosowanie metody "potencjału stabilizowanego łatki" (*voltage patch clamp*) pozwoliło w drugiej połowie lat osiemdziesiątych na stwierdzenie, że utrata  $K^+$  przez stymulowane limfocyty T następuje poprzez białkowe kanały jonowe o zróżnicowanych właściwościach oraz na dość dokładną charakterystykę tych kanałów. I tak wykazano, że  $K^+$  wywędrowuje z cytoplazmy komórek T do środowiska przez aż trzy typy specyficznych dla tego kationu kanałów potencjałowo-zależnych, określane symbolami  $n$ ,  $n'$  i  $l$  [75]. Kanały te są dość podobne pod względem przewodności (odpowiednio 18, 17 i 27 pS), natomiast różnią się wrażliwością na inhibitory (blokery). Na przykład, w mysich limfocytach T kanały typu  $n'$  są 10-krotnie mniej wrażliwe na tetraetyloamonium (TEA) niż kanały typu  $n$  i 1000-krotnie mniej wrażliwe niż kanały typu  $l$  [75]. Trzeba w tym miejscu dodać, że potencjałowo-zależne kanały potasowe obecne w limfocytach T ulegają zablokowaniu także przez 4-aminopirydynę (4-AP), chininę, chinidynę, jony  $La^{+3}$ ,  $Ni^{+2}$  i  $Cd^{+2}$ , ale nie wykryto zróżnicowania wrażliwości różnych typów tych kanałów na cytowane blokery [12, 20, 21].

Ilość kanałów potasowych jednego typu w błonie pojedynczego, znajdującego się w stanie spoczynku limfocytu T jest skrajnie niska, zwłaszcza w porównaniu z komórkami pobudliwymi. Na przykład ilość kanałów typu  $n$  w błonie spoczynkowego ludzkiego lub mysiego limfocytu T oceniana jest na 30–40, czyli ok.  $0.3/\mu m^2$  powierzchni błony [12, 75]. Inne badania tych samych autorów wskazują zresztą na jeszcze 2–3-krotnie mniejsze ilości potencjałowo-zależnych kanałów potasowych w nie stymulowanych komórkach [20]. Znajomość tych wielkości ma duże znaczenie dla zrozumienia roli przepływu  $K^+$  przez błonę dla czynności komórki limfatycznej; należy sobie uprzytomnić, że utrata czy też – przeciwnie – dodatkowa ekspresja tylko kilku cząsteczek białka kanałowego może prowadzić do zmian przepływu  $K^+$  sięgających kilkudziesięciu procent normalnej, spoczynkowej wartości!

Potencjałowo-zależne kanały potasowe występują powszechnie, we wszystkich limfocytach T ludzi i doświadczalnych gryzoni, a także na powierzchni komórek wielu transformowanych linii wywodzących się z limfocytów T. Stwierdzono jednak, że u myszy kanały typu  $n$  przeważają w błonach limfocytów o fenotypie  $CD4^+$  (*helper/inducer*), podczas gdy kanały typów  $n'$  i  $l$  są charakterystyczne dla cytotoksycznych komórek T ( $CD8^+$ ) [75].

Kanały potasowe pojawiają się i są aktywne w ludzkich i mysich limfocytach T i ich prekursorach już we wczesnych, śródgrasiczych stadiach rozwojowych. Jak wykazano, niedojrzałe komórki o fenotypie  $CD4^+CD8^-$  charakteryzują się dość dużą (proporcjonalnie) ilością kanałów typu  $n$  (ok. 100/komórkę), która dalej rośnie do ok. 300/komórkę w tymocytach o fenotypie  $CD4^+CD8^+$ , ginących w obrębie grasicy [105]. Natomiast w dojrzewających funkcjonalnie komórkach o "obwodowych" fenotypach  $CD4^+$  i  $CD8^+$  następuje radykalna redukcja ilości cząsteczek białka kanałowego w błonie do cytowanych wyżej wartości rzędu odpowiednio 20 i poniżej 10 kanałów  $n$  [75]. W dojrziałych limfocytach  $CD8^+$  pojawia się także 10–20/komórkę kanałów potasowych należących do typów  $n'$  i  $l$



[105]. Dla porównania, ilość kanałów potasowych w komórkach z ustalonych linii T-limfocytarnych zarówno ludzkiego, jak i mysiego pochodzenia jest wielokrotnie wyższa, osiągając wartości rzędu 1000 kanałów jednego typu na powierzchni pojedynczej komórki, czyli odpowiadające wielkościom obserwowanym w intensywnie proliferujących komórkach T [20].

Aktywność (podwyższone prawdopodobieństwo otwarcia) kanałów potasowych zależnych od potencjału jest niezbędna dla prawidłowej aktywacji i proliferacji limfocytów T. Wykazano to obserwując zahamowanie proliferacji tych komórek pod wpływem swoistych blokerów omawianego typu kanałów: 4-AP, TEA i chinidyny [12, 20, 46]. Stwierdzono, że substancje te nie hamują wzrostu ekspresji receptora dla IL2 w ludzkich komórkach T stymulowanych PHA, co sugeruje, że wzrost ten nie zależy od działania kanałów potasowych [46]. Ich zablokowanie prowadzi natomiast do obniżenia syntezy RNA, białek (w tym IL2) i DNA w limfocytach T myszy stymulowanych Con A [12, 111].

Wpływ  $K^+$  z limfocytów T myszy i ludzi można uzyskać *in vitro* także działając na te komórki jonoforami wapniowymi (A23187 lub jonomycyną) w środowisku zawierającym jony  $Ca^{2+}$ , przy czym eliminacja wapnia ze środowiska znosi ten efekt [100, 125, 127]. Pod działaniem tych jonoforów (w mitogennych stężeniach) dochodzi także do selektywnej, silnej hiperpolaryzacji limfocytów T (podczas gdy limfocyty B odpowiadają na jonofory wapniowe niewielkiego stopnia depolaryzacja) [44, 125, 129]. Obserwacje te przemawiają za istnieniem w limfocytach T czwartego typu kanałów potasowych – regulowanego przez  $[Ca^{2+}]_i$ . Jego obecność potwierdzają także obserwacje depolaryzacji (lub przynajmniej uniemożliwienia hiperpolaryzacji) limfocytów poddanych działaniu chininy, charybdotoksyny i 3,3'-dipropyltio-dikarboksycyaniny, uważanych za względnie swoiste blokery  $Ca^{2+}$ -zależnych kanałów  $K^+$  w innych typach komórek [39, 100]. Własne badania autora tej pracy pozwoliły na ustalenie, że w mysich limfocytach T zależny od  $Ca^{2+}$ , indukowany jonomycyną i A23187 wpływ  $K^+$  jest częściowo blokowany także przez TEA, 4-AP, a ponadto przez bloker kanału wapniowego werapamil i wreszcie całkowicie przez bloker kanału sodowego – saksitoksynę [127]. Co ciekawe, weratrydyna, znana jako czynnik pobudzający aktywność kanałów sodowych (a dokładnie blokujący je w otwartym stanie) zwiększała  $Ca^{2+}$ -zależny wpływ  $K^+$  z mysich komórek T [127]. Różna kinetyka zależnego od wapnia wypływu  $K^+$  z mysich limfocytów T poddanych działaniu wymienionych blokerów może świadczyć o istnieniu więcej niż jednego typu  $Ca^{2+}$ -zależnych kanałów  $K^+$  w błonach mysich limfocytów T, być może występujących selektywnie na ich fenotypowo różnych subpopulacjach, podobnie jak potencjałowo-zależne kanały potasowe *n*, *n'* i *l*. Potwierdzeniem istnienia w limfocytach T  $Ca^{2+}$ -zależnych kanałów  $K^+$  o różnych właściwościach mogą być opublikowane dane o ich konduktancji (przewodności), uzyskane przy pomocy metody "potencjału stabilizowanego łątki błonowej". Trzy zespoły badawcze, które dotychczas zajmowały się tym zagadnieniem, podają wartości 8 [107], 25 [41] i powyżej 90 pikosiemensów [83] jako charakterystyczne dla badanych kanałów w mysich limfocytach T. Ponieważ w każdej z cytowanych prac badano tylko kilkanaście lub najwyżej 30 komórek, możliwe, że powyższe wyniki rzeczywiście obrazują istnienie trzech różnych populacji  $Ca^{2+}$ -zależnych kanałów  $K^+$  w tych komórkach. Również w ludzkich limfocytach T autor niniejszego opracowania stwierdził występowanie pod wpływem jonoforu wapniowego A23187 trzech szczytów szybkości wypływu  $K^+$ , co może sugerować istnienie również i w tych komórkach więcej niż jednego typu  $Ca^{2+}$ -zależnych kanałów  $K^+$  [praca w przygotowaniu].

Bezpośredni udział zmian  $[K^+]_c$  w zjawiskach wchodzących w skład procesu odpowiedzi limfocytów T na pobudzenie (niezależnie od czynnika stymulującego) jest ciągle przedmiotem spekulacji opartych niestety, jak dotychczas, na bardzo skąpym materiale doświadczalnym. Sugerowano między innymi, że zależna od gwałtownej utraty  $K^+$  hiperpolaryzacja kontroluje napływ  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy stymulowanych limfocytów T (zmniejszając prawdopodobieństwo otwarcia kanałów błonowych przewodzących wapń) [32, 36]. Ostatnio powstała także hipoteza dotycząca regulacyjnego wpływu zmian potencjału błonowego limfocytów na aktywność błonowej ATPazy wapniowej ("pompy wapniowej") [52]. Hiperpolaryzacja stymulowanych limfocytów T ma także uczestniczyć w "napędzaniu" elektrogennych mechanizmów sprzężonego transportu  $Na^+$  i aminokwasów [40], a być może także tymidyny i innych niezbędnych komórce substratów [104]. Wreszcie istnieją obserwacje wskazujące na zależność między wypływem  $K^+$  a zdolnością cytotoksycznych komórek T oraz indukowanych interleukiną 2 ludzkich komórek LAK do zabicia komórki docelowej – zablokowanie kanałów potasowych chroni komórkę docelową [73, 102].

### MAGNEZ

Pomimo że od dawna wiadomo, iż magnez jest niezbędny dla prawidłowej czynności limfocytów T, dokładniejsze dane na temat spoczynkowego stężenia kationów  $Mg^{2+}$  w cytoplazmie tych komórek jak też ewentualnych zmian towarzyszących ich stymulacji pochodzą dopiero z lat osiemdziesiątych. I tak, Rink i wsp. [99] wykazali, że spoczynkowe  $[Mg^{2+}]_c$  w limfocytach T wynosi ok. 1 mM. Stanowi to ok. 10% całkowitego stężenia tego metalu w badanych komórkach ocenianego różnymi metodami na 10,3–16 mM [26, 123]. Stymulacja limfocytów T konkanawaliną A wydawała się, według wczesnych badaczy tego zagadnienia, nie powodować żadnych zmian  $[Mg^{2+}]_c$  [99]; późniejsze prace wskazują jednak na niewielki wzrost stężenia kationów magnezowych w cytoplazmie pobudzanych mitogenem komórek T [42]. Dostępne dane są ciągle bardzo niekompletne w związku z trudnościami technicznymi selektywnej analizy stężenia zjonizowanego magnezu w komórkach; na konkluzje dotyczące fizjologicznej roli  $Mg^{2+}$  w procesie aktywacji limfocytów T jest jeszcze za wcześnie. Badania, w których próbowano (nieskutecznie) stymulować ludzkie limfocyty T lektynami PHA i Con A w środowisku całkowicie pozbawionym jonów magnezu, wskazują jednak na możliwy udział tego pierwiastka w aktywacji badanych komórek [1, 6].

### CYNK

Pomimo że od dziesięcioleci znana jest zależność między niedoborem cynku a zaburzeniami czynności układu immunologicznego, jego stężenia zarówno w spoczynkowych, jak też w stymulowanych limfocytach T ludzi i zwierząt nie są dokładnie znane. Wiadomo, że stosunkowo niskie stężenia  $Zn^{2+}$  w środowisku są mitogenne dla komórek T, podczas gdy stężenia wyższe nie tylko nie wykazują tego działania, ale wręcz blokują mitogenną akcję antygenów i lektyn [15]. Węgierska grupa badaczy w ostatnich kilku latach wskazała na kilka znamienych faktów, świadczących o potencjalnie dużej roli  $Zn^{2+}$  w odpowiedzi limfocytów T na pobudzenie. Po pierwsze stwierdzili oni, że stężenie  $Zn^{2+}$  w cytoplazmie tymocytów królika stymulowanych estrem forboleu ulega istotnemu podwyższeniu, przy czym źródłem kationów  $Zn^{2+}$  zdają się być jądro komórkowe i mitochondria [16]. Podwyższone cytoplazmatyczne stężenie  $Zn^{2+}$  koreluje, a wg cytowanych autorów jest przyczyną aktywacji kinazy białkowej C w cytoplazmie stymulowanych

komórek, co jest jednym z kluczowych elementów ich odpowiedzi [17]. Cynk ma także współdziałać przy przejściu kinazy C z cytozolu do frakcji błonowej limfocytów, natomiast nie jest niezbędny dla aktywności związanej z błoną formy tego enzymu [17].

W dostępnej literaturze brak jak dotąd (grudzień 1991) informacji na temat dróg, jakimi  $Zn^{2+}$  wchodzi ze środowiska do cytoplazmy i jakimi ją opuszcza, a także w jaki sposób proces ten jest regulowany w limfocytach T.

Podobnie jak w przypadku magnezu, wiedza o roli cynku w procesach immunologicznych jest jak dotąd bardzo fragmentaryczna; jednak ze względu na udowodnione w wielu systemach bezpośredni udział jonów  $Zn^{2+}$  w procesach kontroli ekspresji informacji genetycznej może przemawiać za podobnym znaczeniem tego metalu dla komórek limfatycznych.

## POTENCJAŁ BŁONOWY

Zróżnicowane stężenia kationów po obu stronach błony komórkowej limfocytów T, wynikające ze ściśle kontrolowanej przez omówione powyżej mechanizmy przepuszczalności błony dla różnych jonów powodują powstanie potencjałów elektrycznych (potencjałów Nernsta) dla każdego z jonów. Suma tych potencjałów określa całkowitą wielkość błonowego potencjału komórki i, o ile nie zachodzi netto zmiana stężenia żadnego z tych jonów, obserwowaną różnicę potencjałów określamy jako spoczynkowy potencjał błony komórkowej [40, 111]. Wykazano, że głównym kationem odpowiadającym za wielkość spoczynkowego potencjału błonowego w limfocytach T jest  $K^+$  i że potencjał ten odpowiada w przybliżeniu potencjałowi równowagi dla kationów potasowych [22, 59, 98]. Utrzymywanie spoczynkowego potencjału błony w limfocytach wyjaśniane jest ciągłą aktywnością omówionych wyżej kanałów potasowych, które nawet w stanie całkowitego spoczynku (braku egzogenne pobudzenia) charakteryzują się pewną, chociaż niską, częstotliwością "otwarć" umożliwiających kationom  $K^+$  opuszczenie komórki [12]. W znacznie mniejszym, chociaż również dość istotnym stopniu, w powstaniu potencjału spoczynkowego uczestniczą kationy  $Na^+$  [124, 125]. Natomiast elektrogenna funkcja (Na,K)ATP-azy ma powodować powstanie różnicy potencjału w błonach limfocytów T równej ok. 7 mV, czyli mniej więcej 10% całkowitej wartości potencjału spoczynkowego w tych komórkach [27].

Wiarygodna ocena spoczynkowego potencjału elektrycznego błony limfocytów T, a także innych komórek zbliżonej wielkości stała się możliwa dopiero pod koniec lat siedemdziesiątych, kiedy do użytku w charakterze "sond wrażliwych na potencjał błony" wprowadzono prawie równocześnie radioaktywne pochodne czwartorzędowych, lipofilowych soli fosfoniowych (trifenyl-[metylo]-fosfonium TPMP<sup>+</sup> i tetrafenylfosfonium TPP<sup>+</sup>) [22, 27, 63] oraz również lipofilowe związki fluorescencyjne z grupy cyjanin [113] oraz oksonoli [118]. Użycie tych – chemicznie odmiennych – związków jako wskaźników potencjału błonowego możliwe jest dzięki temu, że w warunkach fizjologicznego pH oraz wykazują one silny ładunek elektryczny: sole fosfoniowe i cyjaniny są kationami, zaś oksonole anionami. W związku z tym zasada ich działania w charakterze "sond potencjału" polega na istnieniu zależności między aktualnym potencjałem błonowym a stopniem rozdziału (partycji) sondy między komórką a środowiskiem [22, 98]. Wykrywane czy to metodą analizy radioizotopowej, czy też metodami fluorescencyjnymi (zależnie od rodzaju sondy) stężenie sondy w komórkach jest bezpośrednią miarą ich potencjału błonowego, dającą się precyzyjnie

kalibrować [27, 59, 118]. Użycie tych trzech grup sond potencjału pozwoliło niezależnym grupom badaczy na ustalenie, że spoczynkowy potencjał błonowy limfocytów T ludzi i myszy wynosi średnio 50–70 mV [27, 59, 118]. Jako ciekawostkę podam, że przed wprowadzeniem tych "nieinwazyjnych" metod, próby pomiaru potencjału błonowego limfocytów przy użyciu mikroelektrod podobnych do stosowanych w neurofizjologii dawały wyniki o rząd wielkości niższe [65].

Zastosowanie omówionych wyżej metod do oceny zmian potencjału błonowego limfocytów T w trakcie ich swoistej i nieswoistej aktywacji dało dość zróżnicowane wyniki. I tak, już w roku 1980 Kiefer i wsp. wykazali z użyciem TPMP<sup>+</sup>, że zmiany potencjału błonowego w stymulowanych PHA mysich limfocytach T przypominają potencjał czynnościowy komórek nerwowych z kolejnymi fazami depolaryzacji, re- i hiperpolaryzacji; czas trwania każdej z tych faz autorzy ci określali na kilka do kilkunastu godzin [59]. Stosując tę samą metodę Felber i Brand wykazali, że rozwój potencjału czynnościowego w stymulowanych Con A mysich i świńskich limfocytach T zachodzi w ciągu 2–5 minut, w czasie których następuje depolaryzacja, a po niej hiperpolaryzacja [28, 29]. Również wczesne badania wykonane z zastosowaniem kationowych, fluorescencyjnych sond z grupy cyjanin i cytofotometrii przepływowej wykazały szybkość, bo następującą w ciągu kilkunastu minut od kontaktu z Con A lub PHA depolaryzację ludzkich obwodowych limfocytów T [113]. Kiedy jednak do oceny przebiegu potencjału czynnościowego stymulowanych limfocytów zastosowano pochodne oksonolu o charakterze anionowym, pierwszą zmianą potencjału rejestrowaną w stymulowanych mitogenami ludzkich i mysich komórkach T po kilku do kilkunastu minutach od początku pobudzenia okazała się być hiperpolaryzacja [115, 118]. Autor niniejszej pracy przeprowadził własne badania zmian potencjału czynnościowego mysich i ludzkich limfocytów T stymulowanych Con A, z zastosowaniem pochodnej oksonolu jako sondy fluorescencyjnej oraz cytofotometrii przepływowej i mikrofotometrii jako metod detekcji. W badaniach tych wykazano istnienie w stymulowanych mitogenem mysich limfocytach T dwóch szczytów depolaryzacji – pierwszego (krótkotrwałego) w ciągu minuty od rozpoczęcia stymulacji i drugiego (niższego, ale za to rozciągniętego w czasie) pod koniec pierwszej godziny kontaktu z mitogenem; szczyty te były rozdzielone wielokrotnie dłuższym od pierwszej depolaryzacji okresem powrotu potencjału do wartości spoczynkowych, a w niektórych doświadczeniach nawet niewielkiego stopnia hiperpolaryzacji [130]. Co ciekawe, hiperpolaryzacja była obserwowana jako dominująca zmiana potencjału błonowego w analogicznie stymulowanych i badanych limfocytach T pochodzących od starych myszy, w których nie udało się autorowi wykazać istotnej depolaryzacji [130]. Również w ludzkich limfocytach T pochodzących z krwi obwodowej, poddanych działaniu mitogenów roślinnych udało się autorowi wykazać depolaryzację, trwającą jednak przez co najmniej kilka pierwszych godzin stymulacji; podobnie jak w przypadku komórek mysich, depolaryzacja ulegała redukcji lub była zastąpiona przez niewielkiego stopnia hiperpolaryzację w komórkach pochodzących od ludzi w podeszłym wieku [128]. Wydaje się więc, że cytowane powyżej różnice w opisie potencjału czynnościowego stymulowanych mitogenami limfocytów T mogą zależeć nie tyle od metody badawczej, ile od punktów czasowych, w których ten potencjał jest badany, a także od wieku dawców komórek.

W limfocytach T poddanych działaniu IL1 i IL2 nie obserwowano istotnych zmian potencjału błonowego [86]. Można więc przypuszczać, że potencjał czynnościowy limfocytów T występuje (i może być ważny czynnościowo) jedynie na początku reakcji tych komórek na pobudzenie, przed etapem wzmożonej ekspresji receptora dla IL2.

Depolaryzacja, o ile występuje w trakcie potencjału czynnościowego limfocytów T, musi być związana z wprowadzaniem kationów do cytoplazmy tych komórek, nie zrównoważonym chwilowo ani przez równoległy napływ anionów, ani też przez wypływ innych nośników dodatniego ładunku z komórki. Wydaje się, że występujący w ciągu pierwszych kilkudziesięciu sekund aktywacji limfocytów T wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  jest jednym ze źródeł zewnątrzpochodnych ładunków dodatnich depolaryzujących te komórki; nie istnieją jak dotychczas publikacje wskazujące jednoznacznie na udział innych kationów (zwłaszcza  $Na^+$ ) we wczesnej depolaryzacji stymulowanych komórek T, szczególnie że nie udało się w nich wykryć kanałów sodowych umożliwiających szybkie wejście  $Na^+$  do cytoplazmy (patrz wyżej). Porównanie wielkości depolaryzacji komórek T z obserwowaną w limfocytach B stymulowanych przeciwciałami wiążącymi powierzchniowe immunoglobuliny, a także jonoforami wapniowymi (jak się wydaje, w obu przypadkach zależną jedynie od wapnia jako nośnika dodatniego ładunku) wskazuje jednak, że depolaryzacja tych pierwszych nie może być wynikiem wyłącznie napływu  $Ca^{2+}$  do ich cytoplazmy [111, 130]. O ile drugim kationem depolaryzującym stymulowane limfocyty miałyby (co jest najbardziej prawdopodobne) być  $Na^+$ , możliwą drogą jego szybkiego i elektrogennego wejścia do komórki mogą być nieswoiste kanały jonowe o stosunkowo dużym przewodnictwie. Dobrym kandydatem mogą tu być  $Ca^{2+}$ -zależne kanały  $K^+$ ; w obserwacji autora, utrata potasu przez te kanały z komórek T stymulowanych jonomycyną jest mniejsza w środowisku zawierającym fizjologiczne, pozakomórkowe stężenie  $Na^+$  niż w środowisku nie zawierającym sodu [praca w przygotowaniu]. Może to sugerować, że część czasu, w którym omawiane kanały pozostają otwarte, jest wykorzystana przez kationy  $Na^+$  wędrujące do wnętrza komórki. Podobna hipoteza została także przedstawiona przez innych badaczy [40]. Grinstein i Smith wykazali ponadto, że o ile szczurze tymocyty poddano działaniu jonomycyny w stężeniu powodującym wzrost  $[Ca^{2+}]_c$  do ponad  $1 \mu M$  (a więc powyżej optymalnego dla proliferacji) w środowisku zawierającym  $Na^+$ , komórki te po krótkiej hiperpolaryzacji wchodziły w stan przedłużonej, nie dającej się zablokować charydotoksyną depolaryzacji, co autorzy ci tłumaczą jako efekt otwarcia dodatkowych, nieselektywnych kanałów kationowych [39].

Pytanie, czy zmiany potencjału błonowego obserwowane w stymulowanych limfocytach T ludzi i zwierząt są niezbędnym składnikiem procesu aktywacji, pozostaje otwarte. Próba odpowiedzi były tu badania, w których limfocyty T poddawano działaniu mitogenów w środowisku o podwyższonym  $[K^+]$ , a także w obecności jonoforów nystatyny i gramicydyny. We wszystkich trzech przypadkach spoczynkowy potencjał błonowy ulegał depolaryzacji, a odpowiedź proliferacyjna komórek była zahamowana [32, 116]. Antyproliferacyjne działanie (jak się wydaje, nadmiernej i niefizjologicznej) depolaryzacji ma tu polegać na przeciwdziałaniu wzrostowi  $[Ca^{2+}]_c$  albo przez obniżenie gradientu elektrochemicznego  $Ca^{2+}$ , albo przez inaktywację kanałów przewodzących wapń do komórki, albo wreszcie przez aktywację pompy wapniowej [32]. Odwrotnie przedstawia się propozycja Graya i wsp., którzy w cytotoksycznych limfocytach T obserwowali obniżenie indukowanego antygenem wzrostu  $[Ca^{2+}]_c$  pod wpływem hiperpolaryzacji wywołanej jonoforem potasowym walinomycyną, zaś jego podwyższenie po zastosowaniu blokady kanałów potasowych wywołujących depolaryzację [36]. Wprawdzie ostatnio (listopad 1991) opublikowana została praca, której autorzy negują jakąkolwiek rolę zależnych od  $Ca^{2+}$  kanałów  $K^+$  i związanej z ich aktywacją hiperpolaryzacji w aktywacji i proliferacji ludzkich limfocytów T i B [35], należy jednak podejść do przedstawionych w niej wyników z pewną ostrożnością. Otóż, w badaniach swoich cytowani autorzy posłużyli się limfocytami T izolowanymi z krwi obwodowej techniką

rozetkowania z erytrocytami owcy, nie biorąc prawdopodobnie pod uwagę znanego już od jakiegoś czasu faktu aktywacji limfocytów T (połączonej ze wzrostem  $[Ca^{2+}]_c$ ) przez pobudzenie ich powierzchniowego antygeny CD2, będącego receptorem dla owczych krwinek [70, 122]. Przykład ten wskazuje, jak łatwo w omawianej tutaj dziedzinie o błędną interpretację uzyskanych wyników!

Hipotezą wymagającą doświadczalnego potwierdzenia lub wykluczenia jest możliwość bezpośredniego wpływu potencjału czynnościowego, a konkretnie wywołanych nim zmian wielkości pola elektrycznego stymulowanej komórki na stan i aktywność wielu uczestniczących w odpowiedzi na pobudzenie składników błony komórkowej, takich jak m.in. kompleks TcR-CD3, receptory dla interleukin czy też związane z błoną kinazy białkowe i inne enzymy. Pierwsze doświadczenia wskazują, że w mysich spoczynkowych limfocytach T hiperpolaryzacja może obniżać ekspresję antygeny Thy 1.2, ale nie wpływa na ekspresję CD4 i CD8 (obs. własna autora).

Podsumowując, należy stwierdzić, że zasób wiedzy dotyczącej udziału kationów w aktywacji limfocytów T jest już dość pokaźny, aczkolwiek ciągle jest to problem otwarty i poddawany dalszym studiom. Wiedza ta prawdopodobnie ulegnie dalszemu znacznemu poszerzeniu w najbliższym czasie w związku z rozwojem nowych technik badawczych, pozwalających na precyzyjną, dokonaną w czasie rzeczywistym, analizę zmian stężenia badanego jonu w skali pojedynczej komórki (cyfrowa obróbka i analiza obrazu z mikroskopu fluorescencyjnego, połączona z zastosowaniem sond fluorescencyjnych o nowych, zoptymalizowanych właściwościach) czy też w skali całej, uprzednio "oznakowanej" fenotypowo populacji limfocytów T (wieloparametrowa cytofotometria przepływową).

## LITERATURA

- [1] ABOUD CN, SCULLY SP, LICHTMAN AH, BRENNAN JK, SEGEL GB. The requirements for ionized calcium and magnesium in lymphocyte proliferation. *J Cell Physiol* 1985; **122**: 64–72.
- [2] AKBAR AN, SALMON M, JANOSSY G. The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol Today* 1991; **12**: 184–188.
- [3] ANTONELLI G, DIANZANI F. Induction of human interferon – gamma by calcium ionophores: lack of macrophage requirement. *IRCS Med Sci* 1985; **13**: 59–62.
- [4] BARANKIEWICZ J, COHEN A. Purine nucleotide metabolism in phytohemagglutinin-induced human T lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 1987; **258**: 167–175.
- [5] BASS R, ENGLBERG E. Elucidation of an A and L system for amino acid transport in the human lymphoblast using a membrane filtration technique. *In vitro* 1979; **15**: 829–838.
- [6] BELMONT JW, RICH RR. Role of calcium and magnesium and of cytochalasin – sensitive processes in lectin stimulated lymphocyte activation. *Cell Immunol* 1981; **59**: 276–288.
- [7] BIRX DL, BERGER E, FLEISHER TA. The interference of T cell activation by calcium channel blocking agents. *J Immunol* 1984; **133**: 2904–2909.
- [8] BONO MR, SIMON V, ROSENBLATT MS. Blocking of human lymphocyte T activation by channel antagonists. *Cell Biochem Funct* 1989; **7**: 219–226.
- [9] BOURGUIGNON LYW, JY W, MAJERCIK MH, BOURGUIGNON GJ. Lymphocyte activation and capping of hormone receptors. *J Cell Biochem* 1988; **37**: 131–150.
- [10] CAHALAN MD, CHANDY KG, DECOURSEY TE, GUPTA S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol Lond* 1985; **358**: 197–237.
- [11] CANTRELL DA, COLLINS MKL, CRUMPTON MJ. Autocrine regulation of T lymphocyte proliferation: differential induction of IL2 and IL2-receptor. *Immunology* 1988; **65**: 343–349.
- [12] CHANDY KG, DECOURSEY TE, CAHALAN MD, GUPTA S. Ion channels in lymphocytes. *J Clin Immunol* 1985; **5**: 1–6.

- [13] CLEVERS HC, HOEKSMAN M, GMELIG-MEYLING FHJ, BALLIEUX RE. Calcium ionophore A23187 induces interleukin 2 reactivity in human T cells. *Scand J Immunol* 1985; **22**: 633–638.
- [14] CORTEZA Q, CHRETIEN P, SHEN S, REVIE D. Effects of calcium channel blockers on in vivo cellular immunity in mice. *Transplantation* 1989; **47**: 339–342.
- [15] CSERMELY P, SOMOGYI J. Zinc as a possible mediator of signal transduction in T lymphocytes. *Acta Physiol Hungarica* 1989; **74**: 195–199.
- [16] CSERMELY P, SOMOGYI J. Tumor promoter 12-*o*-tetradecanoyl - phorbol- 13 - acetate (TPA) can reduce the Ca<sup>2+</sup>-transporting ability of Ca<sup>2+</sup> ionophores in T lymphocytes. The involvement of intracellular heavy metal ions. *J Cell Physiol* 1989; **138**: 593–602.
- [17] CSERMELY P, SZAMEL M, RESCH K, SOMOGYI J. Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1988; **263**: 6487–6490.
- [18] DARŻYŃKIEWICZ Z, BOLUND L, RINGERTZ NR. Nucleoprotein changes and initiation of RNA synthesis in PHA stimulated lymphocytes. *Exptl Cell Res* 1969; **56**: 418–424.
- [19] DAVIS LS, WACHOLTZ MC, LIPSKY PE. The induction of T cell unresponsiveness by rapidly modulating CD3. *J Immunol* 1989; **142**: 1084–1094.
- [20] DECOURSEY TE, CHANDY KG, GUPTA S, CAHALAN MD. Voltage-dependent ion channels in T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1985; **10**: 71–95.
- [21] DECOURSEY TE, CHANDY KG, GUPTA S, CAHALAN MD. Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes. *J Gen Physiol* 1987; **89**: 405–420.
- [22] DEUTSCH CJ, HOLIAN A, HOLIAN SK, DANIELE RP, WILSON DF. Transmembrane electrical and pH gradients across human erythrocytes and human peripheral lymphocytes. *J Cell Physiol* 1979; **99**: 79–84.
- [23] DIANZANI F, ANTONELLI G, CAPOBIANCHI MR. Induction of human immune interferon with ionophores. *Meth Enzymol* 1986; **119**: 69–72.
- [24] DORNAND J, BONNAFOUS JC, MANI JC. 5'-nucleotidase-adenylate cyclase relationships in mouse thymocytes. A re-evaluation of the effects of concanavalin A on cyclic AMP levels. *FEBS Letters* 1980; **110**: 30–34.
- [25] DORNAND J, FAVERO J, BONNAFOUS JC, MANI JC. Mechanism whereby ouabain inhibits human T lymphocyte activation: effect on the interleukin 2 pathway. *Immunobiology* 1986; **171**: 436–450.
- [26] DYCKNER T, WESTER PO. Skeletal muscle magnesium and potassium determination: correlation with lymphocyte contents of magnesium and potassium. *J Am Coll Nutr* 1985; **4**: 619–625.
- [27] FELBER SM, BRAND MD. Factors determining the plasma membrane potential of lymphocytes. *Biochem J* 1982; **204**: 577–585.
- [28] FELBER SM, BRAND MD. Early plasma membrane potential changes during stimulation of lymphocytes by concanavalin A. *Biochem J* 1983; **210**: 885–891.
- [29] FELBER SM, BRAND MD. Concanavalin A causes an increase in sodium permeability and intracellular sodium content of pig lymphocytes. *Biochem J* 1983; **210**: 893–897.
- [30] FINKEL TH, MCDUFFIE M, KAPPLER JW, MARRACK P, CAMBIER JC. Both immature and mature T cells mobilize Ca<sup>2+</sup> in response to antigen receptor crosslinking. *Nature* 1987; **330**: 179–181.
- [31] FREEDMAN MH, KHAN NR, TREW-MARSHAL BJ, CUPPLES CG, MELY-GOURBET B. Early biochemical events in lymphocyte activation. II. Selectivity of A23187 for T lymphocytes and the use of an apolar fluorescent probe (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) to monitor ionophore- and lectin- induced lymphocyte activation. *Cell Immunol* 1981; **58**: 134–146.
- [32] GELFAND EW, CHEUNG RK, GRINSTEIN S. Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J Cell Physiol* 1984; **121**: 533–539.
- [33] GELFAND EW, MILLS GB, CHEUNG RK, LEE JWW, GRINSTEIN S. Transmembrane ion fluxes during activation of human T lymphocytes: role of Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and phospholipid turnover. *Immunol Rev* 1987; **95**: 59–87.
- [34] GELFAND EW. Cytosolic calcium changes during T- and B-lymphocyte activation: biological consequences and significance. *Current Topics in Membranes and Transport* 1990; **35**: 153–177.
- [35] GELFAND EW, ORR R. Charybdotoxin-sensitive, Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane potential changes are not involved in human T or B cell activation and proliferation. *J Immunol* 1991; **147**: 3452–3458.
- [36] GRAY LS, GNARRA JR, RUSSEL JH, ENGELHARD VH. The role of K<sup>+</sup> in the regulation of the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> mediated by the T lymphocyte antigen receptor. *Cell* 1987; **50**: 119–127.
- [37] GRINSTEIN S, GOETZ JD, ROTHSTEIN A. <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> fluxes in thymic lymphocytes. I. Na<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange through an amiloride-sensitive pathway. *J Gen Physiol* 1984; **84**: 565–584.
- [38] GRINSTEIN S, GOETZ JD. Control of free cytoplasmic calcium by intracellular pH in rat lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; **819**: 267–270.

- [39] GRINSTEIN S, SMITH JD.  $Ca^{2+}$  induces charybdotoxin - sensitive membrane potential changes in rat lymphocytes. *Am J Physiol* 1989; **257**: C197-C206.
- [40] GRINSTEIN S, DIXON J. Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol Rev* 1989; **69**: 417-481.
- [41] GRISSMERS S, CAHALAN M. Ionomycin activates a potassium selective conductance in human T lymphocytes. *Biophys J* 1989; **55**: 245-251.
- [42] GRUBBS RD, MAGUIRE ME. Regulation of magnesium but not calcium transport by phorbol ester. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12550-12554.
- [43] GUKOVSKAYA AS, ZINCHENKO VP, ASTASHKIN EI. Effect of calmodulin antagonists on membrane potential, potassium permeability and mitogenic response of lymphocytes. *Biokhimiya* 1985; **50**: 786-794.
- [44] GUKOVSKAYA AS, ZINCHENKO VP. The effects of ionophore A23187 and concanavalin A on the membrane potential of human peripheral blood lymphocytes and rat thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; **815**: 433-440.
- [45] GUKOVSKAYA AS, ZINCHENKO VP, PETRUNYAKA VV, KHODOROV BI, EVDOTENKO YV. Properties of different  $Ca^{2+}$  pools in permeabilized rat thymocytes. *Eur J Biochem* 1986; **161**: 249-256.
- [46] GUPTA S, CHANDY KG, VAYUVEGULA B, RUHLIG M, DECOURSEY TE, CAHALAN MD. Role of potassium channels in interleukin 1 and interleukin 2 receptor expression. [w] Cellular and Molecular Biology of Lymphokines. New York, Academic Press Inc. 1985; 39-44.
- [47] HAIRE RN, O'LEARY JJ. Mitogen - induced preferential synthesis of proteins during the  $G_0$  to S phase transition in human lymphocytes. *Exptl Cell Res* 1988; **179**: 65-78.
- [48] HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B, SIGWORTH FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* 1981; **391**: 85-94.
- [49] HESKETH TR, BAVETTA S, SMITH GA, METCALFE JC. Duration of the calcium signal in the mitogenic stimulation of lymphocytes. *Biochem J* 1983; **214**: 575-579.
- [50] HESKETH TR. Cation fluxes and lymphocyte transformation. [w] JG Kaplan (red.) The Molecular Basis of Immune Cell Function. Proceedings of the 13th International Leucocyte Culture Conference. London, Elsevier Biomedical Press 1986; 39-56.
- [51] IMBODEN JB, WEISS A. The T cell antigen receptor regulates sustained increases in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  through extracellular  $Ca^{2+}$  influx and ongoing intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization. *Biochem J* 1987; **247**: 695-700.
- [52] ISHIDA Y, CHUSED TM. Heterogeneity of lymphocyte calcium metabolism is caused by T cell - specific calcium - sensitive potassium channel and sensitivity of the calcium ATPase pump to membrane potential. *J Exptl Med* 1988; **168**: 839-852.
- [53] IVERSEN JG. Unidirectional  $K^+$  fluxes in rat thymocytes stimulated by concanavalin A. *J Cell Physiol* 1976; **89**: 267-276.
- [54] JOSIMOVIT'S O, OSAWA H, DIAMANTSTEIN T. The mode of action of the calcium ionophore A23187 on T cell proliferation. I. The ionophore does not replace lymphokines but acts via induction of IL2 production on IL2-responsive cells. *Immunobiology* 1985; **170**: 164-174.
- [55] KACZMAREK L, CALABRETTA B, BASERGA R. Effect of interleukin 2 on the expression of cell cycle genes in human T lymphocytes. *Biochim Biophys Res Comm* 1985; **133**: 410-416.
- [56] KAEVER Y, RESCH K. Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes? *Biochim Biophys Acta* 1985; **846**: 216-225.
- [57] KAKINUMA Y, HOSHINO K, IGARASHI K. Characterization of the inducible polyamine transporter in bovine lymphocytes. *Eur J Biochem* 1988; **176**: 409-414.
- [58] KATAGIRI K, KATAGIRI T, EISENBERG RA, TING J, COHEN PL. Interleukin 2 responses of *lpr* and normal T cells induced by TPA plus A23187. *J Immunol* 1987; **138**: 149-156.
- [59] KIEFER H, BLUME AJ, KABACK JR. Membrane potential changes during mitogen stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 2200-2204.
- [60] KIMBALL PM, GAMAZ N, SELL S. Two episodes of calcium uptake associated with T lymphocyte activation. *Cell Immunol* 1988; **113**: 107-116.
- [61] KLAUSNER RD, O'SHEA JJ, LUONG H, ROSS P, BLUESTONE JA, SAMELSON LE. T cell receptor tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1987; **27**: 6645-6653.
- [62] KLEE CB.  $Ca^{2+}$ -dependent phospholipid- (and membrane-) binding proteins. *Biochemistry* 1988; **27**: 6645-6653.
- [63] KOMADA H, NAKABAYASHI H, HARA M, SAWADA M, TAKANASHI T, SHIOMI T, IZUTSU K. Mechanisms of interleukin 2 - mediated signaling and role of calcium in T cell mitogenesis. *Immunol Invest* 1985; **14**: 435-442.



- [64] KORPELA H, HOLTTA E, HOVI T, JANNE J. Response of enzymes involved in the metabolism of polyamines to phytohemagglutinin - induced activation of human lymphocytes. *Biochem J* 1981; **196**: 733-738.
- [65] KOWAL E, MAŁOFIEJEW A, KOSTRZEWSKA A. Messungen elektrischer Membranpotentiale von Lymphozyten. *Acta Biol Med Ger* 1975; **34**: 1007-1011.
- [66] KUNO M, GORONZY J, WEYAND CM, GARDNER P. Single channel and whole cell recordings of mitogen - regulated inward currents in human cloned helper T lymphocytes. *Nature* 1986; **323**: 269-273.
- [67] KUNO M, GARDNER P. Ion channels activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasma membranes of human T lymphocytes. *Nature* 1987; **326**: 301-304.
- [68] LARSEN CS, KNUDSEN TE, JOHNSEN HE. The role of calcium in stimulation of activated T lymphocytes with interleukin 2. *Scand J Immunol* 1986; **24**: 689-697.
- [69] LEDBETTER JA, GENTRY LE, JUNE CH, RABINOVITCH PS, PURCHIO AF. Stimulation of T cells through the CD3/T cell receptor complex: role cytoplasmic calcium, protein kinase C translocation and phosphorylation of pp60c-src in the activation pathway. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 650-656.
- [70] LEDBETTER JA, RABINOVITCH PS, HELLSTROM I, HELLSTROM KE, GROSMARE LS, JUNE CH. Role of CD2-crosslinking in cytoplasmic calcium responses and T cell activation. *Eur J Immunol* 1988; **18**: 1601-1608.
- [71] LEDBETTER JA, NORRIS NA, GROSSMANN A, GROSMARE LS, JUNE CH, UCKUN FM, COSAND WL, RABINOVITCH PS. Enhanced transmembrane signalling activity of monoclonal antibody heteroconjugates suggests molecular interactions between receptors on the T cell surface. *Molec Immunol* 1989; **26**: 137-145.
- [72] LEE SC, DEUTSCH C, BECK WT. Comparison of ion channels in multidrug resistant and sensitive human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2019-2023.
- [73] LEFEVER A, LIEPINS A. Kinetic analysis of K<sup>+</sup> ion channel function in lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 1990; **12**: 23-38.
- [74] LERNER A, PHILOSOPHE B, MILLER RA. Defective calcium influx and preserved inositol phosphate generation in T cells from old mice. *Aging Immunology Infect Dis* 1988; **1**: 149-157.
- [75] LEWIS RS, CAHALAN MD. Subset-specific expression of potassium channels in developing murine T lymphocytes. *Science* 1988; **239**: 771-775.
- [76] LICHTMAN AH, SEGEL GB, LICHTMAN MA. Total and exchangeable calcium in lymphocytes: effects of PHA and A23187. *J Supramolec Struct* 1980; **14**: 65-75.
- [77] LICHTMAN AH, SEGEL GB, LICHTMAN MA. Calcium transport and calcium ATPase activity in human lymphocyte plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1981; **256**: 6148-6154.
- [78] MACNEIL S, WALKER SW, BROWN BL, TOMLINSON S. Evidence that calmodulin may be involved in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte division. *Biosci Rep* 1982; **2**: 891-897.
- [79] MANDLER RN, SEAMER LC, WHITLINGER D, LENNON M, ROSENBERG E, BANKHURST AD. Human natural killer cells express Na<sup>+</sup> channels. A pharmacologic flow cytometric study. *J Immunol* 1990; **144**: 2365-2370.
- [80] MARTINEZ-VALDEZ H, DOHERTY PI, THOMPSON E, BENEDICT SH, GELFAND E, COHEN A. Antagonistic effects of calcium ionophores and phorbol esters on T cell receptor mRNA levels in human thymocytes. *J Immunol* 1988; **140**: 361-366.
- [81] MASTRO AM, SMITH MC. Two signal, calcium dependent lymphocyte activation by an ionophore A23187 and a comitogenic phorbol ester TPA. *J Cell Biol* 1982; **95**: 21-27.
- [82] MAZURIER J, LEGRAND D, HU WL, MONTREUIL J, SPIK G. Expression of human lactotransferrin receptors in phytohemagglutinin - stimulated human peripheral blood lymphocytes. Isolation of the receptors by antigen - affinity chromatography. *Eur J Biochem* 1989; **179**: 481-487.
- [83] MCCANN FV, MCCARTHY DC, NOELLE RJ. Patch clamp profile of ion channels in resting murine B lymphocytes. *J Membrane Biol* 1990; **114**: 175-188.
- [84] MCCONKEY DJ, NICOTERA PL, HARTZELL P, BELLOMO G, WYLLIE AH, ORRENIUS S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration. *Archiv Biochem Biophys* 1989; **269**: 365-370.
- [85] MENDELSON J, SKINNER A, KORNFELD S. The rapid induction by phytohemagglutinin of increased  $\alpha$ -aminoisobutyric acid uptake by lymphocytes. *J Clin Invest* 1971; **50**: 818-826.
- [86] MILLS GB, BENEDICT S, MELLORS A, GRINSTEIN S, GELFAND EW. Transmembrane signalling by interleukin 2. [w] KJ Smith (red.) New York. Academic Press 1988: 113-116.
- [87] MITSUMOTO Y, SATO K, MOHRI T. Stimulation of leucine transport by a mitogen through intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in human peripheral lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **968**: 353-358.
- [88] NAYLOR GJ. Sodium pump of lymphocytes in manic-depressive illness. *IRCS Med Sci: Biochem* 1980; **8**, 27.

- [89] NEGENDANK W, SHALLER C. Fast and slow fractions of  $K^+$  flux in human lymphocytes. *J Cell Physiol* 1979; **98**: 539-552.
- [90] NEGENDANK W. The state of water in the cell. [w] AMF O'Hare (red.) Science of Biological Specimen Preparation. 1986: 21-32.
- [91] NISBET-BROWN E, CHEUNG RK, LEE JWW, GELFAND EW. Antigen-dependent increase in cytosolic free calcium in specific human T lymphocyte clones. *Nature* 1985; **316**: 545-547.
- [92] PHILOSOPHE B, MILLER RA. Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *J Gerontol* 1990; **45**: B87-B92.
- [93] PIERI C, RECCHIONI R, MORONI F, BALKAY L, MARIAN T, TRON L, DAMJANOVICH S. Ligand and voltage gated sodium channels may regulate electrogenic pump activity in human, mouse and rat lymphocytes. *Biochim Biophys Res Commun* 1989; **160**: 999-1002.
- [94] QUASTEL MR, KAPLAN JG. Lymphocyte stimulation: the effect of ouabain on nucleic acid and protein synthesis. *Exptl Cell Res* 1970; **62**: 407-411.
- [95] RABINOVITCH PS, JUNE CH, GROSSMANN A, LEDBETTER JA. Heterogeneity among T cells in intracellular free calcium responses after mitogen stimulation with PHA or anti-CD3. Simultaneous use of INDO-1 and immunofluorescence with flow cytometry. *J Immunol* 1986; **137**: 952-961.
- [96] REDELMAN D, WORMSLEY S. The induction of human T cell growth factor receptor precedes the production of RNA and occurs in the presence of inhibitors of RNA synthesis. *Cytometry* 1986; **7**: 453-462.
- [97] REDELMAN D. Simultaneous increased expression of E rosette receptor (CD2, T11) and T cell growth factor receptor on human T lymphocytes during activation. *Cytometry* 1987; **8**: 170-183.
- [98] RINK TJ, MONTECUCCO C, HESKETH TR, TSIEN RY. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. *Biochim Biophys Acta* 1980; **595**: 15-30.
- [99] RINK TJ, TSIEN RY, POZZANT T. Cytoplasmic pH and free  $Mg^{++}$  in lymphocytes. *J Cell Biol* 1982; **95**: 189-196.
- [100] RINK TJ, DEUTSCH C. Calcium-activated potassium channels in lymphocytes. *Cell Calcium* 1983; **4**: 463-473.
- [101] ROSOFF PM, HALL C, GRAMATES SL, TERLECKY SR.  $4,4'$ -diisothiocyanatostilbene- $2,2'$ -disulfonic acid inhibits CD3 - T cell antigen receptor - stimulated  $Ca^{2+}$  influx in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1988; **263**: 19535-19540.
- [102] RUSSEL JH, DOBOS CB. Accelerated  $^{86}Rb$  ( $K^+$ ) release from the cytotoxic T lymphocyte is a physiologic event associated with delivery of the lethal hit. *J Immunol* 1983; **131**: 1138-1141.
- [103] SATO C, MIYAZAWA T, NISHIZAWA K, KOJIMA K, OKAYAMA M. Changes in the organization and biosynthesis of cell surface acidic sugars during the phytohemagglutinin-induced blast transformation of human T lymphocytes. *Exptl Cell Res* 1979; **124**: 285-292.
- [104] SCHELL SR, NELSON DJ, FOZZARD HA, FITCH FW. The inhibitory effects of  $K^+$  channel blocking agents on T lymphocyte proliferation and lymphokine production are "nonspecific". *J Immunol* 1987; **139**: 3224-3229.
- [105] SCHLICHTER L, SIDELL N, HAGIWARA S.  $K^+$  channels are expressed early in human T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 5625-5629.
- [106] SCHLICHTER L, SIDELL N, HAGIWARA S. Potassium channels mediate killing by human natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 451-455.
- [107] SCHLICHTER L, MAHAUT-SMITH MP.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in B and T lymphocytes. *Biophys J* 1989; **55**: 6-11.
- [108] SEGEL GB, LICHTMAN MA, SIMON W. Potassium transport in human blood lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *J Clin Invest* 1976; **58**: 1358-1369.
- [109] SEGEL GB, LICHTMAN MA. Decreased membrane potassium permeability and transport in human chronic leukemic and tonsillar lymphocytes. *J Cell Physiol* 1977; **93**: 277-284.
- [110] SEGEL GB, SIMON W, LICHTMAN MA. Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes. *J Clin Invest* 1979; **64**: 834-841.
- [111] SELIGMANN B. Monovalent ion transport and membrane potential changes during leukocyte activation: lymphocytes. *Current Topics in Membranes and Transport* 1990; **35**: 103-125.
- [112] SEVERINI A, PRASAD KVS, GREER WL, KAPLAN JG. Sodium ion influx: an essential early signal in lymphocyte proliferation. [w] Kaplan JG (red.) Leukocytes and Host Defense. New York, Allan R. Liss Inc. 1986: 123-130.
- [113] SHAPIRO HM, NATALE PJ, KAMENSKY LA. Estimation of transmembrane potential of individual lymphocytes by flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; **76**: 5728-5730.
- [114] SZAMEL M, RESCH K. Inhibition of lymphocyte activation by ouabain. Interference with the early activation of membrane phospholipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1981; **647**: 297-301.

- [115] TATHAM PE, DELVES PJ. Flow cytometric detection of membrane potential changes in murine lymphocytes induced by concanavalin A. *Biochem J* 1984; **221**: 137-146.
- [116] TATHAM PE, O'FLYNN K, LINCH DC. The relationship between mitogen induced membrane potential changes and intracellular free calcium in human T lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1986; **856**: 202-211.
- [117] TAYLOR MJ, METCALFE JC, HESKETH TR, MOORE JP. Mitogens increase phosphorylation of phosphoinositides in thymocytes. *Nature* 1984; **312**: 462.
- [118] TSIEN RY, POZZAN T, RINK TJ. T cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  and membrane potential in lymphocytes. *Nature* 1982; **295**: 68-71.
- [119] TSIEN RY, POZZAN T, RINK TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982; **94**: 325-334.
- [120] VANEIJK RVW, MUHLRADT PF. Carbohydrate - labelled glycoproteins as markers of human lymphocyte subsets stimulated with mitogen and alloantigen. *Eur J Biochem* 1981; **115**: 23-28.
- [121] WEISS A, IMBODEN J, SHOBACK D, STOBO J. Role of T3 surface molecules in human T cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Sci USA* 1984; **81**: 4169-4173.
- [122] WEISS MJ, DALEY JF, HODGDON JC, REINHERZ EL. Calcium dependency of antigen - specific (T3-Ti) and alternative (T11) pathways of human T cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 6836-6840.
- [123] WEISSBERG N, BROOKS BA, SCHWARTZ G, EYLATH U, ABRAHAM AS. A routine method for the measurement of the sodium, potassium, magnesium and calcium content of human lymphocytes. *Clin Chim Acta* 1990; **187**: 281-288.
- [124] WILSON HA, SELIGMANN BE, CHUSED TM. Voltage - sensitive cyanine dye fluorescence signals in lymphocytes: plasma membrane and mitochondrial components. *J Cell Physiol* 1985; **125**: 61-71.
- [125] WILSON HA, CHUSED TM. Lymphocyte membrane potential and  $Ca^{2+}$ -sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements. *J Cell Physiol* 1985; **125**: 72-81.
- [126] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A, MYŚLIWSKA J. Decrease of lymphocyte (Na,K)ATPase activity in aged people. *Mech Ageing Dev* 1985; **33**: 11-17.
- [127] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A. Action of channel-modulating drugs on the lymphocyte membrane. Effects on transmembrane potential and potassium efflux from mitogen-stimulated lymphocytes of young and old mice. [w] P Lauger, L Packer, V Vasilescu (red.) Water and Ions in Biological Systems; Basel, Boston, Berlin, Birkhauser Verlag 1988: 287-294.
- [128] WITKOWSKI JM, MYŚLIWSKI A, MYŚLIWSKA J. Age-related changes in transmembrane potential and potassium ion fluxes across membranes of human blood lymphocytes. *Trends Biomed Gerontol* 1988; **1**: 181-183.
- [129] WITKOWSKI JM, MICKLEM HS. Transmembrane electrical potential of lymphocytes in ageing mice. Flow cytometric studies with oxonol, cyanine and rhodamine-123 dyes. *Aging: Immunology and Infectious Disease* 1990; **2**: 287-294.
- [130] WITKOWSKI JM, MICKLEM HS. Transmembrane electrical potential of lymphocytes in ageing mice. Flow cytometric analysis of mitogen - stimulated cells. *Mech Ageing Dev* 1991 (w druku).
- [131] WITKOWSKI JM, ŁUKASZUK K, TRAWICKA L. Comparison of effect of a panel of membrane channel blockers on the proliferative, cytotoxic and cytoadherence abilities of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Immunopharmacology* 1991; (w druku).
- [132] WITKOWSKI JM, SIEBERT J, ŁUKASZUK K, TRAWICKA L. Analysis of in vivo effect of verapamil on human peripheral blood lymphocytes. *Immunopharmacology* 1991 (w druku).

Otrzymano: 20.12.1991 r.

Przyjęto: 30.01.1992 r.

Adres autora: 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 1



## UDZIAŁ KATIONÓW W TRANSDUKCJI SYGNAŁU W STYMULOWANYCH LIMFOCYTACH T. II. $H^+$ I ZMIANA pH CYTOPLAZMY

### CATION PARTICIPATION AT SIGNAL TRANSDUCTION IN STIMULATED T LYMPHOCYTES II. $H^+$ AND CYTOPLASM pH CHANGE

Jacek M. WITKOWSKI

Katedra i Zakład Histologii Akademii Medycznej w Gdańsku

*Streszczenie.* W pracy przedstawiono w skrócie aktualne informacje dotyczące udziału zmian pH i aktywności mechanizmów kontrolujących pH w procesie stymulacji limfocytów T. Zmiany pH cytoplazmy towarzyszą odpowiedzi limfocytów T na stymulację antygenami, a także nieswoistymi czynnikami mitogennymi. Obserwowane zmiany pH charakteryzują się odmiennym przebiegiem w komórkach ludzkich (w których przeważa zakwaszenie) niż w limfocytach gryzoni, które ulegają alkalizacji. Głównym czynnikiem regulującym pH cytoplazmy w stymulowanych limfocytach T ludzi i zwierząt jest antyport  $Na^+/H^+$ . Fluktuacje pH w komórkach T nie są sygnałem niezbędnym dla ich proliferacji; najprawdopodobniej są one wynikiem nasilonego metabolizmu w przygotowujących się do podziału komórkach oraz działania obecnych w nich mechanizmów homeostatycznych.

*Słowa kluczowe:* limfocyty T, aktywacja mitogenami, zmiany pH, wymiennik  $Na^+/H^+$

*Abstract.* A short review of the current information concerning pH changes and relevant cellular mechanisms in human and rodent T cells is given. Changes of cytosolic pH are observed in human and rodent T cells stimulated with antigens as well as with non-specific mitogens. There is a difference of overall direction of changes between human and rodent cells. While the former undergo mainly acidification, the latter increase their pH (alkalinize) in response to the mitogenic stimuli. In both cases, the  $Na^+/H^+$  antiport is the main mechanism of pH regulation. It is thought that pH changes in T cells are neither necessary nor relevant for the proliferation itself; instead, they seem to participate in a homeostasis system coping with rapid and intense changes of intracellular environment of cells preparing to division.

*Key words:* T lymphocytes, mitogen activation, pH changes,  $Na^+/H^+$  antiport

## WSTĘP

W poprzednim artykule (str. 117–137) omówiono wpływ kationów metali i zmian potencjału błonowego limfocytów T na transdukcję sygnału w tych komórkach. Jony wodorowe występują w cytoplazmie żywych komórek limfatycznych i podobnie jak w innych komórkach są produktem reakcji oksydoredukcyjnych, a ich rola polega na udziale w systemach buforowych w celu utrzymania w cytoplazmie (a także, oczywiście, w izolowanych przedziałach wewnątrz organelli, szczególnie lizosomów i mitochondriów) pH optymalnego dla działania obecnych w niej enzymów, a także dla trwałości jej składników. Poniżej przedstawiono w skrócie bieżący (grudzień 1991) stan wiedzy na temat udziału kationów  $H^+$  i zmian ich stężenia (pH) w procesach zachodzących w początkowych stadiach aktywacji limfocytów T, a także głównych mechanizmów regulujących to stężenie.

WIELKOŚĆ pH LIMFOCYTÓW T W SPOCZYNKU  
I W TRAKCIE AKTYWACJI

Aktywacji limfocytów T ludzi i zwierząt doświadczalnych wywołanej kontaktem ze swoistym antygenem czy nieswoistym stymulatorem mogą towarzyszyć zmiany kwasowości cytoplazmy, związane ze wzrostem produkcji  $H^+$  przez oksydoredukcyjne systemy enzymatyczne w pobudzonych metabolicznie komórkach [24]. Zmiany te mierzono różnymi metodami w komórkach T pochodzących od różnych zwierząt, jak też w ludzkich limfocytach krwi obwodowej. Wyniki tych badań, jak też omówionych niżej prób oceny spoczynkowego pH limfocytów T, wykazują duże rozbieżności.

Użycie znakowanych izotopami radioaktywnymi, słabych elektrolitów o charakterze kwasowym lub zasadowym pozwoliło na określenie spoczynkowego pH cytoplazmy limfocytów T na odpowiednio 7,01–7,31 i 6,75 [3, 5]. W badaniach wykonanych metodą jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR) z zastosowaniem związków endogennych znakowanych fosforem  $^{31}P$  lub egzogennych znakowanych fluorem  $^{19}F$  określono zakres fizjologicznego pH w nie pobudzonych limfocytach na 7,17–7,3 [4, 20].

Metodą dość szeroko stosowaną do oceny zmian pH w limfocytach jest technika fluorescencyjna, w której jako wrażliwe na pH sondy używane są pochodne fluoresceiny, takie jak bis-karboksyetyl-5,6-karboksyfluoresceina (BCECF). Tą metodą określono spoczynkowe pH cytoplazmy limfocytów T w zakresie 6,95–7,2, a więc średnio o 0,1 jednostki pH poniżej wartości cytowanych uprzednio [10, 11]. Jest to o tyle ważne, że jak zostanie omówione niżej, związane ze stymulacją zmiany pH mają nie przekraczać 0,1–0,2 jednostki pH, a więc mieścić się w granicach różnic, spowodowanych stosowaniem różnych metod detekcji wewnątrzkomórkowego pH.

Wykazano, że znajdujące się w stanie spoczynku limfocyty T ludzi i myszy są w stanie utrzymać nie zmienione pH swojej cytoplazmy, gdy pH środowiska pozakomórkowego zmienia się w zakresie 6,8–7,4 [5]. Głównymi czynnikami regulacyjnymi są antyporty  $Na^+/H^+$  i  $HCO_3^-/Cl^-$  (patrz niżej); sugerowany jest także udział nie sprecyzowanego mechanizmu zależnego od potencjału błonowego limfocytów [5, 15].

Podsumowując, cytoplazma nie stymulowanych limfocytów T jest w niewielkim stopniu zakwaszona w stosunku do pH płynu pozakomórkowego.

Dokonane analogicznymi technikami próby oceny zmian pH w trakcie odpowiedzi limfocytów T na stymulację mitogenami i przeciwciałami anti-CD3 dały, jak wynika z dotychczas opublikowanych badań, bardzo różne, a nawet rozbieżne wyniki. W szczególności dotyczy to porównania zmian pH w limfocytach T ludzkiej krwi obwodowej ze zmianami obserwowanymi w komórkach gryzoni. Jak stwierdzono, pod wpływem stymulacji Con A dochodzi do podwyższenia pH cytoplazmy mysich, śledzionowych komórek T [16, 17, 19]. Efekt ten ma być dwufazowy ze szczytami po 6 i 20 godzinach stymulacji [9, 16, 17, 19, 21]. Drugi szczyt wzrostu pH cytoplazmy jest w czasowej korelacji z rozpoczęciem syntezy DNA przez pobudzoną komórkę; jednak, jak wspomniano wyżej, replikacja DNA w limfocytach T pobudzonych mitogenami zachodzi także, gdy w komórkach tych uniemożliwiono zmianę pH cytoplazmy [25]. Wielkość zmiany pH obserwowanej w trakcie aktywacji mysich komórek T nie przekracza 0,1 jednostki pH [9, 16]. Alkalinizacja ta zachodzi pod wpływem Con A, ale także w wyniku działania estrów forbolu [9, 16, 17]. Nie jest ona jednak zależna od aktywności kinazy białkowej C, gdyż można wykazać wzrost pH cytoplazmy także w komórkach T, w których uprzednio zablokowano czynność kinazy C działaniem swoistego inhibitora [14, 24]. Grinsteinowi i wsp. [14] udało się także wykazać wzrost pH o 0,2 jednostki szczurzych tymocytów, występujący już w 2 minuty po rozpoczęciu stymulacji Con A. Czynnikiem podwyższającym pH cytoplazmy stymulowanych komórek T jest przede wszystkim antyport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (szerzej opisany poniżej) [24]; działanie wspomnianego wyżej antyportu anionowego  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  ma również prowadzić do wzrostu pH cytoplazmy stymulowanych limfocytów [5, 10, 12, 15].

Z kolei w ludzkich obwodowych limfocytach T stymulowanych mitogenem PHA nie udało się wykazać wzrostu pH cytoplazmy ani w okresie pierwszej godziny, ani też pomiędzy 2 a 6 godziną odpowiedzi na czynnik pobudzający [25]. Nie stwierdzono także jakiegokolwiek wpływu zablokowania antyportu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na wielkość biosyntezy DNA przez stymulowane komórki T [25]. Nowsze badania Gelfanda i wsp. [8] wskazują wręcz na zakwaszenie cytoplazmy ludzkich komórek T stymulowanych fitohemaglutyniną. Również inne czynniki mitogenne dla ludzkich limfocytów T, takie jak Con A i anti-CD3, a także niemitogenne modulatory ich powierzchni – lektyna WGA i przeciwciało monoklonalne UCHT-1, wywołują mierzalne obniżenie pH cytoplazmy tych komórek [1]. Ponieważ w badaniach cytowanych tutaj autorów zakwaszenie cytoplazmy występowało niezależnie od tego, czy komórki ulegały proliferacji czy też nie, wnioskuje się, że obniżenie pH nie jest czynnikiem indukującym proliferację ani też istotnym dla jej przebiegu [1]. Również w przypadku limfocytów ludzkich zablokowanie wymiennika  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  nasilało zakwaszenie cytoplazmy, co sugeruje fizjologiczną rolę tego mechanizmu w przeciwdziałaniu nadmiernemu, niekorzystnemu dla metabolizmu komórki obniżeniu jej pH [8].

## WYMIENNIK $\text{Na}^+/\text{H}^+$ – GŁÓWNY REGULATOR pH W STYMULOWANYCH LIMFOCYTACH T

Właściwości wymiennika (antyportu)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  są identyczne z opisywanymi w innych typach komórek. Jego działanie polega na elektroobojętnej (stechiometria 1:1) wymianie

protonów pochodzących z reakcji wewnątrzkomórkowych na zewnątrzpochodne kationy  $\text{Na}^+$  [11]. Typowym związkiem blokującym działanie wymiennika jest lek moczopędny amilorid oraz jego pochodne [10]. Wymiennik ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) wydaje się w dużym, a być może w największym stopniu wpływać na wzrost  $[\text{Na}^+]_c$  w stymulowanych limfocytach T [23]. Wiąże się to z jego postulowaną rolą jako głównego regulatora pH cytoplazmy komórek ulegających aktywacji [10, 11]. Wymiennik ten praktycznie nie funkcjonuje w nie stymulowanych limfocytach, pomimo istnienia wystarczających dla jego aktywności gradientów stężeń obu jonów przez błonę komórkową [24]. W początkowym okresie badań udział wymiennika ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) w procesie aktywacji komórek limfatycznych postulowano, że zakwaszenie cytoplazmy jest wystarczającym czynnikiem aktywującym ten mechanizm [10]. Badania z ostatnich lat wykazały jednak, że pobudzenie wymiany ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) w ludzkich limfocytach T wymaga uprzedniego wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  [11, 21]. Co ciekawe, zależności tej nie stwierdzono w przypadku komórek gryzoni [24]. Ilość cząsteczek wymiennika ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) w błonie pojedynczej komórki T, oceniana z użyciem znakowanego trytem amiloridu nie przekracza 8000 [6].

Aktywność wymiennika ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) jest istotnym, ale, jak się wydaje, nie niezbędnym składnikiem procesu aktywacji limfocytów T. Wskazują na to doświadczenia, w których udało się wykazać – z jednej strony – zahamowanie biosyntezy DNA i białek w stymulowanych PHA komórkach T bez równoczesnej zmiany pH, z drugiej zaś – brak wpływu 90-procentowej redukcji aktywności wymiennika na biosyntezę DNA [25]. Rola zmian pH cytoplazmy w trakcie aktywacji limfocytów T jest ciągle zresztą przedmiotem badań i kontrowersji (patrz niżej). Między innymi, Dormand i wsp. [7] stwierdzili, że indukowane przez amilorid zahamowanie proliferacji komórek T nie zależy od zakwaszenia ich cytoplazmy, a od zablokowania napływu  $\text{Na}^+$  i związanych z niedoborem sodu zaburzeń ekspresji receptora dla IL2.

Inną postulowaną czynnością wymiennika ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) ma być udział w procesie regulacji objętości komórek limfatycznych. Działanie to udało się potwierdzić w warunkach doświadczalnych, gdy objętość cytoplazmy ulegała znacznej redukcji pod wpływem hipertonicznego środowiska; trudno jednak na podstawie dostępnych danych powiedzieć, czy efekt ten ma jakiegokolwiek znaczenie w warunkach fizjologicznych, gdy zmiany toniczności środowiska pozakomórkowego są niewielkie [13].

Ponieważ jak dotychczas nie istnieją prace doświadczalne, w których zmiany pH cytoplazmy porównywano by tą samą techniką w ludzkich limfocytach T i komórkach gryzoni stymulowanych tym samym czynnikiem, w tym samym środowisku i w identycznych przedziałach czasowych, nie można na razie odpowiedzieć na pytanie, czy obserwowane (przytoczone powyżej) różnice są rzeczywiste, czy też badacze rejestrowali odmienne okresy zmian pH (które w takim przypadku różniłyby się przebiegiem w czasie, ale nie kształtem). Za tym, że podwyższenie pH cytoplazmy jest składnikiem procesu aktywacji także ludzkich limfocytów T, przemawia fakt, że można je obserwować w tych komórkach poddanych działaniu IL2, aczkolwiek wymagane do uzyskania wzrostu pH cytoplazmy stężenia interleukiny muszą być o 2 rzędy wielkości wyższe od indukujących proliferację [17]. Obserwacja ta może (mimo нефизjologicznych warunków cytowanych doświadczeń) potwierdzać hipotezę o odmiennym przebiegu czasowym zmian pH w ludzkich i mysich komórkach T; wiadomo, że nabycie przez limfocyty T pełnej zdolności do odpowiedzi na IL2 wymaga czasu (przeznaczonego m.in. na syntezę receptora IL2R) i że czas ten jest krótszy w przypadku komórek gryzoni [24].



## ROLA ZMIAN pH W PROCESIE AKTYWACJI LIMFOCYTÓW T

Wydaje się, że korzystnym stanem dla komórki odpowiadającej na pobudzenie jest niewielkiego stopnia wzrost pH cytoplazmy, któremu odpowiada wyższa wolna energia hydrolizy ATP, a także który jest optymalny dla czynności enzymów glikolitycznych oraz zaangażowanych w biosyntezę RNA i DNA [15, 24]. Zakwaszenie, zarówno fizjologiczne jak i wywołane doświadczalnie, upośledza zdolność limfocytów (tak ludzkich jak i mysich) do proliferacji [2]. Zmiany pH nie są natomiast, jak się wydaje, niezbędnym czynnikiem inicjującym jakiegokolwiek procesy związane z aktywacją limfocytów T. W szczególności wykazano, że nie są one istotne z obserwowaną w początkowych stadiach stymulacji tych komórek wzmożoną ekspresją proto-onkogenów *c-fos* i *c-jun* [8, 14]. Jedynie w pochodzących z ludzkich limfocytów T komórkach Jurkat wykazano, że alkalizacja cytoplazmy pod wpływem stymulacji przeciwciałem anti-Cd3 i estrami forbolu jest konieczna dla sekrecji IL2 przez te komórki [22]. Obserwacja ta nie ma jak dotychczas potwierdzenia w badaniach komórek nie transformowanych. Nie stwierdzono również, aby zależna od IL2 proliferacja ludzkich komórek T była związana z jakąkolwiek dającą się zaobserwować zmianą pH [18].

Podsumowując, zmiany pH cytoplazmy w stymulowanych limfocytach T, a także mechanizmy je umożliwiające, są częścią systemu ("homeostatu") zapewniającego stałe właściwości środowiska wewnątrzkomórkowego, zwłaszcza w warunkach gdy w pobudzonej komórce dochodzi do masywnych przesunięć i wymiany kationów (patrz towarzyszący artykuł) i organicznych metabolitów zarówno pomiędzy organellami, jak też ze środowiskiem zewnętrznym.

## LITERATURA

- [1] CHEUNG R, GRINSTEIN S, GELFAND EW. Mitogenic and non-mitogenic ligands trigger a calcium-dependent cytosolic acidification in human T lymphocytes. *J Immunol* 1988; **141**: 1648-1651.
- [2] DANIELE RP, HOLIAN SK, NOWELL PC. A potassium ionophore (nigericin) inhibits stimulation of human lymphocytes by mitogens. *J Exptl Med* 1978; **147**: 571-580.
- [3] DEUTSCH CJ, HOLIAN A, HOLIAN SK, DANIELE RP, WILSON DF. Transmembrane electrical and pH gradients across human erythrocytes and human peripheral lymphocytes. *J Cell Physiol* 1979; **99**: 79-84.
- [4] DEUTSCH CJ, TAYLOR S, WILSON DF. Regulation of intracellular pH by human peripheral lymphocytes as measured by  $^{19}\text{F}$  NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 7944-7948.
- [5] DEUTSCH CJ, TAYLOR S, PRICE M. pH homeostasis in human lymphocytes: modulation by ions and mitogen. *J Cell Biol* 1984; **98**: 885-894.
- [6] DIXON SJ, COHEN S, CRAGOE EJ, GRINSTEIN S. Estimation of the number and turnover rate of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers in lymphocytes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 3626-3632.
- [7] DORNAND J, ELMOATASSIM C, MANI JC. Amiloride-induced suppression of lymphocyte proliferation: inhibition of IL2 receptor expression after blockade of early sodium influx. *Immunobiology* 1987; **174**: 365-379.
- [8] GELFAND E, CHEUNG R, GRINSTEIN S. Calcium-dependent intracellular acidification dominates the pH response to mitogen in human T cells. *J Immunol* 1988; **140**: 246-252.
- [9] GERSON DF, KIEFER H. Intracellular pH and the cell cycle of mitogen-stimulated murine lymphocytes. *J Cell Physiol* 1983; **114**: 132-136.
- [10] GRINSTEIN S, GOETZ JD, ROTHSTEIN A.  $^{22}\text{Na}^+$  fluxes in thymic lymphocytes. I.  $\text{Na}^+/\text{Na}^+$  and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange through an amiloride-sensitive pathway. *J Gen Physiol* 1984; **84**: 565-584.
- [11] GRINSTEIN S, COHEN S, ROTHSTEIN A. Cytoplasmic pH regulation in thymic lymphocytes by an amiloride-sensitive  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. *J Gen Physiol* 1984; **83**: 341-369.

- [12] GRINSTEIN S, GOETZ JD. Control of free cytoplasmic calcium by intracellular pH in rat lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985; **819**: 267–270.
- [13] GRINSTEIN S, GOETZ JD, COHEN S, FURUYA W, ROTHSTEIN A, GELFAND EW. Mechanism of regulatory volume increase in osmotically shrunken lymphocytes. *Molec Physiol* 1985; **8**: 185–198.
- [14] GRINSTEIN S, SMITH JD, ROWATT C, DIXON SJ. Mechanism of activation of lymphocyte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange by concanavalin A. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15277–15284.
- [15] GRINSTEIN S, DIXON J. Ion transport, membrane potential and cytoplasmic pH in lymphocytes: changes during activation. *Physiol Rev* 1989; **69**: 417–481.
- [16] HESKETH TR, MOORE JP, MORRIS JDH, TAYLOR MV, ROGERS J, SMITH GA, METCALFE JC. A common sequence of calcium and pH signals in the mitogenic stimulation of eucaryotic cells. *Nature* 1985; **313**: 481–484.
- [17] MILLS GB, CRAGOE EJ, GELFAND EW, GRINSTEIN S. Interleukin 2 induces a rapid increase in intracellular pH through activation of a Na/H antiport. Cytoplasmic alkalization is not required for lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* 1985; **260**: 12500–12507.
- [18] MILLS GB, MAY C. Binding of interleukin 2 to its 75 kDa intermediate affinity receptor is sufficient to activate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. *J Immunol* 1987; **139**: 4083–4087.
- [19] MILLS GB, BENEDICT S, MELLORS A, GRINSTEIN S, GELFAND EW. Transmembrane signalling by interleukin 2. [w] KJ Smith (red) New York, Academic Press 1988: 113–116.
- [20] RINK TJ, TSIEN RY, POZZANT T. Cytoplasmic pH and free  $\text{Mg}^{++}$  in lymphocytes. *J Cell Biol* 1982; **95**: 189–196.
- [21] ROSOFF PM, CANTLEY LC. Stimulation of the T3-T cell receptor-associated  $\text{Ca}^{2+}$  influx enhances the activity of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in a leukemic human T cell line. *J Biol Chem* 1985; **260**: 14053–14059.
- [22] ROSOFF PM, TERRES G. Cyclosporine A inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent stimulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in human T cells. *J Cell Biol* 1986; **103**: 457–463.
- [23] SEVERINI A, PRASAD KVS, GREER WL, KAPLAN JG. Sodium ion influx: an essential early signal in lymphocyte proliferation. [w] Kaplan JG (red.) *Leucocytes and Host Defense*. New York, Allan R. Liss Inc. 1986: 123–130.
- [24] STANTON TH, BOMSZTYK K. Role of intracellular pH in lymphocyte activation. *Current Topics in Membranes and Transport* 1990; **35**: 207–226.
- [25] YAMAGUCHI DT, SAKAI R, BAHN L, CRAGOE EJ, JORDAN SC. Amiloride inhibition of DNA synthesis and immunoglobulin production by activated human peripheral blood mononuclear cells is independent of sodium /hydrogen antiport. *J Immunol* 1986; **137**: 1300–1304.

Otrzymano: 20.12.1991 r.

Przyjęto: 30.01.1992 r.

Adres autora: ul. Dębinki 1, 80/211 Gdańsk.

# RECEPTORY DLA AMINOKWASÓW POBUDZAJĄCYCH W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM I ICH ROLA W PROCESACH PLASTYCZNOŚCI ORAZ TOKSYCZNOŚCI DLA KOMÓREK

## EXCITATORY AMINO ACIDS RECEPTORS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND THEIR ROLE IN PLASTICITY AND CYTOTOXICITY

Staniław GŁAŻEWSKI i Wojciech DANYSZ

Zakład Neurofizjologii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

*Streszczenie.* Glutaminian jest głównym pobudzającym neuroprzekaznikiem ośrodkowego układu nerwowego. Dotychczas udokumentowano istnienie dwóch typów receptorów o jonotropowej charakterystyce: NMDA i AMPA oraz jednego typu receptorów metabotropowych: kwiskwalinowego. Receptory NMDA budzą szczególne zainteresowanie ze względu na ich rolę w procesach: toksyczności dla komórek, plastyczności rozwojowej oraz procesie zapamiętywania. Cytotoksyczne działanie pobudzających aminokwasów można wiązać z wieloma patologicznymi zjawiskami ośrodkowego układu nerwowego.

*Summary.* Glutamate is a main excitatory neurotransmitter in the central nervous system. The existence of the two types of glutamate ionotropic receptors: NMDA and AMPA and one type of metabotropic: quisqualate has been well established. NMDA receptors are of particular interest because of their role in: excitotoxicity, developmental plasticity and process of memory formation. Excitotoxic action of excitatory amino acids can play a role in many pathological phenomena of the central nervous system.

### WPROWADZENIE

Pierwsze doniesienia, wskazujące na pobudzające działanie kwasu glutaminowego na aktywność elektryczną neuronów ośrodkowego układu nerwowego (OUN) pojawiły się już na początku lat pięćdziesiątych [77]. Z endogennie występujących substancji działanie podobne do glutaminianu mają także min. kwasy: asparaginowy, chinolinowy, homocysteinowy i

NAAG [77] (tab. 1). Spośród wymienionych substancji, glutaminian występuje w OUN w największych stężeniach [14, 16]. Wczesne lata siedemdziesiąte dostarczyły dowodów, wskazujących na neuroprzekaznikową rolę glutaminianu w OUN [19]. Większość tych obserwacji była konsekwencją badań na płycie nerwowo-mięśniowej bezkręgowców [19]. Dotychczas dobrze udokumentowano istnienie dwóch typów receptorów glutaminianoergicznych o jonotropowej charakterystyce: NMDA (od kwasu N-metylo-D-asparaginianowego) i AMPA (od kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-oksazolo-4-propionowego) oraz jednego typu receptorów metabotropowych: kwiskwalinowego [15, 77, 88]. Ich nazwy pochodzą od relatywnie specyficznych agonistów tych receptorów [23, 24] (patrz także tab. 1). Sugeruje się też istnienie receptora zależnego od kwasu 2-amino-4-fosfobutanowego [15, 60] oraz podklas receptora AMPA [84, 85] (patrz niżej). Szczególne zainteresowanie budzą receptory NMDA. Fakt ten jest konsekwencją:

- (a) mnogości miejsc allosterycznie modulujących ich funkcję [17, 91],
- (b) udowodnionej roli tych receptorów w procesach toksyczności dla komórek [59] oraz
- (c) postulowanej ich roli w procesach ( $c_a$ ) plastyczności rozwojowej [13, 67] oraz ( $c_b$ ) uczenia [10, 55, 64].

Jak wskazują najnowsze badania, cytotoksyczne działanie pobudzających aminokwasów można wiązać z wieloma patologicznymi zjawiskami w OUN, takimi jak: choroba Alzheimera, choroba Huntingtona, epilepsja, szeregiem chorób metabolicznych, a także uszkodzeniami tkanki nerwowej w wyniku ischemii, hipoglikemii oraz hipoksji [59, 72].

TABELA 1. Agoniści, antagoniści i wtórne przekaźniki receptorów glutaminianoergicznych

Typ receptora	Agonista	Antagonista		Przekaźniki II rzędu
		współzawodniczy	niewspółzawodniczy	
AMPA		CNQX	JSTX	$Ca^{2+}$
	AMPA	DNQX		
	kw. domoowy	$\gamma$ -DGG		
	kw. glutaminowy	GAMS		
	kw. kainowy	GDEE		
	kw. kwiskwalinowy	KYN	NBQX	
NMDA			$Mg^{2+}$	$Ca^{2+}$
	kw. asparaginowy	APH	ketamina	
	kw. glutaminowy	APV	MK-801	
	kw. ibotenowy	CPP	PCP	
	NMDA	KYN	SKF-10047 tiletamina	
Kwas kwiskwalinowy	CCPG		brak	IP <sub>3</sub> /DAG
	kw. glutaminowy	APB		
	kw. ibotenowy	AP3		
	kw. kwiskwalinowy			
	trans-ACPD			

\* $Mg^{2+}$  działa w innym miejscu niż pozostali antagoniści niewspółzawodniczy. *Objaśnienia skrótów*: DNQX – 6,7-dinitrochinoksalino-2,3-dion, CNQX – 6-nitro-7-cjanochinoksalino-2,3-dion, GAMS – kwas  $\alpha$ -D-glutamylamino-metylosulfonowy, GDEE – ester dwuetylowy L-glutaminianu,  $\gamma$ -DGG –  $\gamma$ -D-glutaminianoglicyna, KYN – kwas kinureninowy, MK-801 – 5-metylo-10,11-dihydro-5H-dibenzocyclo-hepteno-5,10-imina, NBQX – 6-nitro-7-sulfamyllobenzochinoksalino-2,2-dion, SKF-10047 – N-allilnormetazocyna

## GLUTAMINIAN JAKO NEUROPRZEKAŹNIK

Istnieje szereg kryteriów, które muszą być spełnione, aby dana substancja mogła być uznana za neuroprzekaźnik [16, 22]. Obejmują one:

(a) zależne od  $\text{Ca}^{2+}$  wydzielanie tej substancji z zakończeń nerwowych na skutek ich pobudzenia,

(b) istnienie mechanizmów jej inaktywacji w szczelinie synaptycznej (hydroliza lub/ i pobieranie przez zakończenia nerwowe lub komórki głejowe),

(c) istnienie specyficznych receptorów,

(d) istnienie agonistów i antagonistów, które odpowiednio stymulują lub blokują działanie endogennego agonisty,

(e) identyfikacja bezpośrednich efektów komórkowych wywołanych przez hipotetyczny neuroprzekaźnik, np. depolaryzacja błony postsynaptycznej,

(f) obecność tylko w zakończeniach nerwowych, skorelowana z dystrybucją enzymów syntetyzujących,

(g) heterogenne rozmieszczenie w układzie nerwowym jako dodatkowy dowód specyficzności funkcji.

Wydaje się, że glutaminian spełnia większość wymienionych wyżej kryteriów dla neuroprzekaźnika [16, 19, 22].

(a) Od dawna znany jest fakt zależnego od jonów wapnia wydzielania glutaminianu ze skrawków mózgu lub synaptosomów, inkubowanych uprzednio z radioaktywnymi: glutaminianem, glutaminą lub asparaginianem, na skutek depolaryzacji wywołanej: elektryczną stymulacją, zwiększonym stężeniem zewnątrzkomórkowego  $\text{K}^+$  lub weratrydyną (aktywator kanałów sodowych) [19].

(b) W 1971 roku Logan i Snyder [46] opisali w synaptosomach otrzymanych z mózgowia szczura zależny od sodu system transportu glutaminianu, o wysokim powinowactwie. Na podobnej zasadzie glutaminian jest transportowany do astrocytów, w których za pośrednictwem syntazy glutaminowej jest metabolizowany do glutaminy [29]. Z astrocytów glutamina (nieaktywna biologicznie) jest transportowana z powrotem do zakończeń nerwowych, gdzie przez glutaminazę ulega konwersji do glutaminianu [29]. Glutaminian magazynowany jest następnie w pęcherzykach synaptycznych, w procesie zależnym m.in. od ATP [77].

(c) Następnym kryterium spełnionym przez glutaminian jest kryterium istnienia specyficznych miejsc receptorowych [23, 75, 88].

(d) Znalaziono również wielu agonistów i antagonistów selektywnych dla poszczególnych typów receptorów glutaminianoergicznych [88].

(e) Charakterystyka odpowiedzi komórkowej wywołanej podaniem glutaminianu jest podobna do reakcji wywołanej stymulacją aferentnych szlaków glutaminianoergicznych [56].

(f) W odróżnieniu jednak od większości znanych neuroprzekaźników glutaminian jest obecny we wszystkich komórkach ustroju (niespełnione kryterium f) jako:

- powszechny pośrednik metabolizmu energetycznego,
- akceptor wolnego amoniaku oraz
- donor grupy aminowej w reakcjach transaminacji.

Kwas glutaminowy jest również substratem dla dekarboksylazy glutaminianowej, enzymu syntetyzującego najbardziej powszechny w OUN neuroprzekaźnik hamujący GABA (kwas

$\gamma$ -aminomasłowy). Neurony glutaminianoergiczne mają zatem dwie pule glutaminianu: metaboliczną (tak jak wszystkie inne komórki) oraz pulę związaną z neuroprzekaznictwem [14, 16, 38].

(g) Neuroprzekaznikowa pula glutaminianu jest rozmieszczona w układzie nerwowym w sposób heterogeny [14].

Liczba dróg nerwowych wykorzystujących aminokwasy pobudzające w charakterze neuroprzekazników jest olbrzymia i obejmuje większość projekcji pobudzeniowych układu nerwowego [16, 19, 77]. Szczególnie duża liczba neuronów glutaminianoergicznych występuje w korze somatosensorycznej, gdzie w przypadku szczura ok. 30% neuronów zawiera mediatorową pulę tego związku [14]. Szeroką reprezentację w OUN mają również receptory glutaminianoergiczne. Powszechne są poglądy, że znaczna większość neuronów (jeśli nie wszystkie) ma receptory specyficznie wiążące glutaminian [16].

## RECEPTORY GLUTAMINIANOERGICZNE

Na podstawie danych elektrofizjologicznych, farmakologicznych i molekularnych wyróżnia się trzy podstawowe typy receptorów glutaminianoergicznych: AMPA, NMDA i kwiskwalinowe [45, 85] (tab. 1). Dwa pierwsze typy mają charakter receptorów jonotropowych, ostatni – metabotropowych. Problematyczne jest istnienie często wzmiankowanych w literaturze specyficznych receptorów dla APB (kwas 2-amino-4-fosfobutanowy), które w związku z tym nie będą omawiane w niniejszym opracowaniu [26].

### RECEPTOR AMPA

Receptory AMPA to faktycznie "rodzina" receptorów jonotropowych obejmująca, dawniej wyodrębniane, receptory kainowe i jonotropowe receptory kwiskwalinowe [45].

Najbardziej znanymi ich agonistami są, obok glutaminianu, kwasy: kainowy, kwiskwalinowy, domoowy oraz AMPA. Znanych jest również wielu już klasycznych konkurencyjnych antagonistów tych receptorów:  $\gamma$ -DGG, GAMS, GDEE oraz KYN (patrz opis tab. 1). Ostatnio powszechnie używa się antagonistów nowej generacji. Są to pochodne chinoksaliny, charakteryzujące się znacznie większą siłą działania, takie jak: DNQX, CNQX, NBQX [31, 82] (patrz opis tab. 1). Niekonkurencyjnym antagonistą receptorów AMPA jest toksyna JSTX (od *Joro spider toxin*) [80].

Generalnie, kanały jonowe związane z receptorami AMPA są przepuszczalne dla jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  i w znacznym stopniu uczestniczą w generowaniu e.p.s.p. (e.p.s.p. – postsynaptyczny potencjał pobudzeniowy) podczas transmisji synaptycznej [56, 58]. W kilku modelowych układach eksperymentalnych stwierdzono znaczną przewodność kanałów jonowych tych receptorów również dla jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [7, 28].

W niektórych strukturach OUN stwierdzono wzrost obrotu  $\text{PIP}_2$  (fosfatydyloinozytolo 4,5-bisfosforanu) wywołany przez aktywację receptorów omawianego typu, jednocześnie nie stwierdzono w tym procesie pośrednictwa białka G [84].

Potencjał synaptyczny, będący konsekwencją pobudzenia receptora AMPA, charakteryzuje krótka latencja oraz krótki czas trwania (10–50 ms) [56].

Najwięcej receptorów AMPA występuje w hipokampie i korze mózgowej (nowej korze) [16, 61]. Wiadomo również, że receptory glutaminianoergiczne wszystkich trzech typów, tj. AMPA, NMDA i kwiskwalinowe sąsiadują ze sobą również w obrębie jednej komórki [56].

Jak już wspomniano, jeszcze stosunkowo niedawno, w obrębie rodziny receptorów AMPA wyróżniano dwa podtypy: tzw. kainowe oraz kwiskwalinowe jonotropowe. Niebagatelną rolę w uzasadnieniu ówczesnego podziału odegrały wyniki doświadczeń przeprowadzonych z wykorzystaniem kwasu kainowego. Badania wiązania receptorowego, połączone z badaniem inaktywacji wiązania w wyniku działania elektronów o wysokiej energii, wskazują na interakcje kwasu kainowego z dwoma miejscami wiązania. Pierwsze z nich to miejsce o niskim powinowactwie ( $\mu\text{M}$ ), niewrażliwe na jony wapnia i związane z białkiem o masie 52 kDa. Drugie o wysokim powinowactwie do kainianu (2–10 nM) jest hamowane przez jony wapnia ( $\text{IC}_{50}=2.5 \text{ mM}$ ) i związane z białkiem o masie 77 kDa [32].

Badania wiązania AMPA wskazują, że przyłącza się on do miejsc kainowych o niskim powinowactwie. Stwierdzono także, że jest to białko o masie 52 kDa [30]. Podobne wyniki uzyskano stosując trytowanego antagonistę CNQX [33].

Wyniki badań molekularnych wskazują na istnienie co najmniej 4 niezależnych genów warunkujących ekspresję receptorów AMPA. Produkty transkrypcji każdego z nich mogą dodatkowo występować w alternatywnych formach molekularnych tzw. formie *flip* lub formie *flop* (alternatywny *splicing*). Białkowe produkty wszystkich form mRNA są wrażliwe na kwasy: kwiskwalinowy, kainowy, glutaminowy i AMPA. Jednak stopień ich wrażliwości (określany elektrofizjologicznie) na poszczególnych agonistów jest zróżnicowany i zależy nie tylko od badanej formy receptora, ale również od ewentualnej obecności innych form [85]. Generalnie, istnieją formy bardziej wrażliwe na kwas kwiskwalowy i inne, bardziej wrażliwe na kwas kainowy. Dodatkowo, poziom ekspresji kolejnych form mRNA w poszczególnych częściach mózgu jest zróżnicowany. Taki stan rzeczy na poziomie molekularnym zacydował o wcześniejszym wyodrębnieniu, na podstawie badań elektrofizjologicznych dwóch typów receptorów AMPA.

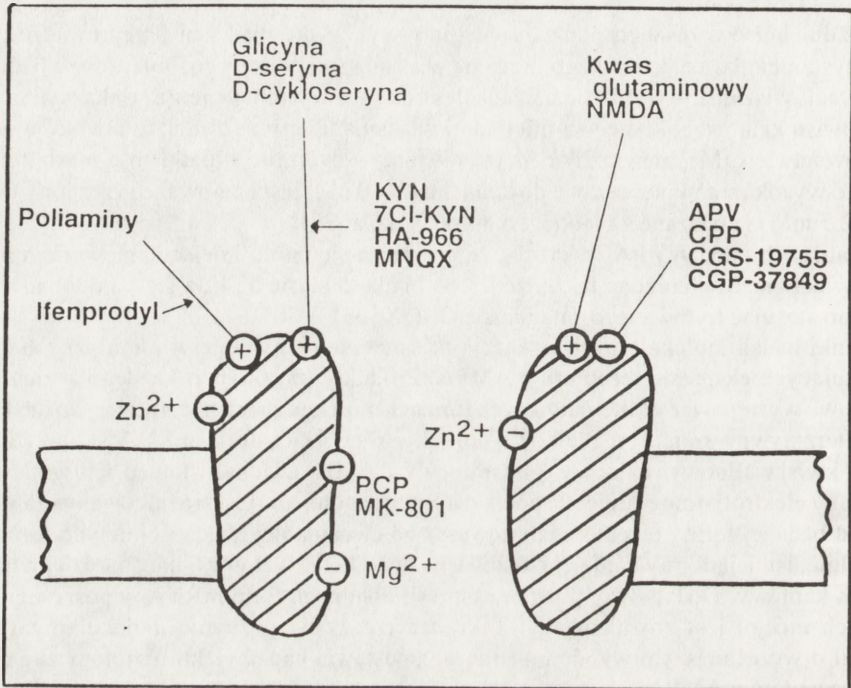
## RECEPTOR NMDA

Receptor NMDA jest kompleksem makromolekularnym, składającym się z co najmniej dwóch podjednostek, o masach 120 kDa każda [34]. Są one miejscem wiązania dla konkurencyjnych agonistów i antagonistów oraz modulatorów tego receptora (rys. 1) [89]. Uważa się, że kanał jonowy związany z receptorem NMDA jest w równie wysokim stopniu przepuszczalny dla jonów:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  i  $\text{Na}^{+}$  [15, 56].

Rozmieszczenie receptorów NMDA w OUN badano używając zarówno specyficznych, konkurencyjnych antagonistów tych receptorów, jak i glicyny lub antagonistów niekonkurencyjnych. We wszystkich trzech przypadkach uzyskano bardzo podobne wyniki. Największą ich gęstość obserwowano w hipokampie oraz korze mózgowej i prążkowie [16].

Poza kwasem glutaminowym agonistami receptora NMDA są m.in. kwasy: NMDA, L-homocysteinowy cis-2,4-metanoglutaminowy i asparaginowy [89]. Wszystkie te związki są w ograniczony sposób specyficzne w stosunku do tego typu receptorów glutaminianoergicznych [89]. Za konkurencyjnych antagonistów, bardzo z kolei specyficznych, uznaje się kwasy: APV (2-amino-5-fosfowalerianowy), APH (2-amino-7-fosfoheptanowy) i CPP (3-(+)-2-karboksypiperazyno-4-yl-propylo-1-fosforowy) [15, 51, 88]. Wewnątrz kanału jonowego znajdują się trzy niezależne miejsca wiążące:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i PCP (fencyklidyna) lub jej

pochodne [15, 51]. Do tej ostatniej grupy należą: MK-801, SKF-10047 i tiletamina [15, 51] (patrz także opis tab. 1). Funkcja receptora NMDA może być dodatkowo swoiście modulowana przez działające na miejsca zlokalizowane poza kanałem jonowym jony cynku oraz glicynę i poliaminy (rys. 1) [37, 91].



Rys. 1. Model agregatu kanał-receptor NMDA; zaznaczono miejsca wiązania: agonistów i antagonistów konkurencyjnych, aktywatorów allosterycznych, antagonistów niekonkurencyjnych oraz jonów Mg<sup>2+</sup>

Częstotliwość otwierania się kanału jonowego receptora NMDA, w wyniku pobudzenia, jest 3–5-krotnie większa niż analogiczna wartość charakteryzująca receptory AMPA [50]. Potencjały synaptyczne, wytwarzane za pośrednictwem tego receptora, mają dużą latencję i bardzo długi czas trwania (200–300 ms). Ich uwidocznienie wymaga znacznego spadku potencjału spoczynkowego neuronu [50, 70].

Funkcja receptora NMDA nasilana jest w wyniku działania czynników redukujących (np. DTT), a hamowana w wyniku działania utleniaczy (np. DTNB). Receptory te hamowane są również przez protony [87].

Wydaje się, że wzrost akumulacji cAMP i cGMP, obserwowany po aktywacji receptora NMDA, nie wymaga pośrednictwa białka G i prawdopodobnie wynika z bezpośredniej aktywacji cyklaz, odpowiednio: adenylowej i guanylowej przez jony wapnia wnikające do komórki w wyniku pobudzenia tego receptora [69].

Jak już wspomniano, działanie receptorów NMDA może być modulowana przez: jony magnezu i cynku oraz glicynę i poliaminy. Każdy z tych ligandów działa na swoiste miejsca występujące w kompleksie kanał-receptor (patrz rys. 1).



## MAGNEZ

Stwierdzono, że aktywacja (otworzenie) kanału jonowego receptora NMDA zależy od potencjału błonowego, a konkretnie wymaga drastycznego jego spadku (do przynajmniej -30 mV) [50]. Uważa się, że jest to konsekwencją zależnego od potencjału błonowego blokowania kanału jonowego przez fizjologiczne stężenia jonów magnezu [70]. Po usunięciu tych jonów ze środowiska zewnątrzkomórkowego można bowiem zarejestrować wolny składnik e.p. s.p., zależny od receptora NMDA, a "wytwarzany" przez neuron w odpowiedzi nawet na bardzo słaby bodziec. Sądzi się, że po drastycznej depolaryzacji neuronu, np. w wyniku pobudzenia pozostałych receptorów glutaminianoergicznych (lub innych receptorów jonotropowych np. nikotynowych) i w obecności fizjologicznych stężeń  $Mg^{2+}$ , ten ostatni jest elektrostatycznie usuwany z kanału jonowego [12].

## CYNK

Jony cynku hamują działanie receptora NMDA [73]. Dzieje się to prawdopodobnie poprzez działanie na dwa różne miejsca wiązania. Jedno z nich znajduje się wewnątrz (hamowanie zależne od potencjału), a drugie na zewnątrz kanału jonowego [11]. Cynk, podobnie do magnezu, występuje w znacznych stężeniach w OUN (tj. 1–3 mM). Stwierdzono ponadto, że przynajmniej w hipokampie współwystępuje z glutaminianem w zakończeniach nerwowych i razem z nim jest z nich uwalniany [1].

## GLICYNA

Już w 1981 roku Kishimoto i wsp. [40] stwierdzili w homogenacie z mózgu obecność miejsc specyficznie wiążących  $[3H]$ glicynę (tzw. miejsca GLY-2). Miejsca te były jednocześnie niewrażliwe na strychninę, blokera klasycznego, hamującego receptora glicynowego (tzw. GLY-1). Fakt ten sugerował, że miejsca GLY-2 nie mają nic wspólnego z receptorami GLY-1, a także z białkiem transportującym glicynę. Kilka lat później Johnson i Ascher [37] pracując na hodowlach neuronów zauważyli, że glicyna nasila elektrofizjologiczną reakcję na NMDA. Niezależnie od badań funkcjonalnych, przy pomocy metody autoradiografii wykazano brak korelacji między występowaniem miejsc wiążących glicynę i strychninę, co więcej stwierdzono, że rozmieszczenie tych miejsc ma charakter komplementarny [8]. Miejsca GLY-2 dominują w nowej korze, hipokampie i prążkowiu, a GLY-1 w rdzeniu i rdzeniu przedłużonym. Charakterystyczną cechą miejsc GLY-2 jest ich duże powinowactwo do D-izomerów alaniny i seryny, podczas gdy L-izomery mają większe powinowactwo do receptorów GLY-1 [37, 40, 94]. Wprawdzie glicyna występuje *in vivo* w stężeniach ok. 1  $\mu M$ , co 5-krotnie przekracza jej powinowactwo do miejsca GLY-2, lecz nie musi to oznaczać, że miejsca te są stale wysycane przez glicynę. W przypadku GABA na przykład mamy podobną sytuację, ale dzięki wychwytwowi neuronalnemu i wytwarzanemu gradientowi stężeń faktyczne stężenie tego neuroprzekaźnika w okolicy receptorów może być nawet kilkukrotnie niższe. Ponadto stwierdzono, że obecność jonów cynku obniża powinowactwo glicyny do miejsca GLY-2 [95]. Istotnie, dane na temat indukcji cGMP związanej z pobudzeniem receptorów NMDA w mózdzku sugerują, że miejsca GLY-2 nie są wysycane *in vivo* [17, 92]. Mechanizm działania glicyny na receptor NMDA nie jest do końca poznany, aczkolwiek istnieją dane sugerujące, że glicyna zwiększa powinowactwo kwasu glutaminowego do miejsca wiązania

NMDA, natomiast hamuje wiązanie antagonisty [3H]CPP [62]. Monaghan i wsp. [62] uważają glicynę za czynnik regulujący transformację receptora NMDA z konformacji preferującej antagonistę w konformację preferującą agonistę.

Eksperymenty elektrofizjologiczne przeprowadzone na oocytach uprzednio transformowanych mRNA kodującym między innymi receptory NMDA pokazują nawet, że glicyna jest niezbędna do aktywacji receptorów NMDA. Stąd uważa się ją czasem za kontransmitter [43]. Stosunkowo selektywnymi antagonistami miejsca GLY-2 są: 3-amino-1-hydroksy-2-pyrrolidon (HA-966) oraz kwas 7-chlorokinureninowy [21, 39].

Ostatnio sklonowano jedną z form molekularnych receptora NMDA [63].

### POLIAMINY

Poliaminy (spermina i spermidyna) stymulują wiązanie [3H]MK-801 w układzie doświadczalnym, w którym stanowią one indeks aktywacji receptora NMDA [74]. Sugeruje to, że jest to działanie bezpośrednie na kompleks receptora NMDA.

### FENCYKLIDYNA

Fencyklidyna (PCP), będąca popularnym w USA środkiem odurzającym (*angel dust*), blokuje bardzo silnie pobudzenie receptorów NMDA [2]. Działanie to jest efektem wiązania PCP do miejsca o wysokim powinowactwie, znajdującego się wewnątrz kanału jonowego [35]. Takie umiejscowienie decyduje o tym, że działanie PCP wykazuje charakterystykę określaną jako zależną od pobudzenia (*use dependent*). Oznacza to, że PCP aby działać, musi dostać się do swojego miejsca rozpoznawczego w kanale jonowym. Żeby to było możliwe, kanał musi być otwarty, a otwarty jest tylko w obecności agonisty receptora NMDA. Dlatego wg terminologii enzymologicznej ten rodzaj hamowania należy określać terminem *uncompetitive* (inhibitor enzymu działa tylko po przyłączeniu substratu), który nie ma polskiego odpowiednika. Znacznie bardziej selektywnymi ligandami niż samo PCP są jej pochodne TCP i MK-801. Nie jest natomiast wyjaśnione, czy istnieją endogenne ligandy tego miejsca.

### RECEPTOR KWISKWALINOWY

Poza jonotropowymi receptorami glutaminianoergicznymi wyodrębniono również receptory metabotropowe wrażliwe na ten neuroprzekaznik [67, 84]. Niespecyficznym agonistą tego receptora jest również kwas kwiskwalinowy [77, 88]. Oprócz działania na receptory kwiskwalinowe działa on na receptory AMPA, a także hamuje peptydazę degradującą NAAG [76, 77]. Oprócz wyżej wymienionych związków agonistyczne działanie na receptory kwiskwalinowe mają: kwas ibotenowy (działający też na receptory NMDA), CCPG (karboksycyklopropyloglicyna) oraz ACPD (kwas transaminocyklo-pentano-1,3-dikarboksylowy) [53]. Jedynymi znanymi antagonistami tego receptora (a właściwie częściowymi agonistami) są APB i AP3 (kwas 2-amino-3-fosfo-propionowy) [81]. Jedna z form molekularnych tego receptora została sklonowana [54].

Efekty komórkowe aktywacji receptora kwiskwalinowego wymagają pośrednictwa zmian metabolicznych zależnych od GTP (białko G), a następnie aktywowania systemu wtórnych przekazników, w tym przypadku – rozkładu (poprzez fosfolipazę C) PIP<sub>2</sub> na diacyloglicerol i IP<sub>3</sub> [67, 81, 86, 93].

Zarówno kwas kwiskwalinowy, jak glutaminowy czy ibotenowy stymulują obrót PIP<sub>2</sub> w skrawkach, synaptoneurosomach i hodowlach tkankowych neuronów i astrocytów z wielu obszarów mózgowia (hipokamp, mózdzek, prążkowie, kora) [66, 84].

Cechą charakterystyczną wrażliwości receptorów kwiskwalinowych są znaczne różnice ontogenetyczne. W przypadku oznaczeń przeprowadzonych na skrawkach szczurzego hipokampa, wartości akumulacji radioaktywnego IP<sub>3</sub> są wielokrotnie większe w przypadku zwierząt młodych [67]. Uszkodzenie szlaków zstępujących z kory do hipokampa w znacznym stopniu wzmacnia metabotropowe efekty pobudzenia receptora kwiskwalinowego [65]. Podobny wzrost obrotu PIP<sub>2</sub> uzyskano po elektrycznej stymulacji hipokampa (tzw. *kindling* – uważany powszechnie za modelową epilepsję) [36]. Wzrost obrotu obserwowano także w wyniku wysokoczęstotliwościowej (tetanicznej) stymulacji aferentów, niektórych komórek hipokampa [49]; wywołującej długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP). Dodatkowo, obecność toksyny krztusca, specyficzniej blokującej niektóre białka typu G, uniemożliwia indukcję LTP w polu CA1 hipokampa [84]. Dane te świadczą o zaangażowaniu receptorów kwiskwalinowych w mechanizmach będących podłożem zmian plastycznych w układzie nerwowym.

## PLASTYCZNOŚĆ ZALEŻNA OD RECEPTORÓW NMDA

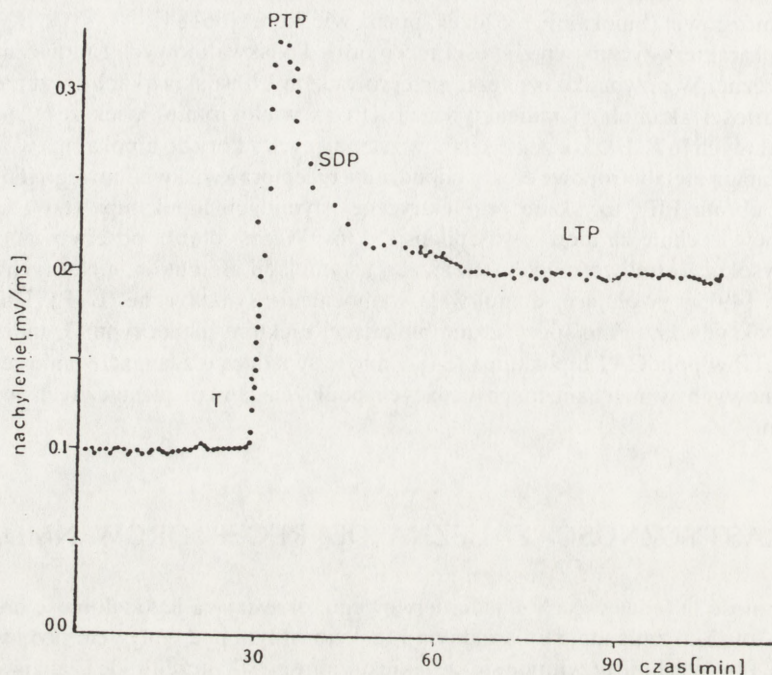
Plastyczność to jedna z cech układu nerwowego, określająca jego zdolność do ulegania względnie trwałym zmianom strukturalnym i funkcjonalnym pod wpływem przetwarzanych informacji. Powszechnie przyjmuje się, że takie czynności, jak: uczenie się i zapamiętywanie, związane są z reorganizacją sieci neuronalnej w ramach dwóch podstawowych form zmian plastycznych. Są to zmiany w:

- (a) poziomie przekaźnictwa synaptycznego (tj. jego wzrost lub spadek),
- (b) rozkładzie połączeń synaptycznych [10].

Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. LTP od *long-term synaptic potentiation*) jest pierwszą z wymienionych form zmian plastycznych. Niepowtarzalne cechy tego zjawiska sprawiają, że znajduje się ono w centrum zainteresowania współczesnej neurobiologii. Uważa się je za neuronalny model procesu zapamiętywania [10].

Zjawisko długotrwałego wzmocnienia synaptycznego występuje zarówno u kręgowców, jak i u bezkręgowców w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [6, 10]. Efekt ten polega na długotrwałym (rzędu godzin–tygodni) [5, 6] wzroście przekaźnictwa synaptycznego, klasycznie wywoływanego krótką (0,1–1,0 s), wysokoczęstotliwościową (tetaniczną) (100–400 Hz) stymulacją elektryczną ściśle określonych włókien nerwowych [9]. Wielkość wzmocnienia synaptycznego mierzy się różnicą amplitud potencjału synaptycznego komórki, wywołanego standardowym impulsem elektrycznym po i przed tetanizacją (rys. 2) [6, 42].

W 1988 roku Bliss i Lynch [6] sformułowali "prawo" indukcji LTP. Brzmi ono następująco: "*W danej synapsie LTP można wywołać wtedy i tylko wtedy, gdy jest ona aktywowana w tym samym czasie, w którym dendryt, na którym jest ona ulokowana, jest dostatecznie zdepolaryzowany*". Twierdzenie to jest poparte wynikami szeregu doświadczeń. LTP nie można zaindukować, gdy błona postsynaptyczna nie jest zdepolaryzowana do poziomu przynajmniej -30 mV [50] przez ponadprogową, tetaniczną stymulację [68] lub wstrzyknięcie depolaryzującego prądu do komórki postsynaptycznej [27, 41]. W tym ostatnim przypadku, LTP



Rys. 2. Indukcja i rozwój długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP): T (od tetanus) – moment indukcji LTP; PTP i SDP – fazy rozwijającego się LTP; wartości wzmocnienia synaptycznego wyrażono w jednostkach przyrostu wartości e.p.s.p. (mV) w czasie (ms)

można uzyskać stymulując aferenty pojedynczymi impulsami, ale tylko podczas wstrzykiwania prądu w neuron postsynaptyczny [27]. Indukcja LTP wymaga również obecności zewnątrzkomórkowego  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Wstrzyknięcie EGTA (wiążącego specyficznie jony wapnia) do komórek postsynaptycznych redukuje prawdopodobieństwo indukcji LTP [47].

Istnieją przynajmniej trzy możliwe mechanizmy służące utrzymaniu wzmocnienia [5]:

- (a) zwiększone wydzielanie neuroprzekaźnika z zakończeń presynaptycznych,
- (b) wzrost liczby "czynnych" receptorów postsynaptycznych oraz
- (c) zmiany w morfologii synaps prowadzące do wzrostu pobudliwości elementów postsynaptycznych.

Dotychczas tylko dwie pierwsze możliwości doczekały się doświadczalnego potwierdzenia [6, 13]. Zarówno w zakręcie zębatym, jak i w polu CA1 formacji hipokampa stwierdzono zwiększone stężenie glutamianu i asparagianu w przestrzeni międzykomórkowej po tetanicznej stymulacji aferentów tej struktur i to tylko takiej, która wywołuje LTP [48]. Efekt ten, podobnie jak i LTP, był specyficznym blokowany przez APV, podany w momencie tetanizacji [6] i zależny przynajmniej in vitro od jonów wapnia. Na nie zmienionym poziomie pozostawało także zwrotne pobieranie tych substancji [48]. Te i inne [4, 6] dane wskazują na fakt zwiększonego wydzielania neuroprzekaźników z zakończeń presynaptycznych. Stwierdzono również wzrost odpowiedzi receptorów AMPA po indukcji LTP [13].

Obecny etap badań nad LTP wiąże się z poszukiwaniem mechanizmów molekularnych, leżących u podstaw zwiększonego wskutek tetanizacji wydzielania neuroprzekaźnika oraz z próbami wyjaśnienia procesów zawiadujących utrzymywaniem się tego zjawiska w komórkach postsynaptycznych. Wydaje się, że zwiększone wydzielanie neuroprzekaźnika jest konsekwencją podwyższonej "wrażliwości" elementów presynaptycznych na  $Ca^{2+}$  i zwiększeniem jego pobierania [6]. Interesujący wydaje się również fakt blokowania indukcji LTP oraz towarzyszącego jej wzrostu wydzielania glutaminy z zakończeń presynaptycznych przez kwas nor-dihydroguaiaretowy (NDGA) [90]. Związek ten jest blokerem między innymi lipooksygenaz, metabolizujących kwas arachidonowy (pochodzący np. z diacyloglicerolu) do hydroksy- oraz hydroksy-peroksy-eikosanoidów. Istnieją przypuszczenia, że pochodne kwasu arachidonowego działają jako przekaźniki pomiędzy elementami postsynaptycznymi, w których następuje wywołanie LTP (patrz wyżej), a presynaptycznymi, w których zachodzą przemiany metaboliczne prowadzące do intensyfikacji uwalniania glutaminy [90]. Jednocześnie wiadomo, że stymulacja receptorów NMDA rzeczywiście prowadzi do uwolnienia kwasu arachidonowego [44]. W dodatku kwas arachidonowy stymuluje wydzielanie glutaminy [25] jednocześnie hamując jego pobieranie przez zakończenia nerwowe [3].

Jony wapnia, jak już wspomniano, odgrywają kluczową rolę w wytwarzaniu LTP po stronie postsynaptycznej. Zmiany w poziomie wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  sugerują udział w zjawisku LTP kinaz białkowych zależnych od tych jonów. Jak dotąd, stwierdzono udział trzech kinaz zależnych od  $Ca^{2+}$ . Są to: kinaza białkowa C, CAM II (kinaza typu drugiego, zależna od  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny) oraz kinaza tyrozynowa [52, 71]. Z LTP związane są również procesy fosforylacji białek [6]. Dodatkowo, Stanton i Sarvey [6] wykazali, że obecność: emetyny, uromycyny i cykloheksimidu, inhibitorów syntezy białek, uniemożliwia indukcję LTP w polu CA1 hipokampa. Zaobserwowano, że indukcji LTP towarzyszy wzrost wydzielania szeregu różnych białek z neuronów (prawdopodobnie postsynaptycznych). Nie wiadomo przy tym, czy wydzielane białka są tymi samymi, których synteza rośnie w następstwie tetanizacji [6].

## TOKSYCZNOŚĆ DLA KOMÓREK ZALEŻNA OD RECEPTORÓW DLA GLUTAMINIANY

Generalnie, badania *in vitro* wskazują na istnienie dwu typów toksyczności [79]:

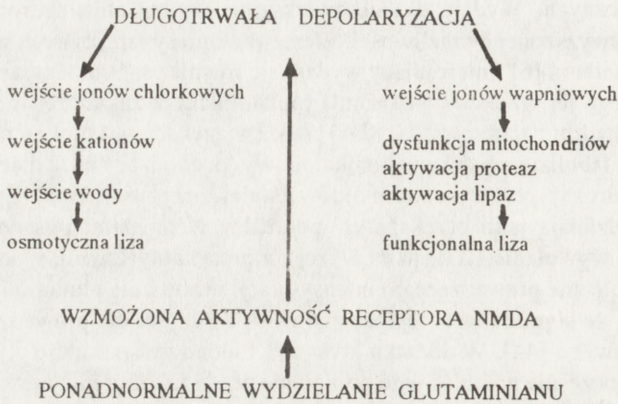
(a) toksyczność bezpośrednia (wczesna), będąca efektem depolaryzacji: glutaminian wiąże się z odpowiednimi receptorami, co ze względu na jego nadmiar prowadzi do długotrwałej depolaryzacji neuronu, związanej ze wzrostem przepuszczalności jonów przez kanały jonowe; jony chlorkowe wnikają do wnętrza neuronu zgodnie z gradientem stężeń; dla zachowania elektroneutralności do komórki wnikają również kationy  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  oraz woda; neuron staje się hiperosmotyczny i pęcznieje, czego konsekwencją może być jego osmotyczna liza;

(b) toksyczność "późna", w której czynnikiem inicjującym są jony wapnia napływające w olbrzymiej ilości przez kanały jonowe związane z receptorami NMDA; jony te indukują szereg procesów wewnątrzkomórkowych, w których uczestniczą: kalpaina, kinaza C, fosfolipaza A<sub>2</sub>, kinaza II zależna od kalmoduliny i inne [59].

W działaniu uszkodzającym kluczowe znaczenie ma aktywacja proteaz i lipaz enzymatycznie degradujących konstrukcję komórki (rys. 3) [79]. Najczęściej oba typy toksyczności są ze sobą sekwencyjnie powiązane tzn. pierwsza poprzedza drugą. Dane eksperymentalne

## ● USZKODZENIE OSMOTYCZNE

## ● USZKODZENIE ZALEŻNE OD WAPNIA



Rys. 3. Schemat dwufazowej sekwencji zdarzeń prowadzących do śmierci komórki pod wpływem niefizjologicznych stężeń glutaminianu

wskazują jednak, że są to procesy niezależne. Manipulując środowiskiem jonowym lub metabolizmem komórki można wpływać na oba rodzaje toksyczności niezależnie [59]. Receptory NMDA mają zasadnicze znaczenie w cytotoksycznym działaniu kwasu glutaminowego, bowiem ich antagoniści hamują toksyczne działanie tego związku w różnych modelach *in vitro*, jak również w sytuacji *in vivo* [59].

Przypuszcza się, że zmiany nekrotyczne określonych obszarów mózgowia związane z różnymi stanami patologicznymi OUN (choroby: Huntingtona i Alzheimera; skutki: hipoglikemii, anoksji, epilepsji itd.), mogą być przynajmniej częściowo skutkiem ponadnormalnego wydzielania glutaminianu lub innych agonistów receptorów glutaminianoergicznych przez komórki OUN [18, 79].

Sugerowane są co najmniej trzy możliwe przyczyny tego rodzaju nadczynności:

- (a) niedokrwienie mózgu (ischemia mózgu) lub nawet samo jego niedotlenienie (anoksja) czy hipoglikemia,
- (b) hyperaktywność neuronów (np. w ogniskach padaczkorodnych),
- (c) niektóre choroby metaboliczne.

Związki chorób Huntingtona i Alzheimera z nadczynnością glutaminianową, jakkolwiek niewątpliwe, są niezupełnie jasne.

Najlepiej poznany jest syndrom ischemii, związany z szybkimi zmianami neurodegeneracyjnymi, będącymi następstwem zatrzymania dopływu krwi do mózgu w konsekwencji, np. zaciśnięcia tętnic szyjnych [83]. *In vitro* można ten efekt wywołać prowadząc doświadczenia w następujących warunkach:

- (a) beztlenowych [38, 78],
- (b) w środowisku nie zawierającym substratów metabolizmu energetycznego [38],
- (c) przy zahamowanym układzie przekaźników elektronów lub/i zablokowanej glikolizie [38].

Zwiększone w tych warunkach wydzielanie glutaminianu przez neurony jest niezależne od wapnia (tj. nie jest wydzielaniem synaptycznym) i koreluje w czasie ze spadkiem potencjału energetycznego (ATP/ADP) i w konsekwencji potencjału błonowego [38].

Proponuje się następującą sekwencję zdarzeń, prowadzącą do degeneracji neuronów w warunkach odkrwienia mózgu: niski poziom glukozy lub/i tlenu we krwi tętniczej lub obecność odpowiednich inhibitorów metabolizmu energetycznego prowadzi do spadku lub zahamowania aktywności metabolizmu glukozy, czego konsekwencją jest spadek potencjału energetycznego komórki. Niski poziom ATP uniemożliwia utrzymanie potencjału błonowego na normalnym poziomie. Prowadzi to do odwrócenia błonowego gradientu sodowego i w konsekwencji glutaminian, w normalnych warunkach transportowany do wnętrza komórki (na nośniku zależnym od jonów sodu) zaczyna z niej wypływać. Zwiększone stężenie glutaminianu w przestrzeni międzykomórkowej powoduje wyżej opisane skutki [38].

Trzeba dodać, że antagoniści receptorów glutaminianoergicznych, zarówno niespecyficzni (np. D-glutamylglicyna), jak i specyficzni antagoniści receptorów NMDA, skutecznie zapobiegają lub przynajmniej łagodzą skutki zmian degeneracyjnych w kulturach tkankowych neuronów hipokampa, poddanych działaniu warunków beztlenowych [57, 78]. Domózgowe iniekcje antagonistów receptorów NMDA znacznie łagodzą skutki ischemii u szczurów [83]. Wyniki te stwarzają nadzieje na terapeutyczne zastosowanie antagonistów NMDA w przypadku ischemii oraz innych schorzeń OUN, których patomechanizm jest związany z zaburzeniami w homeostazie kwasu glutaminowego. Prawdopodobnie efekty te można będzie osiągnąć nie tylko poprzez działanie na receptory NMDA, ale i na wtórne efekty ich pobudzenia, np. na kinazę C, na co wskazują wyniki eksperymentów *in vitro* [20].

Od dawna wiadomo, że substancje endogenne, których poziom z rozmaitych powodów wzrasta, mogą stać się toksyczne. Glutaminian, przez sam fakt swojego ogromnego rozpowszechnienia oraz obfitość w OUN jest w takiej sytuacji szczególnie niebezpieczny.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANIKSZTEJN L., CHARTON G., BEN-ARI Y. Selective release of endogenous zinc from the hippocampal mossy fibers *in situ*. *Brain Res* 1987; **404**: 58–64.
- [2] ANIS NA., BERRY SC., BURTON NR., LODGE D. The dissociative anaesthetics ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol* 1983; **79**: 565–575.
- [3] BARBOUR B., SZATKOWSKI M., INGLEDEW N., ATTWELL D. Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* 1989; **342**: 918–920.
- [4] BEKKERS JM., STEVENS CF. Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1990; **346**: 724–729.
- [5] BLISS TVP., LÓMOT T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; **232**: 331–356.
- [6] BLISS TVP., LYNCH MA. Long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus: Properties and mechanisms. [w:] Landfield PW., Deadwyler SA. (red.) *Neurology and Neurobiology*. New York: Allan R. Liss Inc. 1988: tom 35, 3–72.
- [7] BOUCHELOUCHE P., BELHAGE B., FRANSDEN A., DREJER J., SCHOUSBOE A. Glutamate receptor activation in cultured cerebellar granule cells increases cytosolic free  $Ca^{2+}$  by mobilization of cellular  $Ca^{2+}$  and activation of  $Ca^{2+}$  influx. *Exp Brain Res* 1989; **76**: 281–291.
- [8] BRISTOW DR., BOWERY NG., WOODRUFF GN. Light microscopic autoradiographic localisation of [3H]glycine and [3H]strychnine binding sites in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1986; **126**: 303–307.

- [9] BROWN TH, CHAPMAN PV, KAIRISS EW, KEENAN CL. Long-term synaptic potentiation. *Science* 1988; **242**: 724–728.
- [10] BYRNE JH. Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev* 1987; **67**: 329–439.
- [11] CHRISTINE CW, CHOI DW. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 1990; **10**: 108–116.
- [12] COLLINGRIDGE G. Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 1987; **330**: 604–605.
- [13] COLLINGRIDGE GL, SINGER W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 290–296.
- [14] CONTI F, RUSTIONI A, PETRUSZ P, TOWLE AC. Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. *J Neurosci* 1987; **7**: 1887–1901.
- [15] COTMAN CW, IVERSEN LL. Excitatory amino acids in the brain - focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 263–265.
- [16] COTMAN CW, MONAGHAN DT, OTTERSEN OP, STORM-MATHISEN J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 273–280.
- [17] DANYSZ W, WROBLEWSKI JT, BROOKER G, COSTA E. Modulation of glutamate receptors by phencyclidine and glycine in the rat cerebellum: cGMP increase in vivo. *Brain Res* 1989; **479**: 270–276.
- [18] EBERHARD DA, HOLZ RW. Intracellular  $Ca^{2+}$  activates phospholipase C. *Trends Neurosci* 1988; **11**: 517–520.
- [19] FAGG GE, FOSTER AC. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 1983; **9**: 701–719.
- [20] FAVARON M, MANEV H, SIMAN R, BERTOLINO M, SZEKELY AM, DeERAUSQUIN G, GUIDOTTI A, COSTA E. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1983–1987.
- [21] FLETCHER EJ, LODGE D. Glycine reverses antagonism of N-methyl-D-aspartate (NMDA) by 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 (HA-966) but not by D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-AP5) on rat cortical slices. *Eur J Pharmacol* 1988; **151**: 161–162.
- [22] FONNUM F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; **42**: 1–11.
- [23] FOSTER AC, FAGG GE. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res* 1984; **319**: 103–164.
- [24] FOSTER AC, FAGG GE. Acidic amino acid receptor nomenclature: time for change [letter]. *Trends Neurosci* 1988; **11**: 17–18.
- [25] FREEMAN EJ, TERRIAN DM, DORMAN RV. Presynaptic facilitation of glutamate release from isolated hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid. *Neurochem Res* 1990; **15**: 743–750.
- [26] GANNON RL, BATY LT, TERRIAN DM. L(+)-2-amino-4-phosphonobutyrate inhibits the release of both glutamate and dynorphin from guinea pig but not rat hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Brain Res* 1989; **495**: 151–155.
- [27] GUSTAFSSON B, WIGSTRÖM H, ABRAHAM WC, HUANG Y-Y. Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J Neurosci* 1987; **7**: 774–780.
- [28] HOLOPAINEN I, ENKVIST MOK, AKERMAN KEO. Glutamate receptor agonists increase intracellular  $Ca^{2+}$  independently of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1989; **98**: 57–62.
- [29] HERTZ L, KVAMME E, McGEER EG, SCHOUSBOE A. Glutamine Glutamate and GABA in the Central Nervous System. New York: Allan R. Liss Inc. 1984.
- [30] HONORE T, DREJER J, NIELSEN M. Calcium discriminates two [3H]kainate binding sites with different molecular target sizes in rat neocortex. *Neurosci Lett* 1986; **65**: 47–52.
- [31] HONORE T, DAVIES SN, DREJER J, FLETCHER EJ, JACOBSEN P, LODGE D, NIELSEN F. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 1988; **241**: 701–703.
- [32] HONORE T, DREJER J, NIELSEN EO, NIELSEN M. Non-NMDA glutamate receptor antagonist 3H-CNQX binds with equal affinity to two agonist states of quisqualate receptors. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 3207–3212.
- [33] HONORE T, DREJER J, NIELSEN EO, NIELSEN M. Non-NMDA glutamate receptor antagonist 3H-CNQX binds with equal affinity to two agonist states of quisqualate receptors. *Biochem Pharmacol* 1989; **38**: 3207–3212.
- [34] HONORE T, DREJER J, NIELSEN EO, WATKINS JC, OLVERMAN HJ, NIELSEN M. Molecular target size analyses of the NMDA-receptor complex in rat cortex. *Eur J Pharmacol* 1989; **172**: 239–247.
- [35] HUETTNER JE, BEAN BP. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 1307–1311.



- [36] IADOROLA MJ, NICOLETTI F, NARANJO JR, PUTNAM F, COSTA E. Kindling enhances the stimulation of inositol phospholipid hydrolysis elicited by ibotenic acid in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1986; **374**: 174–178.
- [37] JOHNSON JW, ASCHER P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987; **325**: 529–531.
- [38] KAUPPINEN RA, McMAHON HT, NICHOLLS DG.  $\text{Ca}^{2+}$  - dependent and  $\text{Ca}^{2+}$  - independent glutamate release, energy status and cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience* 1988; **27**: 175–182.
- [39] KEMP JA, FOSTER AC, LEESON PD, PRIESTLEY T, TRIDGETT, IVERSEN LL, WOODRUFF GN. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6547–6550.
- [40] KISHIMOTO H, SIMON JR, APRISON MH. Determination of the equilibrium dissociation constants and number of glycine binding sites in several areas of the rat central nervous system, using sodium-independent system. *J Neurochem* 1981; **37**: 1015–1024.
- [41] KELSO SR, GANONG AH, BROWN TH. Hebbian synapses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 5326–5330.
- [42] KENNEDY MB. Synaptic memory molecules. *Nature* 1988; **335**: 770–772.
- [43] KLECKNER NW, DINGLEDINE R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988; **214**: 835–837.
- [44] LAZAREWICZ JW, WROBLEWSKI JT, PALMER ME, COSTA E. Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulates arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1988; **27**: 765–769.
- [45] LODGE D, COLLINGRIDGE G. Les agents provocateurs: a series on the pharmacology of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 22–24.
- [46] LOGAN WJ, SNYDER SM. Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in central nervous tissue of the rat. *Nature* 1971; **234**: 297–299.
- [47] LYNCH G, LARSON J, KELSO S, BARRIONUEVO G, SCHOTTLER F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* 1983; **305**: 719–721.
- [48] LYNCH MA, ERRINGTON ML, BLISS TVP. Long-term potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus: increased release of [ $^{14}\text{C}$ ]glutamate without increase in receptor binding. *Neurosci Lett* 1985; **62**: 123–129.
- [49] LYNCH MA, CLEMENTS MP, ERRINGTON ML, BLISS TVP. Increased hydrolysis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in long-term potentiation. *Neurosci Lett* 1988; **84**: 291–296.
- [50] MacDERMOTT AD, DALE N. Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 280–284.
- [51] MacDONALD JF, NOWAK LM. Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 167–172.
- [52] MALINOW R, SCHULMAN H, TSIEN RW. Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science* 1989; **245**: 862–866.
- [53] MANZONI O, FAGNI L, PIN J-P, RASSENDREN F, POULAT F, SLADECZEK F, BOCKAERT J. (trans)-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate stimulates quisqualate phosphoinositide-coupled receptors but not ionotropic glutamate receptors in striatal neurons and *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 1990; **38**: 1–6.
- [54] MASU M, TANABE Y, TSUCHIDA K, SHIGEMOTO R, NAKANISHI S. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 1991; **349**: 760–765.
- [55] MATTHIES H. Neurobiological aspects of learning and memory. *Ann Rev Psychol* 1989; **40**: 381–404.
- [56] MAYER ML, WESTBROOK GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 1987; **28**: 197–276.
- [57] MAYER ML, WESTBROOK GL. Cellular mechanisms underlying excitotoxicity. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 59–61.
- [58] MAYER ML, MILLER RJ. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in mammalian neurons. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 254–260.
- [59] MELDRUM B, GARTHWAITE J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 379–387.
- [60] MITCHELL CK, REDBURN DA. AP4 inhibits chloride-dependent binding and uptake of [ $^3\text{H}$ ]glutamate in rabbit retina. *Brain Res* 1988; **459**: 298–311.
- [61] MONAGHAN DT, YAO D, COTMAN CW. Distribution of [ $^3\text{H}$ ]AMPA binding sites in rat brain as determined by quantitative autoradiography. *Brain Res* 1984; **324**: 160–164.

- [62] MONAGHAN DT, OLVERMAN HJ, NGUYEN L, WATKINS JC, COTMAN CW. Two classes of N-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 9836–9840.
- [63] MORIYOSHI K, MASU M, ISHII T, SHIGEMOTO R, MIZUNO N, NAKANISHI S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 1991; **354**: 31–36.
- [64] MORRIS RGM, ANDERSON E, LYNCH GS, BAUDRY M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 1986; **319**: 774–776.
- [65] NICOLETTI F, WROBLEWSKI JT, ALHO H, EVAC, FADDA E, COSTA E. Lesions of putative glutamatergic pathways potentiate the increase of inositol phospholipid hydrolysis elicited by excitatory amino acids. *Brain Res* 1987; **436**: 103–112.
- [66] NICOLETTI F *in*. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1986; **6**: 1905–1911.
- [67] NICOLETTI F, IADOROLA MJ, WROBLEWSKI JT, COSTA E. Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with alpha 1-adrenoceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 1931–193.
- [68] NICOLL RA, KAUER JA, MALENKA RC. The current excitement in long term potentiation. *Neuron* 1988; **1**: 97–103.
- [69] NOVELLI A, NICOLETTI F, WROBLEWSKI JT, ALHO H, COSTA E, GUIDOTTI A. Excitatory amino acid receptors coupled with guanylate cyclase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 1987; **7**: 40–47.
- [70] NOWAK L, BREGESTOVSKI P, ASCHER P, HERBET A, PROCHIANTZ A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; **307**: 462–465.
- [71] O'DELL TJ, KANDEL ER, GRANT SGN. Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 1991; **353**: 558–560.
- [72] OLNEY JW. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1990; **30**: 47–71.
- [73] PETERS S, KOH J, CHOI DW. Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* 1987; **236**: 589–593.
- [74] RANSOM RW, STEC NL. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 1988; **51**: 830–836.
- [75] ROBINSON MB, CROOKS SL, JOHNSON RL, KOERNER JF. Displacement of DL-[3H]-2-amino-4-phosphonobutanoic acid ([3H]APB) binding with methyl-substituted APB analogues and glutamate agonists. *Biochemistry* 1985; **24**: 2401–2405.
- [76] ROBINSON MB, BLAKELY RD, COUTO R, COYLE JT. Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *J Biol Chem* 1987; **262**: 14498–14506.
- [77] ROBINSON MB, COYLE JT. Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J* 1987; **1**: 446–455.
- [78] ROTHMAN SM. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 1984; **4**: 1884–1891.
- [79] ROTHMAN SM, OLNEY JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 299–301.
- [80] SAITO M, KAWAI N, MIWA A, PAN-HOU H, YOSHIOKA M. Spider toxin (JSTX) blocks glutamate synapse in hippocampal pyramidal neurones. *Brain Res* 1985; **346**: 397–399.
- [81] SHOEPPE D, BOCKERT J, SLADDECZEK F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 508–515.
- [82] SHEARDOWN MJ, NIELSEN EO, HANSEN AJ, JACOBSEN P, HONORE T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 1990; **247**: 571–574.
- [83] SIMON RP, SWAN JH, GRIFFITHS T, MELDRUN BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 1984; **226**: 850–852.
- [84] SLADDECZEK F, RECASENS M, BOCKAERT J. A new mechanism for glutamate receptor action: phosphoinositide hydrolysis. *Trends Neurosci* 1988; **11**: 545–549.
- [85] SOMMER B, KEINANEN K, VERDOORN TA, WISDEN W, BURNASHEV N, HERB A, KOHLER M, TAKAGI T. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 1990; **249**: 1580–1584.
- [86] SUGIYAMA H, ITO I, HIRONOC. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 1987; **325**: 531–533.

- [87] TRAYNELIS SF, CULL-CANDY SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 1990; **345**: 347-350.
- [88] WATKINS JC, OLVERMAN HJ. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 1987; **10**: 265-272.
- [89] WATKINS JC, KROGSGAARD-LARSEN P, HONORE T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990; **11**: 25-33.
- [90] WILLIAMS JH, BLISS TVP. Induction but not maintenance of calcium-induced long-term potentiation in dentate gyrus and area CA1 of the hippocampal slice is blocked by nordihydroguaiaretic acid. *Neurosci Lett* 1988; **88**: 81-85.
- [91] WILLIAMS K, ROMANO C, DICHTER MA, MOLINOFF PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 1991; **48**: 469-498.
- [92] WOOD PL, EMMET MR, RAO TS, MICK S, CLER J, IYENGAR S. In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidenced by increased cerebellar cyclic GMP. *J Neurochem* 1989; **53**: 979-981.
- [93] WROBLEWSKI JT, NICOLETTI F, FADDA E, COSTA E. Phencyclidine is a negative allosteric modulator of signal transduction at two subclasses of excitatory amino acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5068-5072.
- [94] WROBLEWSKI JY, FADDA E, MAZETTA J, LAZAREWICZ JW, COSTA E. Glycine and D-serine act as positive modulators of signal transduction at N-methyl-D-aspartate sensitive glutamate receptors in cultured cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1989; **28**: 447-452.
- [95] YEH G-C, BONHAUS DW, McNAMARA JO. Evidence that zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel activation by noncompetitive antagonism of glycine binding. *Mol Pharmacol* 1990; **38**: 14-19.

Otrzymano: 05.07.1991 r.

Przyjęto: 30. 01. 1992 r.

Adres autorów: Instytut Biologii Dóświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa, ul. Pasteura 3



# ROLA BIOLOGICZNA I WŁASNOŚCI WYBRANYCH RECEPTORÓW KOMÓRKOWYCH ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM RECEPTORÓW NA POWIERZCHNI HEPATOCYTÓW

## BIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND PROPERTIES OF SOME CELL RECEPTORS ESPECIALLY ON THE SURFACE OF HEPATOCYTES

Piotr KAPUSTA, Anna Maria KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego

**Streszczenie.** W artykule zestawiono wiadomości o powierzchniowych receptorach glikoprotein o zmodyfikowanej części cukrowej, receptorach wybranych hormonów, tj. insuliny, glukagonu, receptorów  $\beta$ -adrenergicznych, jak również receptorów niektórych polipeptydów na przykładzie transferyny, EGF i IL-6. Szczególną uwagę zwrócono na komórki wątroby, gdzie od działania wyżej wymienionych ligandów zależy zarówno degradacja, jak i biosynteza de novo odpowiednich glikoprotein lub endocytoza pewnych kationów (np. transferyny). Podkreślono podobieństwo mechanizmów działania różnych ligandów na komórkę tam, gdzie to było możliwe.

**Summary.** Information about surface receptors of glycoproteins with altered sugar part, receptors of some hormones i.e. insulin, glucagon,  $\beta$ -adrenergic receptors as well as receptors of some polipeptides (transferrin, EGF, IL-6) were presented. Special attention was paid on liver cells, where action of various ligands influences proper degradation and de novo biosynthesis of some glycoproteins or internalization of some cations (i.e. transferrin). Similarity in mechanisms of action of different ligands on cell was stressed if possible.

**Stosowane skróty:** EFP – endocytoza fazy płynnej, EFS – endocytoza fazy stałej, RME – endocytoza za pośrednictwem receptorów, EGF – epidermalny czynnik wzrostu, IGF-I – insulinopodobny czynnik wzrostu, PDGF – czynnik wzrostu płytek krwi, NK – komórki cytotoksyczne NK, IL-6 – interleukina 6, m. cz. – masa cząsteczkowa, kDa – kilodaltony, komórki Kupffera – makrofagi wątrobowe, Gal – reszty galaktozy, GalN – reszty galaktozaminy, Glc – reszty glukozy, GlcN – reszty glukozaminy, SA – reszty kwasu sjałowego, Man – reszty mannozy, DAG – diacyloglicerol, 3PI – trifosfoinozytol, 4PI – tetrafosfoinozytol, GTP – guanozynotrifosforan, PAGE – NaDodSO<sub>4</sub> – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z użyciem siarczanu dodecylu sodu

### WSTĘP

Obecnie przyjmuje się, że istnieją dwa podstawowe mechanizmy wprowadzania różnych substancji do wnętrza komórki: endocytoza fazy stałej i endocytoza fazy płynnej (tzw. pinocytoza) [93]. Szczególnie wydajnym procesem jest tzw. endocytoza za pośrednictwem receptorów (ang. *receptor mediated endocytosis* – RME). W czasie tego procesu cząstki

ligandu wiążą się ze swoistymi receptorami lub tzw. miejscami wiążącymi na powierzchni błony komórkowej komórki docelowej. Tartakoff [93] identyfikuje ten sposób wprowadzenia ligandu z pierwszym rodzajem endocytozy. Autor ten podaje jeszcze jeden ze sposobów pobierania ligandów zewnątrzkomórkowych, zwany angielskim terminem *recapture*, będący szczególnym połączeniem egzocytozy z następującą po niej endocytozą za pośrednictwem opłaszczonych dołków i pęcherzyków. Dzięki endocytozie takie cząstki, jak: hormony, toksyny, enzymy, lipoproteiny, asjaloglikoproteiny i inne glikoproteiny o zmienionej części cukrowej, szczególnie z końcowymi resztami Man, GlcN czy GalN, są wprowadzane do wnętrza komórki po związaniu ze swoistym receptorem leżącym na powierzchni błony plazmatycznej [24]. Taki receptor jest sam polipeptydem, zwykle glikozylowanym i po związaniu z odpowiednim dla siebie ligandem wnika do wnętrza komórki.

Rozróżnia się tu dalsze możliwości: albo degradacja receptora i ligandu w obrębie lizosomów [34]: np. insulina związana za swoistym receptorem w komórkach typu limfocytów ludzkich IM-9 [77] czy fibroblastów 3T3-C2 [39] albo po uprzednim wprowadzeniu do wnętrza komórki kompleksu ligand-receptor odszczepienie ligandu i jego degradacja w lizosomach z równoczesnym powrotem receptora na powierzchnię komórki: np. receptory asjaloglikoprotein [93] lub część receptorów insuliny [50].

Trzecią podstawową drogą "krążenia receptorów" po związaniu z ligandem i wprowadzeniu tego kompleksu do komórki jest jego powtórny powrót na powierzchnię błony plazmatycznej: np. część receptorów insuliny w hepatocytach [22] lub w adipocytach [50] czy receptory transferyny [93].

Te trzy główne drogi przemian ligandu związanego z receptorem mogą mieć ponadto różne modyfikacje np. dla receptorów reszt Gal w hepatocytach po oddysocjowaniu ligandu, receptory muszą przejść stadium inaktywacji, reaktywacji i dopiero po tym powracają powtórnie na powierzchnię komórki [54] lub jak w przypadku transferyny po oddysocjowaniu jonów żelaza kompleks receptor-apotransferyna powraca na powierzchnię komórki [93]. Proces ten trwa zwykle od kilku do kilkunastu minut. Receptory mogą również po związaniu ligandu (głównie hormonów) oddziaływać na metabolizm komórki bez wnikania do jej wnętrza poprzez system tzw. drugiego przekaźnika: np. układ cyklazy adenylowej. Stan czynnościowy tych receptorów może ulegać zmianom z wiekiem komórki [35] lub być odeń niezależny [38]. Dzięki doskonaleniu nowych metod badania kompleksów ligand-receptor, sposób ich oddziaływania, struktura, położenie w błonie plazmatycznej, jak i biologiczne efekty ich działania [88] są coraz lepiej poznawane.

## WĄTROBOWE RECEPTORY GLIKOPROTEIN O ZMODYFIKOWANEJ CZĘŚCI CUKROWEJ GŁÓWNIENIE RECEPTORY RESZT GALAKTOZY

Badania mechanizmów usuwania z krążenia glikoprotein o niekompletnej lub zmienionej części cukrowej (szczególnie po stronie terminalnej) było jedną z przyczyn badania miejsc wiążących te związki na powierzchni różnych komórek, co w konsekwencji doprowadziło do poznania ich receptorów. In vivo istnieją dwa warianty usuwania takich niekompletnych glikoprotein: pierwszy tzw. droga zależna od wątroby i wariant drugi zwany niezależnym od wątroby [83]. W tym ostatnim procesie biorą udział komórki śledziony, szpiku i układu

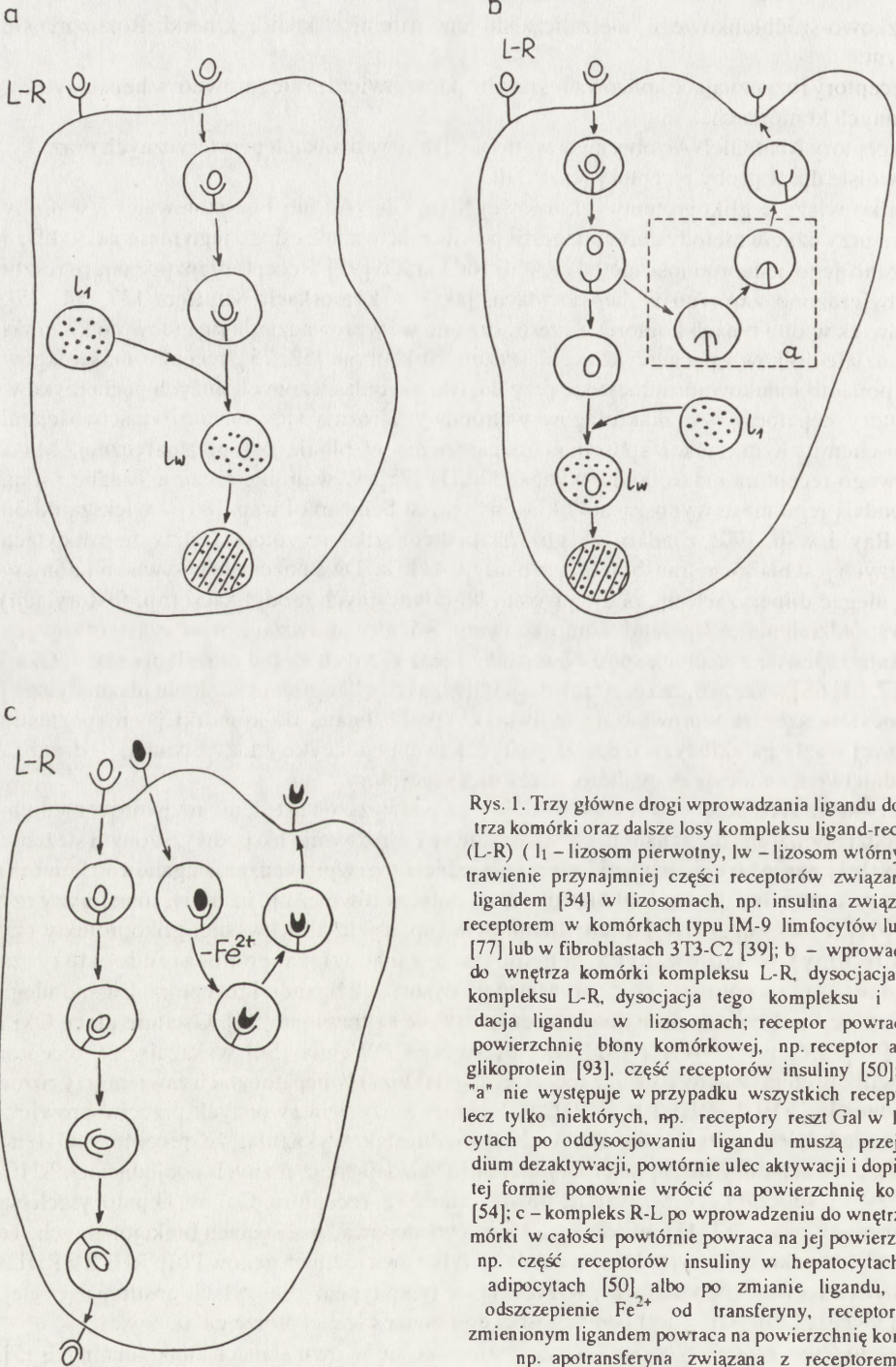
siateczkowo-śródbłonkowego, nie zalicza się tutaj natomiast komórek nerki. Rozróżnia się przy tym:

- receptory rozpoznające końcową resztę Glc, które stwierdza się zarówno w hepatocytach, jak i innych komórkach,
- receptory Man/GlcNAc obecne w wątrobie, jak i w tkankach peryferycznych oraz
- swoiste dla wątroby receptory reszł Gal.

Białko wiążące glikoproteiny o końcowej Man, GlcNAc lub Fuc izolowano z wątroby szczura przy użyciu metody chromatografii powinowactwa, określono jego masę na 30 kDa i wykazano jego jednorodność metodą PAGE NaDodSO<sub>4</sub> [95]. Receptory rozpoznające reszty Gal stwierdzono zarówno w hepatocytach, jak i w komórkach Kupffera [37, 54, 75]. Jakkolwiek w obu typach komórek uczestniczą one we wprowadzaniu ligandów do komórki przy udziale dołków i pęcherzyków opłaszczonych klatryną [52, 75], receptor makrofagów może ponadto indukować endocytozę przy udziale nie opłaszczonych dużych pęcherzyków. Receptory hepatocytów i makrofagów wątrobowych różnią się ponadto właściwościami fizyko-chemicznymi, jak i sposobem rozgałęzienia w błonie cytoplazmatycznej. Masa błonowego receptora makrofagów wynosi 30 kDa [75]. W wątrobie szczura Tanabe i wsp. [91] podają jego masę wynoszącą 47 kDa, natomiast Schwartz i wsp. [86] – większą od 30 kDa. Ray i wsp. [70] zbadali, że główna podjednostka receptora Gal w hepatocytach szczurzych jest białkiem transbłonowym o m. cz. 43 kDa. Dwa pozostałe natywne monomery mogą ulegać dimeryzacji np. pod wpływem kowalencyjnych modyfikacji (np. fosforylacji) lub współdziałania z lipidami komórkowymi. Różnice dotyczące mas cząsteczkowych wynikają zapewne z różnych sposobów izolacji oraz różnych metod określania masy. Oka i wsp. [7, 61, 65] wykazali, że receptory desjalylowanych glikoprotein w błonie plazmatycznej hepatocytów szczura wprowadzają w dwojaki sposób ligand do komórki po rozpoznaniu końcowej reszty galaktozy: – jeden za pośrednictwem endocytozy fazy płynnej, – drugi za pośrednictwem endocytozy, w której uczestniczą receptory.

Pierwszy z tych procesów jest niewrażliwy na podwyższone stężenia roztworów medium i zachodzi normalnie, drugi natomiast jest hamowany w roztworach o podwyższonym stężeniu [64]. Należy zaznaczyć, że istnienie więcej niż jednej drogi wprowadzenia ligandu do komórki nie jest swoiste tylko dla asjaloglikoprotein, ale dotyczy również np. insuliny, transferyny czy LDL [61]. Proces degradacji asjaloglikoprotein (np. asjalo-alfa<sub>1</sub>kwaśnej glikoproteiny czy asjalo-fetuiny) w izolowanych hepatocytach zachodzi za pomocą endocytozy za pośrednictwem receptorów, po czym następuje dysocjacja ligandu i receptora. Ligand ulega dezintegracji w lizosomach, natomiast receptory nie są trawione [94]. Ostatnie prace Oki i wsp. [62], Herziga i Weigla [32] oraz McAbeego i Weigla [54] wskazują, że receptor asjaloglikoprotein (zwany również receptorem galaktozy) w hepatocytach zawiera trzy różne podjednostki: RHL1, RHL2 oraz RHL3. Badania z użyciem swoistych przeciwsurowic z różnym udziałem przeciwciał dla tych podjednostek wykazują, że receptory Gal na powierzchni hepatocytów są heteropolimerami i składają się z różnych podjednostek RHL. Autorzy ci sugerują, że wszystkie powierzchniowe receptory Gal w hepatocytach są zbudowane z różnych [51] podjednostek i mogą występować w 2 stanach funkcjonalnych. Te trzy podjednostki RHL są produktem działania tylko dwu różnych genów [70]. RHL2 i RHL3 pochodzą z tego samego polipeptydu i różnią się tylko typem glikozylacji posttranslacyjnej, której ulegają [26]. RHL1 jest podjednostką dominującą w receptorze galaktozy.

Heterogenne receptory mogą jeszcze znajdować się w dwu stanach funkcjonalnych [5], tzn. receptory hepatocytów świeżo izolowane lub w temperaturze poniżej 24°C wykazują



Rys. 1. Trzy główne drogi wprowadzania ligandu do wnętrza komórki oraz dalsze losy kompleksu ligand-receptor (L-R) ( $L_1$  – lizosom pierwotny,  $L_w$  – lizosom wtórny): a – trawienie przynajmniej części receptorów związanych z ligandem [34] w lizosomach, np. insulina związana z receptorem w komórkach typu IM-9 limfocytów ludzkich [77] lub w fibroblastach 3T3-C2 [39]; b – wprowadzenie do wnętrza komórki kompleksu L-R, dysocjacja tego kompleksu i degradacja ligandu w lizosomach; receptor powraca na powierzchnię błony komórkowej, np. receptor asjaloglikoprotein [93], część receptorów insuliny [50]; część "a" nie występuje w przypadku wszystkich receptorów, lecz tylko niektórych, np. receptory reszt Gal w hepatocytach po oddysocjowaniu ligandu muszą przejść stadium dezaktywacji, powtórnie ulec aktywacji i dopiero w tej formie ponownie wrócić na powierzchnię komórki [54]; c – kompleks R-L po wprowadzeniu do wnętrza komórki w całości powtórnie powraca na jej powierzchnię, np. część receptorów insuliny w hepatocytach lub adipocytach [50] albo po zmianie ligandu, np. odszczepienie  $Fe^{2+}$  od transferyny, receptor ze zmienionym ligandem powraca na powierzchnię komórki, np. apotransferyna związana z receptorem



tylko stan 1, receptory hepatocytów w 37°C wykazują stany 1 i 2. Oba te stany różnią się szybkością dysocjacji ligandu po wprowadzeniu do komórki oraz szybkością jego degradacji [97]. Poza tym różnią się wrażliwością na temperaturę i na substancje wpływające na mikrotubule: monezynę [63], chlorochinę, hiperosmolarność [7, 64], NaN<sub>3</sub> [53], NaF, azydki [51] oraz niejonowe detergenty [54, 70]. Badania Petela i Doyle [68] wskazują, że receptor rozpoznający końcowe reszty Gal w asjaloglikoproteinach występuje w bardzo małych ilościach w komórkach płodowej wątroby szczura. Ilość takich miejsc wiążących gwałtownie wzrasta podczas porodu i w ciągu dwu dni osiąga poziom stwierdzany u osobników dojrzałych. Autorzy sugerują, że wynika to z akumulacji cząstek receptorowych, a nie z aktywacji poprzednio już istniejących [68]. Zachodzi głównie synteza polipeptydu o m. cz. 42 kDa oraz mniej wydajna biosynteza polipeptydów o masach 50 i 58 kDa. Według tych autorów wynika to z aktywacji genów odpowiedzialnych za biosyntezę peptydów receptorowych. Dodatkowo obserwuje się syntezę polipeptydów o masach 25 i 27 kDa, które są prawdopodobnie wątrobowymi receptorami reszt mannozowych w glikoproteinach [68]. W przeciwieństwie jednak do receptorów Gal nie osiągają jednak poziomu charakterystycznego dla dojrzałych komórek w tak krótkim czasie po urodzeniu [68].

Nierównomierne jest również wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie receptorów Gal w komórkach wątroby szczura. Na przykład frakcja szorstkich mikrosomów wiąże 1/3 ilości asjaloglikoprotein wiązanych przez frakcję gładkich mikrosomów [82]. W wątrobie szczura aparat Golgiego zawiera znaczne ilości receptora asjaloglikoprotein [71]. McAbee i Weigel [54] stwierdzili w izolowanych hepatocytach krążenie receptorów Gal, przy czym ich nieaktywne formy związane z ligandem są akumulowane wewnątrz komórki. Po ich reaktywacji ponownie powracają na powierzchnię komórki (rys. 1b) [54]. Ostatnie prace Weigla i wsp. [58, 66, 98] wskazują, że krążenie receptorów i ich ciągła inaktywacja i reaktywacja wymagają ATP w stęż. 0,3–3,0 mM, a jest to zależne od czasu i temperatury. Ponieważ receptory Gal same są glikoproteinami, a ich część cukrowa stanowi ok. 10% masy całej cząstki i składa się z reszt SA, Gal, Man, GlcN [82], glikozylacja receptorowego polipeptydu przebiega zwykłą drogą. Przyjmuje się, że okres "półtrwania" tych polipeptydów w wątrobie wynosi ok. 20 godz. [71], a wewnątrzkomórkowy transport nowo syntetyzowanego receptora trwa ok. 1 godz. do osiągnięcia powierzchni komórki. Renee i wsp. [71] sugerują, że w aparacie Golgiego hepatocytów szczurzych istnieje pewna zapasowa pula tych polipeptydów receptorowych (szacowana na ok. 20% wszystkich receptorów komórkowych), która zapewnia niezależność od ich syntezy de novo przynajmniej przez kilka godzin. Jest rzeczą niewątpliwą, że w wątrobie receptory czy też miejsca wiążące w błonie plazmatycznej reszt cukrowych, takich jak: terminalne reszty Gal, GalN czy Man, mają bardzo ważną rolę w wychwytywaniu i usuwaniu z krążenia glikoprotein o zmienionej naturalnie czy sztucznie części cukrowej.

## RECEPTORY WYBRANYCH HORMONÓW

### RECEPTORY INSULINY

Ze wszystkich znanych hormonów wiązanych przez komórki wątrobowe najlepiej poznana jest insulina, a przede wszystkim: sposób wiązania, struktura miejsca wiążącego, wpływ na metabolizm i funkcję komórki docelowej [23]. Mimo że ten hormon znany jest od

ponad 60 lat, jego molekularny sposób działania na różne tkanki docelowe oraz wywoływane przez ten hormon wielokierunkowe efekty biologiczne wymagają jeszcze dalszych badań. Swoiste miejsca wiążące insulinę stwierdzono poza błoną komórkową w kilku organellach wewnątrzkomórkowych, tj. jądrze, gładkiej i szorstkiej siateczce śródplazmatycznej, aparacie Golgiego i lizosomach [19, 23, 41]. Receptory insuliny występują w mięśniach szkieletowych, korze mózgowej, limfocytach B i T, fibroblastach [45], łożysku [29] i kłębuszkach nerkowych [42]. Ich obecność została potwierdzona w wątrobie i to zarówno w izolowanych błonach otrzymanych po homogenizacji narządu [9, 10, 29, 55], jak i na powierzchni komórek, tj. adipocytów wątrobowych [50, 56, 62] i hepatocytów [28, 45, 99].

Obecność receptorów insuliny w wątrobie jest ściśle związana z funkcją, jaką wątroba spełnia w dystrybucji tego hormonu, co wynika z anatomicznej lokalizacji wątroby, jej centralnej funkcji w metabolizmie oraz zdolności do syntetyzowania białek na "eksport", tzn. ich sekrecji do krwioobiegu [2, 44]. Ponadto wątroba jest głównym miejscem degradacji insuliny [41]. Zarówno w hepatocytach, jak i w adipocytach są dwa alternatywne szlaki przemian insuliny związane z receptorem:

- jeden prowadzący do uwolnienia nienaruszonego ligandu po ponownym połączeniu kompleksu ligand-receptor z błoną komórkową (retroendocytoza) i
- drugi, kończący się degradacją ligandu i powrotem wolnego receptora na powierzchnię komórki (rys. 1b, c).

In vitro stwierdzono, że procesy te zachodzą równolegle i niezależnie od siebie [50]. Co ciekawe, w hepatocytach in vitro degradacja insuliny może odbywać się w sposób zależny lub niezależny od chlorochiny [44]. Podobnie jak receptory innych hormonów i substancji biologicznie czynnych receptor insuliny spełnia dwie zasadnicze funkcje: po pierwsze rozpoznaje insulinę spośród wszystkich pozostałych substancji we krwi, wiążąc ją z dużym powinowactwem i swoistością oraz przekazuje sygnał przez błonę, który zmienia metabolizm wewnątrzkomórkowy. Struktura tego receptora jest aktualnie dość dobrze poznana. Pierwsze badania ujawniły, że jest to integralne białko błonowe, ponieważ detergenty są niezbędne do jego upłynnienia [41]. Nowoczesne techniki, takie jak: chromatografia powinowactwa połączona ze znakowaniem radioaktywnym i metodą PAGE NaDodSO<sub>4</sub> oraz metody immunoprecypitacji pozwoliły wyizolować receptor wysoce oczyszczony i określić dokładnie jego strukturę, a także charakter [34]. Przyjmuje się, że strukturę receptora insuliny tworzą dwa rodzaje glikoprotein, nazwane odpowiednio  $\alpha$  i  $\beta$ , z których każda występuje w dwóch kopiach [16]. Różni autorzy podają, że masy tych podjednostek wynoszą: dla podjednostki  $\alpha$  od 125 do 135 kDa, a dla podjednostki  $\beta$  od 90 do 95 kDa [16, 20, 33, 34]. Przyjmuje się, że podjednostki te tworzą kompleks tetrametryczny w układzie  $(\alpha\beta)_2$  i masa tego kompleksu określana jest na 350 kDa. M. Czech i wsp. [16] wyjaśniają częściowo tę różnicę pomiędzy masą kompleksu a sumą mas poszczególnych podjednostek tym, że wewnątrzłańcuchowe mostki dwusiarczkowe utrzymują zwartą strukturę w roztworze detergentu. Haynes i wsp. [28] sądzą, że proces oczyszczania receptora metodą chromatografii powinowactwa może prowadzić do utraty składników receptora związanych z błoną komórkową. Z nienaruszonych komórek wyizolowali oni receptor o masie ok. 450 kDa i wartość ta nie uległa zmianie po traktowaniu receptora kolagenazą, podczas gdy receptor z błon komórkowych poddanych wcześniej działaniu kolagenazy miał masę ok. 360 kDa. Wykazywał także zwiększone powinowactwo do insuliny. Ostatnio niektórzy badacze udowodnili istnienie jeszcze jednej podjednostki receptora insuliny tzw.  $\beta'$  o masie 45 kDa [33, 34]. Nie wiadomo jeszcze, jaka byłaby jej ewentualna funkcja, być może wiąże się ona z regulacją powinowactwa receptora

do insuliny. Inni badacze skłonni są jednak przypisać zmiany powinowactwa receptora do insuliny istnieniem różnych oligomerycznych form receptora [13]. Interesujące jest odkrycie dwu różnych receptorów wyekstrahowanych z frakcji mikrosomalnej wątroby szczura, które są ze sobą blisko spokrewnione, ale różnią się masą cząsteczkową oraz właściwościami wiązania insuliny [40]. Lane i wsp. [43] podają, że receptor insuliny powstaje jako proreceptor o masie 180 kDa, następnie poddanie go szybkiej glikozylacji powoduje wzrost jego masy do 190 kDa. Kolejne przemiany prowadzą do prekursora o masie 210 kDa. Prekursor ulega wolnej proteolizie, po której powstają podjednostki  $\alpha'$  (125 kDa) i  $\beta'$  (83 kDa) (oznaczenie  $\beta'$  używane jest także dla podjednostki receptora insuliny o masie 45 kDa, o której wspomniano poprzednio [33] – występuje tu kolizja stosowania tego samego symbolu dla różnych podjednostek receptora insuliny przez różnych autorów). Około 3 godz. po rozpoczęciu syntezy obie podjednostki są transportowane do aparatu Golgiego, gdzie (po dodaniu reszt SA) są sjałylowane i wbudowywane w błonę komórkową jako właściwe podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  [43].

Durano i wsp. [20] stwierdzili, że kompletna glikozylacja nie jest wcale konieczna do prawidłowej biosyntezy i funkcjonowania receptorów insuliny i IGF-I. Podjednostka  $\beta$  receptora insuliny wykazuje aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej zależnej od insuliny i zdolnej do autofosforylacji [34, 45]. Aktywność tyrozyno-swoistej kinazy białkowej jest stosunkowo rzadka w komórkach i dotychczas była wykazana jedynie dla receptorów EGF, PDGF, IGF-I oraz produktów genów niektórych transformujących wirusów RNA [34]. Ciekawe, że również trypsyna, podobnie jak insulina, stymuluje fosforylację podjednostki  $\beta$  receptora insuliny, co sugeruje, że miejscem działania trypsyny na nienaruszone komórki jest receptor insuliny. Proteolityczne działanie trypsyny na receptor insuliny może być istotne dla generowania sygnału, co przypominałoby wewnątrzkomórkowe działanie insuliny [4]. Dalsze badania nad strukturą i właściwościami receptora insuliny wykazały, że aktywność tyrozynowo-swoistej kinazy białkowej wykazuje domena utworzona z 2/3 podjednostki  $\beta$  licząc od C-końca i znajdująca się w cytoplazmie. Domena ta wykazuje dużą homologię sekwencji aminokwasów do onkogenowych kinaz tyrozynowych [81]. Po zaaktywowaniu kinazy przez przyłączenie insuliny do receptora, jej aktywność enzymatyczna przestaje być zależna od insuliny i jest zdolna do fosforylacji zarówno endogennych, jak i egzogennych białek i peptydów [36, 45, 81, 96]. Stwierdzono, że kationy  $Mg^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  podnoszą aktywność tej kinazy, gdy są obecne w stężeniach przewyższających wymagane do uformowania kompleksu metal-ATP-substrat, co sugeruje istnienie miejsca regulatorowego zależnego od metalu na enzymie [96]. Dotąd nie jest jasne, jak aktywacja kinazy tyrozynowej mogłaby uczestniczyć w przenoszeniu sygnału. Najbardziej oczywistą możliwością jest ta, że kinaza fosforyluje jeden lub więcej substratów, prowadząc do kaskady reakcji fosforylacji i defosforylacji [34]. Takim substratem mogłaby być np. kinaza fosfatydyloinozytolu [21]. Ta kaskada reakcji fosforylacji i defosforylacji byłaby więc decydująca przy przenoszeniu sygnału od insuliny [34, 36]. Wiele danych dowodzi poprawności tego rozumowania, wskazując na prostą korelację między działaniem insuliny a aktywacją różnorodnych kinaz serynowych i treoninowych związanych z błonami lub cytozolem, np. aktywowana proteinazą kinaza II albo S6 kinaza. Co więcej, w pewnych warunkach zaobserwowano wzmożoną fosforylację receptora insuliny *in vitro* przy resztach serynowych [15]. W hepatocytach *in vitro* stwierdzono, że insulina indukuje też wzrost stężenia DAG, któremu towarzyszy wzrost aktywności kinazy białkowej C związanej z błonami i cytozolem [8].

## RECEPTORY GLUKAGONU

Mechanizmy przekazywania sygnału są poznane dość dobrze dla receptorów innych hormonów polipeptydowych, neurotransmiterów i czynników wzrostowych. W przekazywaniu sygnału, np. od glukagonu, bierze udział dobrze scharakteryzowany układ receptor/cyklazy adenylowa. Układ ten zbudowany jest z 3 elementów: receptora swoistego dla glukagonu, białek regulatorowych wiążących nukleotydy guaninowe (zwanymi też białkami  $G_s$  lub białkami  $N_s$ ) i katalitycznej podjednostki enzymu cyklazy adenylowej. Po związaniu się hormonu z receptorem następuje interakcja tego kompleksu z białkiem  $G_s$ , niezbędna dla przekazania sygnału do wnętrza komórki. GTP wiążąc się do białka  $G_s$  doprowadza do dysocjacji związanego receptora. Zaaktywowane w tym procesie białko  $G_s$  stymuluje wytwarzanie cAMP przez enzym aż do przechodzenia związanego GTP w GDP [46, 47].

Ponieważ glukagon oddziałuje głównie na komórki wątroby, obecność w ich błonie plazmatycznej receptorów glukagonu i współdziałanie tych receptorów z cyklazą adenylową były badane już od dość dawna [73,74]. Stwierdzono, że aktywność cyklazy adenylowej zależnej od glukagonu pochodzącej z różnych tkanek ulega zmianom wraz z wiekiem, co najprawdopodobniej wynika z faktu, że cyklaza adenylowa jest enzymem błony plazmatycznej [35]. Receptory glukagonu stwierdzono również w błonach aparatu Golgiego wątroby szczura: receptory te wiązały hormon z mniejszym powinowactwem niż receptory znajdujące się w błonie komórkowej i nie były sprzężone z cyklazą adenylową [46]. W odróżnieniu od wielu innych receptorów, struktura i właściwości chemiczne receptora glukagonu nie są dobrze poznane, wynika to z niestabilności receptora po jego upłynięciu. Mechanizm działania wskazywałby na jego przynależność do wielkiej rodziny receptora  $\beta$ -adrenergicznego. Z błon plazmatycznych wątroby szczura uzyskano 2 białka wiążące glukagon, z których jedno jest receptorem, a drugie układem rozkładającym glukagon. Mają różne powinowactwa wobec tego hormonu oraz różnią się wrażliwością na temperaturę. Ponadto mają różne masy (56 kDa i 43 kDa). McVittie i Gurd [57] stwierdzili, że receptor jest białkiem integralnym, podczas gdy enzym degradujący glukagon jest białkiem powierzchniowym. Z badań Lipsona i wsp. [47] wynika, że do odpowiedniego wiązania glukagonu z receptorem w hepatocytach konieczna jest odpowiednia proporcja stężeń  $GTP/Mg^{2+}$ . Zachowanie właściwej proporcji jest niezbędne do stymulacji cyklazy adenylowej przez ten hormon. Nie są do końca poznane mechanizmy uruchamiane po aktywacji tego układu. Kluczowym etapem stymulowanej przez glukagon glukoneogenezy jest hamowanie kinazy pirogronianu. Odbywa się to w drodze fosforylacji przez kinazę białkową zależną od cAMP [67]. Z drugiej strony enzymem, który warunkuje szybkość glukoneogenezy jest karboksykinaza fosfoenolopirogronianu. Aktywacja genu karboksykinazy fosfoenolopirogronianu odbywa się przez cAMP, ale proces ten nie jest wyjaśniony. Badania prowadzone w hodowlach hepatocytów wykazały, że deksametazon wpływa w istotny sposób na aktywację tego genu przez glukagon, indukując czynnik, zwany TPF [80]. Okazuje się również, że tlen w stężeniach fizjologicznych moduluje aktywację genu karboksykinazy fosfoenolopirogronianu zależnej od glukagonu [31].

RECEPTORY  $\beta$ -ADRENERGICZNE

Jednym z dobrze poznanych receptorów wątrobowych jest receptor  $\beta$ -adrenergiczny. Należy on do "wielkiej rodziny", do której zalicza się także receptory  $\alpha$ -adrenergiczne,

D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>-dopaminergiczne, serotonergiczne i cholinergiczne muskarynowe. Struktura tych receptorów wykazuje uderzające podobieństwo. Wszystkie są zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego od 402 do 590 reszt aminokwasowych, o masie 64–120 kDa. N-koniec, który nie ma sekwencji sygnałowej, zawsze zawiera miejsca dla N-glikozylacji; C-koniec ma typowe miejsca dla fosforylacji przez kinazę białkową A czy inne kinazy. Każdy z tych receptorów zawiera siedem segmentów hydrofobowych (z których każdy ma 22–28 hydrofobowych, konserwatywnych reszt aminokwasowych) rozdzielonych segmentami hydrofilowymi, co bardzo przypomina strukturę bakteriorodopsyny. Wszystkie te receptory określane jako R7G dzielą z bakteriorodopsyną jej osobliwą topologię błonową, w której siedem konserwatywnych, hydrofobowych segmentów tworzy transbłonowe domeny, prawdopodobnie w konformacji  $\alpha$ -helisy. Region N-końcowy, z racji jego glikozylacji znajduje się po zewnętrznej stronie błony komórkowej, podczas gdy region C-końcowy wnika do wnętrza komórki. Segmenty hydrofilowe są albo zewnątrz-, albo wewnątrzkomórkowe. Trzeci segment wewnątrzkomórkowy i segment C-końcowy wykazują duże różnice w długości i sekwencji, co doprowadziło do hipotezy, że te części receptorów R7G są odpowiedzialne za selektywną interakcję z różnymi regulatorowymi białkami G. Być może jest to powodem, że mimo dużego podobieństwa różne receptory oddziałują na różne układy efektorowe. I tak  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>-,  $\beta$ <sub>3</sub>-adrenergiczne, 5HT-1A serotonergiczny i D<sub>1</sub>-dopaminergiczny receptory stymulują cyklazę adenylową przez aktywację białka G<sub>s</sub>. Receptory  $\alpha$ <sub>2A</sub>-,  $\alpha$ <sub>2B</sub>-adrenergiczne, m<sub>2</sub>, m<sub>4</sub> cholinergiczne muskarynowe oraz D<sub>2</sub>-dopaminergiczny hamują cyklazę adenylową przez aktywację białka G<sub>i</sub>, podczas gdy  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenergiczne, m<sub>1</sub>-, m<sub>2</sub>-, m<sub>3</sub>-cholinergiczne muskarynowe i 5HT-1C oraz 5HT-2 serotonergiczne receptory przez związanie się do białka G<sub>i</sub> lub G<sub>o</sub> powodują powstanie dwu drugich przekazników: 3PI/4PI i DAG [90].

Interesujące, że w pewnych procesach mogą uczestniczyć kolejno dwa różne mechanizmy przekazywania sygnału. I tak na przykład w hepatocytach szczurzych w adrenergicznej aktywacji glikogenolizy pośredniczy związany z wapniem mechanizm  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenergiczny, ale w ciągu kilku godzin hodowli komórek lub inkubowania ich w medium bez surowicy jest on zastępowany przez zależny od cAMP mechanizm  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergiczny. Zmiana ta nie jest związana ze znaczącymi zmianami w gęstości receptorów  $\alpha$ <sub>1</sub>- lub  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergicznych. Stwierdzono, że kwas arachidonowy pośredniczy w tym procesie, aczkolwiek wpływa wyłącznie na wzrost zależnej od czasu glikogenolizy  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergicznej, nie powodując równoczesnej redukcji  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenergicznej [25]. Być może zjawisko wyżej opisane występuje powszechniej dla procesów znajdujących się pod kontrolą różnych mechanizmów przenoszenia sygnału, jak choćby wnikanie jonów Ca<sup>2+</sup> do wnętrza komórki, które również może być stymulowane albo przez receptory  $\alpha$ -, albo  $\beta$ -adrenergiczne [3].

## RECEPTORY NIEKTÓRYCH BIAŁEK I POLIPEPTYDÓW

### RECEPTOR TRANSFERYNY

Istnieją dwa podstawowe białka mające znaczenie w zapewnieniu odpowiedniego poziomu żelaza komórkom, którym ten kation jest niezbędny [78]. Są to ferrytyna i transferyna surowicza. W prawidłowej wątrobie 30% puli żelaza z organizmu jest zmagazynowane jako kompleks z ferrytyną. Jest to zapas, który reaguje na zróżnicowane zapotrzebowanie na

żelazo (np. przez szpik kostny), pozwalający na utrzymanie homeostazy [87]. Transferyna jest glikoproteiną syntetyzowaną w wątrobie, złożoną z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o m. cz. 77–80 kDa, tworzy dwie domeny, z których zawiera 1 miejsce wiążące  $\text{Fe}^{3+}$  [89]. Przypuszcza się, że wiąże ona inne jony, np.  $\text{Pu}^{4+}$ ,  $\text{Am}^{3+}$ ,  $\text{Th}^{4+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  [27]. W większości tkanek komórkowy pobór żelaza odbywa się przez receptory transferyny [79]. Receptor transferyny jest błonową, homodimeryczną glikoproteiną o m. cz. ok. 180 kDa. Obie identyczne o m. cz. 90 kDa są kowalencyjnie połączone przez pojedynczy mostek dwusiarczkowy.

Synteza receptora transferyny odbywa się w siateczce śródplazmatycznej z posttranslacyjnymi modyfikacjami tak, że dojrzały receptor ma charakter glikofosfoproteiny z kowalencyjnie związanymi kwasami tłuszczowymi. Każdy funkcjonalny monomer składa się z ok. 760 reszt aminokwasowych. Główną częścią receptora jest C-końcowy fragment o m. cz. 70 kDa sterzący na zewnątrz komórki i wrażliwy na proteolizę trypsyną. Fragment ten zawiera domenę wiążącą transferynę. N-koniec (62-aminokwasowa domena) jest zanurzony w cytoplazmie. Taka orientacja receptora w błonie jest nieco zaskakująca, aczkolwiek wątrobowy receptor asjaloglikoprotein jest zorientowany w błonie w podobny sposób z C-końcem znajdującym się w otaczającym środowisku. Transferyna po związaniu z receptorem jest wprowadzana do wnętrza komórki w drodze RME, zależnej od temperatury [89]. Żelazo oddysocjowuje od transferyny w kwaśnym, ale nielizosomalnym przedziale komórkowym, podczas gdy powstała apotransferyna pozostaje związana z receptorem. Kompleks receptor-apotransferyna wraca z powrotem do błony komórkowej, gdzie przy pH 7,4 następuje szybkie uwolnienie nienaruszonej apotransferyny do otaczającego medium (rys. 1c) [92, 93]. Wolne receptory transferyny znajdują się w stałym cyklu pomiędzy błoną plazmatyczną a endosomami. Ten proces przebiega pod kontrolą hormonów i czynników wzrostowych, takich jak: insulina, EGF i IGF-I, które powodują przemieszczenie receptorów transferyny z wnętrza komórki do błony komórkowej [17, 92]. Stwierdzono, że przynajmniej dla EGF i IGF-I regulacja ta odbywa się dwoma różnymi drogami [17]. W hepatocytach stwierdzono [78, 79, 87] wiązanie żelaza zarówno przez transferynę, jak i przez cząsteczki tego białka pozbawione reszt kwasu sjałowego. Szybkość akumulacji żelaza przy udziale obu tych glikoprotein jest w dojrzałych hepatocytach identyczna. Według Shanny i Granta [87] może to wynikać z małej gęstości receptorów transferyny na powierzchni hepatocytów. Poza tym z badań Rudolpha i Regoecziego [79] wynika, że ok. 75% transferyny w fizjologicznym zakresie stężeń może być pobrana w drodze EFP (endocytozy fazy płynnej).

## RECEPTORY EPIDERMALNEGO (NASKÓRKOWEGO) CZYNNIKA WZROSTU

Epidermalny czynnik wzrostu jest polipeptydem złożonym z 53 reszt aminokwasowych [84]. W hepatocytach prócz stymulacji lipogenezy i transportu alaniny hamuje aktywność fosforylasy glikogenu oraz wzrost ilości cAMP stymulowanej glukagonem i aktywności syntazy glikagonu [69]. Jest to efekt podobny do działania insuliny, prócz tego stymuluje hydrolizę 4,5-difosforanu fosfatydyloinozytolu i podnosi stężenie wolnego  $\text{Ca}^{2+}$ , co przypomina działanie takich hormonów, jak wazopresyna i angiotensyna II [69]. EGF wpływa na wzrost ilości innych receptorów błonowych, np. receptora transferyny [17]. W działaniu EGF pośredniczy jego swoisty receptor błonowy. Jako receptor czynnika wzrostu jest on w pewnym sensie unikalny, ponieważ rozpoznają go i aktywują 3 różne czynniki wzrostowe kodowane przez oddzielne geny (EGF, TGF- $\alpha$ , VEGF). Jakkolwiek istnieje identyczność

struktury tych 3 czynników tylko w 24%, to stwierdzono bardzo duże podobieństwo struktury wiązań dwusiarczkowych [84]. Wszystkie trzy czynniki działają hamująco na siebie przy wiązaniu do receptora EGF, co wskazuje, że wiążą się one do podobnego miejsca na receptorze EGF. Receptor EGF jest glikoproteiną o m. cz. 170 kDa, mającą aktywność tyrozynowo-swoistej kinazy białkowej [12, 18, 49, 84]. Zawiera polipeptyd rdzeniowy złożony ze 1186 reszt aminokwasowych oraz resztę oligosacharydową o m. cz. 36 kDa związaną N-glikozydowo. Podobnie jak wiele innych receptorów, receptor EGF powstaje jako proreceptor o m. cz. 160 kDa, który w czasie  $t_{1/2} = 30$  min przechodzi modyfikację, po której nabiera zdolności wiązania ligandu. Szczególnie ważna jest N-glikozylacja niezbędna do wiązania EGF. Nie zachodzi przy tym konwersja łańcuchów bogatych w mannozę w złożone łańcuchy zakończone fukozą lub kwasem sialowym [43]. Receptor EGF jest złożony z trzech głównych regionów: dużego, glikozylowanego, zewnątrzkomórkowego regionu wiążącego EGF, domeny błonowej zakotwiczonej ten region zewnątrzkomórkowy, zawierającą pojedynczy łańcuch 23 aminokwasów i część cytoplazmatyczną, która zawiera charakterystyczne reszty typowe dla rodziny genu tyrozynowo-swoistej kinazy. Lizyna 721 i sekwencja Gly-X-Gly-X-Phe-Gly-X-Val, znajdująca się 15 reszt w górę od reszty lizynowej przypuszczalnie służą jako część miejsca wiążącego ATP kinazy tyrozynowej [84]. Domena wiążąca ligand jest strukturą oporną na proteolizę i zawiera dwa konserwatywne regiony 20–25 reszt cysteinowych [100]. Wiązanie EGF do receptora indukuje aktywację tyrozynowo-swoistej kinazy białkowej prowadząc do autofosforylacji i fosforylacji rozmaitych substratów komórkowych [18, 49, 84]. Autofosforylacja występuje przy resztach tyrozyny 1086, jak również 1148 i 1173 [49, 84]. Aktywność tyrozynowo-swoistej kinazy białkowej receptora EGF jest niezbędna dla jego prawidłowej degradacji [84]. Uważa się, że ta prowadzi do wzmożonej ekspresji swoistych genów, a szczególnie jądrowych protoonkogenów *fos* i *myc* [100]. Przyłączenie EGF do receptora wywołuje także fosforylację receptora przy treoninie 654 [18]. Za tę fosforylację odpowiedzialna jest kinaza białkowa C [12, 84]. Fosforylacja tej reszty częściowo hamuje aktywność tyrozynowo-swoistej kinazy receptora, korelując z zabamowaniem cytoplazmatycznej alkalizacji [18], jak również znosi stan wysokiego powinowactwa receptora do EGF i blokuje aktywność mitogenną czynnika wzrostowego [84]. Efekt ten występuje szczególnie silnie, jeśli komórki są traktowane estrami forbolu lub PDGF. Zjawisko takie określane jest jako transmodulacja. Stwierdzono, że estry forbolu i PDGF wywołują fosforylację innych reszt niż treonina 654 i głównym miejscem regulacyjnej fosforylacji wywoływanej przez te czynniki jest treonina 669, która nie jest substratem dla kinazy białkowej C [12, 84].

### RECEPTORY INTERLEUKINY-6 (IL-6)

Jednym z ważniejszych narządów docelowych działania interleukiny-6 (syntetyzowanej głównie przez monocyty, makrofagi, komórki endotelialne i fibroblasty [76, 85]) jest wątroba. W różnych komórkach IL-6 wywołuje różne efekty (np. w komórkach B różnicowanie, w komórkach T aktywację i proliferację, proliferację i regulację wzrostu w niektórych typach komórek nowotworowych *in vitro*) [60, 76, 85]. W hodowlach pierwotnych hepatocytów [1] oraz *in vitro* u szczurów jest głównym induktorem syntezy białek ostrej fazy. IL-6 przekazuje swój sygnał do komórek docelowych przez przyłączenie się do swoistych receptorów powierzchniowych. Receptor IL-6 należy do "wielkiej rodziny" receptorów hematopoetyny. Zaliczamy tu także receptory IL-2 ( $\beta$  podjednostka, znana również jako p75), IL-3, IL-4, IL-7,

prolaktyny, erytropoetyny, GM-CSF oraz hormonu wzrostu [11]. Wszystkie te receptory są glikoproteinami błonowymi typu I z N-końcami znajdującymi się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, z pojedynczą hydrofobową domeną błonową. Główny region homologii między nimi występuje w domenie zewnątrzkomórkowej wiążącej ligand i jest zawarty wewnątrz fragmentu o ok. 210 resztach aminokwasowych. Charakterystycznymi, wysoce konserwatywnymi cechami tego regionu są cztery reszty cysteinowe w połowie tego regionu licząc od N-końca i sekwencja Trp-Ser-X-Trp-Ser umieszczona zaraz za domeną błonową [11]. Receptor IL-6 zawiera ok. 340 aminokwasów w części zewnątrzkomórkowej, 28 w domenie błonowej i 82 w domenie cytoplazmatycznej [30]. Jako wyjątek wśród pozostałych receptorów hematopoetynowych ma on N-końcową domenę immunoglobulinopodobną. Ponadto sekwencja Trp-Ser-X-Trp-Ser umiejscowiona jest od 52 do 56 reszty aminokwasowej, a nie między 18 a 22, jak w pozostałych receptorach [11].

Ponieważ IL-6 wywołuje rozmaite efekty biologiczne w różnych komórkach, można by oczekiwać istnienia różnych receptorów lub różnych dróg przekazywania sygnału. Przez klonowanie cDNA stwierdzono, że wątrobowy receptor IL-6 jest identyczny z 80 kDa białkiem receptorowym, którego ekspresja ma miejsce w ludzkich komórkach NK [85]. Stwierdzono ponadto, że receptor IL-6 występuje w formie monomerycznej i homodimerycznej w komórkach NIH/3T3 [30], natomiast w komórkach ludzkiej hepatomy HepG2 istnieje być może w formie heterodimerycznej [30, 76, 85]. O mechanizmie przekazywania sygnału przez receptor IL-6 niewiele wiadomo. Stwierdzono tylko, że cAMP, cGMP, kinaza białkowa C, fosforany inozytoli i zmiany wewnątrzkomórkowych stężeń  $Ca^{2+}$  nie uczestniczą w przekazywaniu sygnału IL-6 w komórkach ludzkiej i szczurzej hepatomy [30]. Wiadomo natomiast, że deksametazon powoduje regulację poziomu mRNA receptora IL-6, stymulując jego ekspresję na powierzchni komórki [30, 76], co mogłoby mieć znaczenie w indukcji syntezy białek ostrej fazy.

Powyższy przegląd nie jest pełnym zestawieniem wiadomości o receptorach powierzchniowych komórki. Praca taka, wobec licznie ukazujących się danych doświadczalnych dotyczących powierzchniowych białek receptorowych, ich struktury oraz oddziaływania na metabolizm komórki, znacznie przekroczyłaby objętość przewidywaną dla artykułu przeglądowego. Autorzy tej pracy pragnęli przede wszystkim podkreślić rolę i strukturę niektórych białek wiążących na powierzchni komórki, a w wyborze ligandów kierowali się przede wszystkim istotnością oddziaływania kompleksu ligand-receptor na metabolizm glikoprotein (zarówno stymulację syntezy, jak i udział w usuwaniu z krążenia). Należy również podkreślić, że wszystkie wybrane ligandy są białkami, polipeptydami, a w jednym przypadku pochodnymi aminokwasu.

W drugim artykule ( str. 179) autorzy starali się podsumować wiadomości na temat wiązania ligandu niebiałkowego, tj. wybranych pochodnych kwasu arachidonowego do swoistych białek receptorowych błony plazmatycznej. Chcieliśmy też podkreślić w pewnych przypadkach podobieństwo w działaniu do ligandów peptydowych omówionych w niniejszym opracowaniu.

## LITERATURA

- [1] ANDUS T, GEIGER T, HIRANO T, KISHIMOTO T, TRAN-THI TA, DECKER K, HEINRICH PC. Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase response proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur J Biochem* 1988; **173**: 287-293.



- [2] BLACKARD WG, SMITHAND RM, JARETT L. Insulin processing by cultured hepatocytes. *Am J Physiol* 1986; **250**: E148–E155.
- [3] BLACKMORE PF, WAYNICK LE, BLACKMAN GE, GRAHAM CW, SHERRY RS.  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation of parenchymal cell  $Ca^{2+}$  influx. *J Biol Chem* 1984; **259**: 12322–12325.
- [4] CHENG K, LARNER J. Intracellular mediators of insulin action. *Ann Rev Physiol* 1985; **47**: 405–424.
- [5] CLARKE BJ, OKA JA, WEIGEL PM. Degradation of asialoglycoproteins mediated by the galactosyl receptor system in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 17384–17392.
- [6] CLARKE BJ, WEIGEL PM. Recycling of the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1985; **260**: 128–133.
- [7] CLARKE BJ, WEIGEL PM. Differential effects of leupaptin, monensin and colchicine on ligand degradation mediated by two asialoglycoprotein receptor pathways in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1989; **262**: 277–284.
- [8] COOPER DR, HERNANDEZ H, KUO JY, FARESE RV. Insulin increases the synthesis of phospholipid and diacylglycerol and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys* 1990; **276**: 486–494.
- [9] CORIN RE, DONNER DB. Up-regulation of insulin receptors in rat liver plasma membranes. *J Biol Chem* 1981; **256**: 11413–11416.
- [10] CORIN RE, DONNER DB. Insulin receptors convert to a higher affinity state subsequent to hormone binding. Two state model for the insulin receptor. *J Biol Chem* 1982; **257**: 104–110.
- [11] COSMAN D, LYMAN SD, IDZERDA RL, BECKMANN MP, PARK LS, GOODWIN RG, MARCH CJ. A new cytokine receptor superfamily. *TIBS* 1990; **15**: 265–270.
- [12] COUNTAWAY JL, NORTHWOOD IC, DAVIS RJ. Mechanism of phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at threonine 669. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10828–10835.
- [13] CRETTAZ M, JIALAL I, KASUGA M, KAHN CR. Insulin receptor regulation and desensitization in rat hepatoma cells: The loss of the oligomeric forms of the receptor correlates with the change in receptor affinity. *J Biol Chem* 1984; **259**: 11543–11549.
- [14] CUATRECASAS P. Properties of insulin receptors isolated from liver and fat cell membranes. *J Biol Chem* 1972; **247**: 1980–1991.
- [15] CZECH MP, KLARLUND JK, YAGALOFF KA, BRADFORD AP, LEWIS RE. Insulin receptors signaling: activation of multiple serine kinases. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11017–11020.
- [16] CZECH MP, MASSAGUE J, PILCH PF. The insulin receptor: structural features. *TIBS* 1981; **6**: 222–225.
- [17] DAVIS RJ, FAUCHER M, RACANIELLO IK, CARRUTHERS A, CZECH MP. Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1987; **262**: 13126–13134.
- [18] DECKER SJ, ELLIS C, PAWSON T, VELU T. Effects of substitution of threonine 654 of the epidermal growth factor receptor on epidermal growth factor-mediated activation of phospholipase C. *J Biol Chem* 1990; **265**: 7009–7015.
- [19] DE DIEGO JG, BLAZQUEZ E. Ligand induced changes in insulin receptors in cell surface and Golgi fractions of fetal rat liver. *Endocrinology* 1988; **122**: 1737–1745.
- [20] DURONIO V, JACOBS S, CUATRECASAS P. Complete glycosylation of the insulin and insulin-like growth factor I receptors is not necessary for their biosynthesis and function. Use of swainsonine as an inhibitor in IM-9 cells. *J Biol Chem* 1986; **261**: 970–975.
- [21] ENDEMANN G, YONEZAWA K, ROTH RA. Phosphotyrosine kinase on an associated protein is a substrate for insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1990; **265**: 396–400.
- [22] FEHLMANN M, CARPENTIER JL, VAN OBBERGHEN E, FREYCHET P, THAMM P, SAUNDERS D, BRANDENBURG D, ORCI L. Internalized insulin receptors are recycled to the cell surface in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 5921–5925.
- [23] GOLDFINE IR. Insulin receptors and the site of action of insulin. *Life Sci* 1978; **23**: 2639–2648.
- [24] GORDEN P. Morphologic and biochemical events in the interaction of polypeptide hormones with target cells. Receptor-mediated binding and internalization of toxins and hormones. *Acad Press* 1981; 251–256.
- [25] GROJEC MS, ISHAC EJM, KAPOCSI J, KUNOS G. The effect of essential fatty acid deficiency on the adrenergic activation of glucogenolysis in rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 1990; **283**: 34–39.
- [26] HALBERG DF, WAGNER RE, FARREL DC, HILDRETH IVJ, QUESENBERY MS, LOEB JA, HOLLAND C, DRICKAMER K. Major and minor forms of the rat liver asialoglycoprotein receptor are independent galactose-binding proteins. *J Biol Chem* 1987; **262**: 9828–9838.
- [27] HARRIS WR, MADSEN LJ. Equilibrium studies on the binding of cadmium (II) to human serum transferrin. *Biochemistry* 1988; **27**: 284–288.
- [28] HAYNES FJ, HELMERHORST E, YIP CC. The structure of the hepatic insulin receptor and insulin binding. *Biochem J* 1986; **239**: 127–133.

- [29] HEDO JA, HARRISO LC, ROTH J. Binding of insulin receptors to lectins: evidence for common carbohydrate determinants on several membrane receptors. *Biochemistry* 1981; **20**: 3385–3393.
- [30] HEINRICH PC, CONRADT HS, DUFHUES G, HORN F, KRAUSE E, KRÜTTGEN A, LEGRES L, LENZ D, LÜTTICKEN C, SCHOOLTINK H, STOYAN T, ROSE-JOHN S. Interleukin-6, its hepatic receptor and the acute phase response of the liver. 1992; w druku.
- [31] HELLKAMP J, CHRIST B, BASTIAN H, JUNGERMANN K. Modulation by oxygen of the glucagon-dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in rat hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 1991; **198**: 635–639.
- [32] HERZIG MCS, WEIGEL PH. Surface and internal galactosyl receptors are heterooligomers and retain this structure after ligand internalization or receptor modulation. *Biochemistry* 1990; **29**: 6437–6447.
- [33] HOFMANN K, ROMOVACEK H, TITUS G, RIDGE K, RAFFENSPERGER JA, FINN FM. The rat liver insulin receptor. *Biochemistry* 1987; **26**: 7384–7390.
- [34] KAHN CR. Insulin receptors. [w] Alberti KGMM, Krall LP (red.) The diabetes Annual/1. Elsevier Science Publishers B.V. 1985: 446–462.
- [35] KALISH MI, KATZ MS, PINEYRO MA, GREGERMAN RI. Epinephrine- and glucagon-sensitive adenylate cyclases of rat liver during aging. Evidence for membrane instability associated with increased enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* 1977; **483**: 452–466.
- [36] KARASIK A, PEPINSKY RB, SHOELSO SE, KAHN CR. Lipocortins 1 and 2 as substrates for the insulin receptor kinase in rat liver. *J Biol Chem* 1988; **263**: 11862–11867.
- [37] KEMPKA G, KOLB-BUCHAFEN V. Galactose-specific receptors on liver cells. I. Hepatocyte and liver macrophage receptors differ in their membrane anchorage. *Biochim Biophys Acta* 1985; **847**: 108–114.
- [38] KMIEĆ Z. Wpływ starzenia na aktywność metaboliczną hepatocytów. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 383–412.
- [39] KNOTSON VP, RONNET GV, LANE MD. Rapid, reversible internalization of cell surface insulin receptors. *J Biol Chem* 1983; **258**: 12139–12142.
- [40] KOCH R, DEGER A, JÄCK HM, KLOTZ KM, KELM S, SCHENZLE D, KRAMER H, KELM S, MÜLLER G, RAPP R, WEBER U. Characterization of solubilized insulin receptors from rat liver. Existence of two receptors with different binding properties. *Eur J Biochem* 1986; **154**: 281–287.
- [41] GOLDFINE ID, KRIZ BM, WONG KY, JONES AL, RENTSON R, HRADEK GT. Entry of insulin into target cells in vitro and in vivo. [w] Receptor-Mediated Binding and Internalization of Toxins and Hormones. 1981: 233–249.
- [42] KUROKAWA K, SILVWERBLATT FJ, KLEIN KL. Insulin receptors of isolated glomeruli. *Int J Biochem* 1980; **12**: 185–190.
- [43] LANE MD, RONETT G, SLIEKER LJ, KOHAŃSKI RA, OLSON TL. Posttranslational processing and activation of insulin and EGF proreceptors. *Biochimica* 1985; **67**: 1069–1080.
- [44] LEIBIGER I, LEIBIGER B, SARRACH D, WALTHER R, ZÜHLKE H. Genetic manipulation of rat hepatocytes in vivo. Implications for a therapy model of type-1 diabetes. *Biomed Biochim Acta* 1990; **49**: 1193–1200.
- [45] LE MARCHAND-BRUSTEL Y, BALLOTTI R, GREMEAUX T, DEBANT A, FEHLMANN M, KOWALSKI A, VAN OBERGHEEN E. Insulin receptor: an integrated system for transmembrane hormone signaling. [w] Belfrage P, Donner J, Stralfors P, (red.) Mechanisms of Insulin Action. Elsevier Science Publishers 1985: 33–42.
- [46] LIPSON KE, KOLHATKAR AA, CHERKSEY BD, DONNER DB. Characterization of glucagon receptors in Golgi fractions of rat liver. Evidence for receptor that are uncoupled from adenyl cyclase. *Biochemistry* 1986; **25**: 2612–2620.
- [47] LIPSON KE, KOLHATKAR AA, MAKI RG, DONNER DB. Divalent cations regulate glucagon binding. Evidence for actions on receptor-N<sub>5</sub> complexes and on receptors uncoupled from N<sub>5</sub>. *Biochemistry* 1988; **27**: 1111–1116.
- [48] MARINKOVIĆ S, JAHREIS GP, WONG GG, BAUMAN H. IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J Immunol* 1989; **142**: 808–812.
- [49] MARGOLIS BL, LAX I, KRIS R, DOMBALAGIAN M, HONEGGER AM, HOWK R, GIVOLD, ULLRICH A, SCHLESSINGER J. All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10667–10671.
- [50] MARSHALL S. Dual pathways for the intracellular processing of insulin. *J Biol Chem* 1985; **260**: 13524–13531.
- [51] McABEE DD, CLARKE BL, OKA JA, WEIGEL PH. The surface activity of the same population of galactosyl receptors on isolated rat hepatocytes is modulated by colchicine, monesin ATP depletion or chloroquine. *J Biol Chem* 1990; **265**: 629–635.
- [52] McABEE DD, OKA JA, WEIGEL PH. Loss of surface galactosyl receptor activity on isolated rat hepatocytes induced by monesin or chloroquine requires receptor internalization via a clathrin coated pit pathway. *Biochim Biophys Res Comm* 1989; **161**: 261–266.

- [53] McABEE DD, WEIGEL PH. ATP depletion causes a reversible redistribution and inactivation of a subpopulation of galactosyl receptors in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1987; **262**: 1942–1945.
- [54] McABEE DD, WEIGEL PH. ATP-dependent inactivation and reactivation of constitutively recycling galactosyl receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry* 1988; **27**: 2061–2069.
- [55] MCCALEB ML, DONNER DB. Affinity of the hepatic insulin receptor is influenced by membrane phospholipids. *J Biol Chem* 1981; **256**: 11051–11057.
- [56] MCCALEB ML, DONNER DB. Affinity change of the adipocyte receptor fails to alter insulin-stimulated glucose transport. *Biochem J* 1982; **202**: 263–265.
- [57] McVITTIE LD, GUARD RS. Stabilization of soluble active rat liver glucagon receptor. *Arch Biochem Biophys* 1989; **273**: 254–263.
- [58] MEDH JD, WEIGEL PH. Reconstitution of galactosyl receptor inactivation in permeabilized rat hepatocytes is ATP-dependent. *J Biol Chem* 1991; **266**: 8771–8778.
- [59] NISHIBE S, WAHL MI, RHEE SG, CARPENTER G. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 10335–10338.
- [60] NISHIMURA C, EKIDA T, MASUD S, FUTATSUGI K, ITOH S, YASUKAWA K, KISHIMOTO T, ARATA Y. Chemical modification and <sup>1</sup>H-NMR studies on the receptor binding region of human interleukin-6. *Eur J Biochem* 1991; **196**: 377–384.
- [61] OKA JM, CHRISTENSEN MD, WEIGEL PH. Hyperosmolarity inhibits galactosyl receptor-mediated but not fluid phase endocytosis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12016–12024.
- [62] OKA JA, HERZIG MCS, WEIGEL PH. Functional galactosyl receptors on isolated rat hepatocytes are hetero-oligomers. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; **170**: 1308–1313.
- [63] OKA JA, WEIGEL PH. Monensin inhibits ligand dissociation only transiently and partially and distinguishes two galactosyl receptor pathways in isolated rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1987; **133**: 243–252.
- [64] OKA JA, WEIGEL PH. Vanadate modulates the activity of a subpopulation of asialoglycoprotein receptors on isolated rat hepatocytes: active surface receptors are internalized and replaced by inactive receptors. *Arch Biochem Biophys* 1991; **289**: 362–370.
- [65] OKA JA, WEIGEL PH. The pathways for fluid phase and receptor mediated endocytosis in rat hepatocytes are different but thermodynamically equivalent. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; **159**: 488–494.
- [66] OKA JA, WEIGEL PH. Vanadate modulates the activity of a subpopulation of asialoglycoprotein receptors on isolated rat hepatocytes: active surface receptors are internalized and replaced by inactive receptors. *Arch Biochem Biophys* 1991; **289**: 362–370.
- [67] PATEL TB, OLSON MS. Regulation of gluconeogenesis from pyruvate and lactate in the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1986; **888**: 316–324.
- [68] PETTEL JK, DOYLE D. Developmental regulation of the hepatocyte receptor for galactose-terminated glycoprotein. *Arch Biochem Biophys* 1985; **241**: 550–560.
- [69] RASHED SM, PATEL TB. Regulation of hepatic energy metabolism by epidermal growth factor. *Eur J Biochem* 1991; **197**: 805–813.
- [70] RAY PA, OKA JA, WEIGEL PH. Nonionic detergents increase the stoichiometry of ligand binding to the rat hepatic galactosyl receptor. *Biochemistry* 1986; **25**: 6097–6103.
- [71] RENEE A, DEN BOSCH V, GENZE MJ, STROUS GJ. Presence of asialoglycoprotein receptors in the Golgi complex in the absence of protein synthesis. *Exptl Cell Res* 1986; **162**: 231–342.
- [72] RENNIE P, GLIEMANN J. Rapid down regulation of insulin receptors in adipocytes artifact of the incubation buffer. *Biochem Biophys Res Comm* 1981; **102**: 824–831.
- [73] RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL SL, KRANS MJ. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanyl nucleotides on binding of <sup>125</sup>I-glucagon. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1872–1875.
- [74] RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL SL, KRANS MJ. The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1876–1882.
- [75] ROSS PH, HARTMAN HJ, SCHLEPPER SCHÖFER, KOI.B H, KOLB-BACHAFEN V. Galactose specific receptors on liver cells. II Characterization of the purified receptor from macrophages reveals no structural relationship to the hepatocyte receptor. *Biochim Biophys Acta* 1985; **847**: 115–121.
- [76] ROSE-JOHN S, SCHOOLTINK H, LENZ D, HIPPE E, DUFIJUES G, SCHMITZ H, SCHIEL X, KISHIMOTO T, HEINRICH PC. Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor. *Eur J Biochem* 1990; **190**: 79–83.
- [77] ROTH RA, MAJDDUX BA, CASSEL DJ, GOLDFINE ID. Regulation of the insulin receptor by a monoclonal anti-receptor antibody. *J Biol Chem* 1983; **258**: 12094–12097.

- [78] RUDOLPH JR, REGOECZI E. Interaction of rat asialotransferrin with adult rat hepatocytes: its relevance for iron uptake and protein degradation. *J Cell Physiol* 1988; **135**: 539-544.
- [79] RUDOLPH JR, REGOECZI E. Relationship between pinocytotic rate and uptake of transferrin by suspended rat hepatocytes. *Biol Met* 1991; **4**: 166-172.
- [80] RUNGE D, SCHMIDT H, CHRIST B, JUNGERMANN K. Mechanism of the permissive action of dexamethasone on the glucagon- dependent activation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1991; **198**: 641-649.
- [81] SAHAL D, RAMACHANDRAN J, YAMAGUCHI YF. Specificity of tyrosine protein kinase of the structurally related receptors for insulin and insulin-like growth factor I: Tyr-containing synthetic polymers as specific inhibitors or substrates. *Arch Biochem Biophys* 1988; **260**: 416-426.
- [82] SAWAMURA T, NAKADO H, FUJII-KARIYAMA Y, TASHIRO Y. Some properties of a binding protein specific for asialoglycoproteins and its distribution in rat liver microsomes. *Cell Struct Funct* 1980; **5**: 133-146.
- [83] SCHLESINGER PH, RODMAN JS, DOEBBER TW, STAHL PD, LEE YC, STOWELL CP, KUHLEN-SCHMIDT TB. The role of extra-hepatic tissues in the receptor-mediated plasma clearance of glycoproteins terminated by mannose or N-acetylglucosamine. *Biochem J* 1980; **192**: 597-606.
- [84] SCHLESSINGER J. The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. *Biochemistry* 1988; **27**: 3119-3123.
- [85] SCHOOLTINK H, STOYAN T, LENZ D, SCHMITZ H, HIRANO T, KISHIMOYO T, HEINRICH PC, ROSE-JOHN S. Structural and functional studies on the human hepatic interleukin-6 receptor. *Biochem J* 1991; **277**: 659-664.
- [86] SCHWARTZ AL, BOLOGNES A, FRIDOWICH SE. Recycling of the asialoglycoprotein receptor and the effect of lysosmotropic amines in hepatoma cells. *J Cell Biol* 1984; **98**: 732-738.
- [87] SHARMA RJ, GRANT AW. Fe<sup>3+</sup>-transferrin and Fe<sup>3+</sup>-asialotransferrin deliver iron to hepatocytes by an identical mechanism. *Eur J Biochem* 1991; **195**: 137-143.
- [88] SMITH RG, SESTILI MA. Methods for ligand-receptor assays in clinical chemistry. *Clin Chem* 1980; **26**: 543-550.
- [89] STRATFORD MAY JR W, CUATRECASAS P. Transferrin receptor: its biological significance. *J Membrane Biol* 1985; **88**: 205-215.
- [90] STROSBER AD. Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur J Biochem* 1991; **196**: 1-10.8.
- [91] TANABE T, PRICER WE, ASHWELL G. Subcellular membrane topology and turnover of a rabbit hepatic binding protein specific for asialoglycoproteins. *J Biol Chem* 1979; **254**: 1038-1043.
- [92] TANNER LI, LIENHARD GE. Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. *J Biol Chem* 1987; **262**: 8975-8980.
- [93] TARTAKOFF AM. The secretory and endocytic paths. [w] Wiley A. (red) New York. Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: Interscience Publication J Wiley & Sons 1987.
- [94] TOLLESHANG H. Binding and internalization of asialoglycoproteins by isolated rat hepatocytes. *Int J Biochem* 1981; **11**: 45-51.
- [95] TOWNSEND R, STAHL P. Isolation and characterization of a mannose/N-acetylglucosamine/fucose binding protein from rat liver. *Biochem J* 1981; **194**: 209-214.
- [96] VICARIO PP, BENNUN A. Separate effects of Mg<sup>2+</sup>, MgATP and ATP<sup>4-</sup> on the kinetic mechanism for insulin receptor tyrosine kinase. *Arch Biochem Biophys* 1990; **278**: 99-105.
- [97] WEIGEL PH, CLARKE BL, OKA JA. The hepatic galactosyl receptor system: two different ligand dissociation pathways are mediated by distinct receptor populations. *Biochem Biophys Res Comm* 1986; **140**: 43-50.
- [98] WEIGEL PH, OKA JA. Coated pits and asialoglycoprotein receptors redistribute to the substratum during hepatocyte adhesion to galactoside surface. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; **180**: 1304-1311.
- [99] WHITTAKER J, HAMMOND VA, TAYLOR R, ALBERTI KGMM. Effects of monensin on insulin interactions with isolated hepatocytes. *Biochem J* 1986; **234**: 463-468.
- [100] YARDEN Y, ULRICH A. Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 1988; **27**: 3113-3118.

Otrzymano: 16.03.1992 r.

Przyjęto: 25.03.1992 r.

Adres autorów: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków.

## PROSTAGLANDYNY (PGs) JAKO PRZYKŁAD NIEPEPTYDOWEGO LIGANDU WIĄZANEGO PRZEZ SWOISTE RECEPTORY NA POWIERZCHNI KOMÓRKI

### PROSTAGLANDINS AS AN EXAMPLE OF NONPEPTIDIC LIGAND BOUNDED BY SPECIFIC RECEPTORS ON THE CELL SURFACE

Anna Maria KORDOWIAK, Piotr KAPUSTA

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono występowanie, niektóre fizykochemiczne parametry oraz opinie różnych autorów na temat sposobu biologicznego oddziaływania wybranych pochodnych kwasu arachidonowego.

*Słowa kluczowe:* prostaglandyny, receptory, pochodne kwasu arachidonowego.

*Summary.* Appearance some physicochemical parameters as well as opinions of various authors about way of biological influence of selected arachidonic acid derivatives were presented.

*Key words:* prostaglandins, receptors, derivatives of arachidonic acid

*Stosowane skróty:* PG – prostaglandyna, PGs – prostaglandyny, GTP – guanozynotrifosforan.

Biologiczna aktywność prostaglandyn (PGs) zależy zarówno od rodzaju pochodnej PGs, jak i rodzaju narządu, tkanki czy układu, do którego należy wiążąca PGs komórka. Działanie PGs jest swoiste dla danego układu podlegającego regulacji oraz zależy od jego stanu czynnościowego (norma lub patologia).

Już pod koniec lat siedemdziesiątych było dobrze wiadomo, że różne komórki mają na swej powierzchni białka wiążące PGs, tzw. receptory prostaglandyn. Do komórek tych należą adipocyty (zarówno wątroby, jak i najądrzy) [6,7, 16, 26], komórki ciątka żółtego [25], komórki macicy [5, 8, 38], płytki krwi [10, 27], erytrocyty [9], komórki mózgu szczura i świni [17, 28], komórki nerek [15, 35], komórki podniebienia embrionów mysich [12], śluzówki żołądka [37] i jelita cienkiego szczura [36], neutrofile i makrofagi [14] oraz komórki wątroby

i hepatocyty w hodowli [2–4, 11,19,22,23,31,32,34]. Mechanizm wprowadzenia do wnętrza komórki tej grupy ligandów po związaniu z receptorami na powierzchni komórki docelowej jest podobny jak w przypadku polipeptydów czy białek. Stosunkowo najczęściej prac doświadczalnych dotyczy receptorów PGs komórek wątroby: hepatocytów (komórek mięsaszowych) oraz komórek Kupffera (zwanymi też makrofagami wątrobowymi). Stwierdzono np. współdziałanie PGs oraz wielu hormonów w różnych funkcjach komórki m.in. oddziaływaniu na układ cykliczny adenylowa/cykliczny AMP [4, 17, 22]. PG serii E, D i prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) są aktywatorami cyklicznej adenylowej, inne PGs mogą natomiast hamować ten układ [4]. Hepatocyty szczurze w hodowli pierwotnej wykazują wiązanie PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>, które są następnie bardzo szybko zdegradowane. W przeciwieństwie do tych pochodnych 6-ketoprostaglandyna F<sub>1c</sub> i tromboksan A<sub>2</sub> będące nieaktywnymi metabolitami PGI<sub>2</sub> i tromboksanu B<sub>2</sub> (odpowiednio) są wiązane znacznie mniej efektywnie i nie ulegają degradacji [20]. Na podstawie badań z użyciem znakowanych trytem w różnych częściach cząsteczki pochodnych PGE, Okumura i wsp. [20] stwierdzili, że PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> są degradowane w dwu fragmentach. Część łańcucha po stronie grupy karboksylowej jest wbudowywana do frakcji wewnątrzkomórkowej, podczas gdy część cząsteczki zawierająca pierścień pięciowęglowy jest uwalniana z komórki do medium. Należy zaznaczyć, że zarówno PGE<sub>1</sub>, jak i PGE<sub>2</sub> dają te same metabolity, pochodne β-oksydacji. Maksimum wiązania PGE<sub>2</sub> przez całe hepatocyty wynosi w 37°C 15–30 min. W medium hodowli hepatocytów po 20 min inkubacji stężenie PGE<sub>2</sub> spada o 50% i pojawiają się jej metabolity [21].

Badania Okumury i wsp. [23] wskazują również, że PGs grupy E mogą funkcjonować jako regulatory glikogenolizy w wątrobie (która jest stymulowana przez adrenalinę i glukagon), a ich sposób gwałtownej degradacji może być modulatorem funkcji wątroby, np. proliferacji komórek, regulacji metabolizmu glukozy, a także autokrynną regulacji wzrostu hepatocytów [30]. PGE<sub>2</sub> i jej dimetylowa pochodna (16, 16' dimetyloprostoglandyna E<sub>2</sub>) hamuje działanie glukagonu i α,β-adrenergiczną stymulację glikogenolizy w hodowli pierwotnej hepatocytów szczurzych, przy czym poziom hamowania jest maksymalny w 2 lub 3 dniu hodowli. Prostaglandyny E<sub>2</sub> i F<sub>2α</sub> zwiększają poziom fruktozo-2,6-difosforanu fosforanu oraz glukozo-6-fosforanu, co wynika z oddziaływania na glikogenolizę [11]. W hepatocytach PGE<sub>2</sub> hamuje stymulowaną przez glukagon akumulację cAMP [3], co w konsekwencji prowadzi do hamowania glikogenolizy i ketogenezy stymulowanych tym hormonem [2,4]. Jest to zgodne z ogólnie przyjętym poglądem, że obok powszechnie znanych czynników wpływających na regulację poziomu glikogenolizy, takich jak: glukagon, adrenalina, angiotensyna, wazopresyna czy oksytocyna, do efektorów glikogenolizy w wątrobie należą przynajmniej niektóre pochodne prostaglandyn.

PGE<sub>2</sub> i PGE<sub>2α</sub>, podobnie jak EGF [29] stymulują proliferację hepatocytów, co wg autorów wpływa na ekspresję komórkowego onkogenu *c-myc*. Skouteris i wsp. [30] podkreślają, że podczas regeneracji wątroby po częściowej hepatektomii wzrasta stężenie PGs, E<sub>2</sub> i F<sub>2α</sub> w surowicy. Obie te pochodne, jak również kwas arachidonowy ułatwiają syntezę DNA w dojrzałych hepatocytach szczurzych.

Już w 1974 r. Smigiel i Fleischer [31,32] izolowali z błon plazmatycznych hepatocytów szczurzych białko wiążące PGE<sub>2</sub> i PGE<sub>1</sub> i określili jego masę na 105 kDa. W cytozolu tych komórek jest białko wiążące tylko PGE<sub>1</sub>. Dalsze badania [31] potwierdziły te odkrycia – błony plazmatyczne hepatocytów wiążą PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub> w ilości ok. 1 pM/mg białka. Sposób wiązania jest swoisty i charakteryzuje się wysokim stopniem powinowactwa (stała dysocjacji 1,2 nM). Podczas izolacji kompleksy receptor- prostaglandyna tworzą połączenia z Tritonem X-100 z

procentowym udziałem 60% białka i 40% detergentu. Promień Stokesa dla tych kompleksów wynosi 53 Å. W sztucznych kompleksach z detergentem wbudowanych w jednowarstwowe powierzchnie ok. 40% powierzchni białka może być pokryte detergentem.

Sprawę wiązania pewnych pozakomórkowych pochodnych prostaglandyn komplikuje fakt udokumentowany przez grupę Mority [19], tzn. że komórki wątrobowe same syntezują PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2α</sub>. Komórki Kupffera są głównym źródłem pochodnych eikozanoidów w wątrobie [34]. Podczas perfuzji produkowane są zarówno endo-, jak i egzogenne PGD<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub>, uważa się, że 95% endogennych PGD<sub>2</sub> jest degradowane w czasie pierwszego pasażu, a ponad 99% wszystkich znakowanych PGs jest degradowane w czasie pierwszych 40 min perfuzji. Produkty degradacji PGs uzyskane drogą perfuzji oraz stwierdzone w hodowli pierwotnej hepatocytów są identyczne. Potwierdza to fizjologiczną rolę hepatocytów w wychwytywaniu z krążenia pochodnych eikozanoidów oraz swoistą, ważną ich funkcję w wątrobie. Potwierdzają to również badania innych [2]. Poza wspomnianymi już własnościami PGs mogą wg Piccoletti i wsp. [24] działać jako wewnątrzkomórkowe mediatory wczesnych zmian na poziomie jądra np. w odpowiedzi typu ostrej fazy na proces zapalny.

Należy zaznaczyć, że hepatocyty i inne komórki wątroby nie są jedynymi komórkami mającymi receptory PGs i produkującymi te substancje. Bernheim [1] stwierdził, że interleukina-1 indukuje tworzenie PGE<sub>2</sub> przez monocyty, fibroblasty, komórki mięśni i mózgu.

W erytrocytach ludzkich miejsca wiążące PGE<sub>1</sub> leżą na ich powierzchni, a reszty kwasu szalowego są konieczne do wiązania ligandu. Jak stwierdzili Dutta-Roy i wsp. [9, 10] w tych komórkach receptor prostaglandyn jest glikoproteiną. Potwierdzają to ostatnie badania Morii i Watanabe [17] dla receptora PGD<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub> w mózgu świni.

W izolowanych adipocytach najadrzy [6] albumina zwiększa wiązanie PGE<sub>2</sub> do błony plazmatycznej, przy czym być może służy ona jako przekaźnik cząstek prostaglandyn. Cohen-Luria i wsp. [6] sugerują, że cytozolowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (tzw. FABP lub białko Z) znane w różnych typach komórek, gdzie stanowi ok. 5% wszystkich białek cytozolowych, wiąże swoiście PGE<sub>1</sub>, a nie PGE<sub>2</sub>. Ma jednak zdolność zwiększania wiązania obu pochodnych do izolowanych błon, podobnie jak albumina. Ci sami badacze wykazali wpływ różnych anionów i kationów na wiązanie PGE<sub>2</sub> do błony plazmatycznej i ich współdziałanie z białkami wiążącymi GTP i jego pochodne [7]. Richelsen i Beck-Nielsen [26] stwierdzili antylipolityczny wpływ PGE<sub>2</sub> w adipocytach. Zmniejszenie ilości receptorów powoduje również redukcję o 45% antylipolitycznego działania PGE<sub>2</sub>. W badanym układzie autorzy nie stwierdzają również stymulacji cyklazy adenylowej przez PGE<sub>2</sub>. W innym układzie, tj. w komórkach kanalików zbierających nerki królika, ta sama pochodna może albo stymulować, albo hamować tworzenie cAMP w zależności od stężenia PGE<sub>2</sub>. Badany zakres stężeń wynosił 0,1 do 10 nM. Sonnenburg i wsp. [33] sugerują w tych komórkach istnienie dwu różnych receptorów PGE<sub>2</sub>: jeden o dużym powinowactwie, wrażliwy na toksynę krztuścową, który wiąże PGE<sub>2</sub> i niektóre jej pochodne, występujący tylko w świeżo izolowanych preparatach oraz drugi receptor niewrażliwy na wspomnianą toksynę, który swoiście wiąże PGE<sub>2</sub>, a jej pochodne nie, o niskim powinowactwie, ale występujący zarówno w świeżo izolowanych komórkach, jak i ich hodowlach.

Prostaglandyny i inne pochodne eikozanoidów były badane intensywnie przez gastroenterologów ze względu na występowanie i sposób ich działania. Czasem nawet uważane są za lokalne hormony syntetyzowane w dużych ilościach w żołądku i jelitach [37]. Wu-Wang i wsp. w badaniu śluzówki żołądka stwierdzili maksymalny efekt wiązania PGE<sub>2</sub>

w pH 3,0; miejsca wiążące cechowały się niskim stopniem powinowactwa, ale były swoiste dla prostaglandyn serii E i PGF<sub>2α</sub> i jej 6-ketopochodnej [37]. W żołądku i w jelitach PGs wpływają na wydzielanie kwasu, przepływ krwi w śluzówce, produkcję śluzu i transport jonów oraz cytoprotekcję. Jakkolwiek mechanizm działania PGs na poziomie komórkowym nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, wszyscy badacze stwierdzają jednomyślnie, że pierwszym etapem musi być związanie PGs do ich receptora na powierzchni błony plazmatycznej.

W komórkach nerki fizjologiczne efekty PGs również zależą od ich interakcji ze swoistymi miejscami wiążącymi na powierzchni błony komórkowej [15]. Rozmieszczenie receptorów nie jest równomierne np. dla PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> i PGF<sub>2α</sub> najgęściej położone są w rdzeniu zewnętrznym, a mniej gęsto w rdzeniu wewnętrznym i korze. Najlepiej wiążą PGs izolowane cząstki receptora o masie 40 kDa. Autorzy sądzą, że zmiana liczby i/lub własności receptorów może być ważnym mechanizmem regulacji funkcji nerki przez PGs zarówno w normie, jak i patologii.

W układzie krążenia Morinelli i Halushka [18] stwierdzili doniosłość badań nad antagonistami wspólnego receptora tromboksanu A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) i PGH<sub>2</sub>. Badania te pozwalają wyjaśnić patofizjologiczną rolę TXA<sub>2</sub> w różnych chorobach układu krążenia, poza tym pozwalają na identyfikację receptorów w płytkach krwi i naczyniach, ustalenie charakterystyki receptorów i próby ich izolacji. W mózgu PGD<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub> przypisuje się główną rolę w regulacji cyklu snu i czuwania oraz temperatury ciała [17]. W podwzgórzu receptory obu tych PGs znajdują się w różnych częściach komórki. Morii i Watanabe sądzą, że tam receptory PGE<sub>2</sub> są sprzężone z układem cyklazy adenylowej poprzez białka wiążące GTP, podczas gdy receptory PGD<sub>2</sub> oddziałują raczej na poziom fosforanu inozytolu. Oba receptory są glikoproteinami, części cukrowe związane są wiązaniami O- i N-glikozydowymi. Autorzy ci [17] sugerują, że część cukrowa jest niezbędna do odpowiedniego pofałdowania łańcucha polipeptydowego i umożliwia przyjęcie właściwej konformacji. Użycie swoistych endoglikozydaz do usunięcia części cukrowej bez denaturacji białkowej części receptorów PGs w błonach redukowało w znaczący sposób ich zdolność wiązania swoistych ligandów.

Należy wyraźnie podkreślić, że na razie nie można podać ogólnego schematu działania wybranej pochodnej z grupy eikozanoidów. Jej działanie zależy przede wszystkim od tego, z jakiej grupy tych bardzo aktywnych biologicznie związków pochodzi oraz na jaką komórkę oddziałuje. W zależności od rodzaju komórki i jej biologicznej funkcji pochodna PGs w różnych stężeniach działa albo stymulująco, albo tę funkcję hamuje. Należy sądzić, że dalsze badania, które doprowadzą do lepszego poznania mechanizmów tych oddziaływań *via* komórkowe receptory, pozwolą w przyszłości opracować jakiś bardziej spójny obraz biologicznej roli prostaglandyn.

## LITERATURA

- [1] BERNHEIM HA. Is prostaglandin E<sub>2</sub> involved in the pathogenesis of fever? Effects of interleukin-1 on the release of prostaglandins. *Yale J Biol Med* 1986; **59**: 153–158.
- [2] BRASS EP, ALFORD CE, GARRITY MJ. Inhibition of glucagon-stimulated cAMP accumulation and fatty acid oxidation by E-series prostaglandins in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1987; **930**: 122–126.
- [3] BRASS EP, GARRITY MJ. Modulation of prostaglandin E<sub>2</sub> catabolism and action by fuel substrates in rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989; **1010**: 233–236.



- [4] BRONSTAD GO, CHRISTOFFERSEN T. Inhibitory effect of prostaglandins on the stimulation by glucagon and adrenaline of formation of cyclic AMP in rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1981; **117**: 369–374.
- [5] CARSTEN ME, MILLER JD. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor in the myometrium: distribution in subcellular fractions. *Arch Biochem Biophys* 1981; **212**: 700–704.
- [6] COHEN-LURIA R, DANON A, RIMON G. Fatty acid binding protein (FABP) modulates prostaglandin E binding to rat epidymal adipocyte membrane similarly to albumin. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1021**: 96–100.
- [7] COHEN-LURIA R, SIGLER L, RIMON G. Biphasic effects of sodium fluoride and guanyl nucleotides on binding to prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in rat epidymal adipocyte membranes. *Cell Signal* 1989; **1**: 561–568.
- [8] CRANKSHAW DJ, CRANKSHAW J, BRANDA LA, DANIEL EE. Receptors for E-type prostaglandins in the plasma membrane of non-pregnant human myometrium. *Arch Biochem Biophys* 1979; **198**: 70–77.
- [9] DUTTA-ROY AK, SINHA AK. Binding of prostaglandin E<sub>1</sub> to human erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1985; **812**: 671–678.
- [10] DUTTA-ROY AK, KAHN NN, SINHA AK. Interaction of receptors for prostaglandin E<sub>1</sub>/prostaglandin and insulin in human erythrocytes and platelets. *Life Sciences* 1991; **49**: 1129–1139.
- [11] GOMEZ-FOIX AM, RODRIGUES-GIL JE, GUINOVART JJ, BOSCH F. Prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> increase fructose 2,6-bisphosphate levels in isolated hepatocytes. *Biochem J* 1991; **2274**: 309–312.
- [12] JONES J, GREENE RM. Identification of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor sites in the embryonic murine palate. *Prostaglandin Leuk Med* 1986; **22**: 139–151.
- [13] KAPUSTA P, KORDOWIAK AM. Rola biologiczna i własności wybranych receptorów komórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów hepatocytów. *Post Biol Komórki* 1992; **19**: 163–178.
- [14] LENNARTZ MP, BROWN EJ. Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* 1991; **147**: 621–626.
- [15] LIMAS C, LIMAS CJ. Prostaglandin receptors in rat kidney. *Arch Biochem Biophys* 1984; **233**: 32–42.
- [16] LURIA R, RIMON G. Exposure of latent prostaglandin binding sites in the rat epidymal adipocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1986; **857**: 68–74.
- [17] MORII H, WATANABE Y. A possible role of carbohydrate moieties in prostaglandin D<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> receptor proteins from the porcine temporal cortex. *Arch Biochem Biophys* 1991; **292**: 121–127.
- [18] MORINELLI TA, HALUSHKA PV. Thromboxane-A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. Characterization and antagonism. *Trends Cardiovasc Med* 1991; **1**: 157–161.
- [19] MORITA J, MUROTA S. Prostaglandin synthesizing system in rat liver. *Eur J Biochem* 1978; **90**: 441–449.
- [20] OKUMURA T, NAKAYAMA R, SAGO T, SAITO K. Identification of prostaglandin E metabolites from primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Biophys Acta* 1985; **837**: 197–207.
- [21] OKUMURA T, SAITO K. Degradation of prostaglandin E<sub>2</sub> in a primary culture of adult rat hepatocytes. *J Biochem* 1984; **96**: 429–436.
- [22] OKUMURA T, SAGO T, SAITO K. Prostaglandin E<sub>1</sub> binding protein on the surface of primary cultured hepatocytes. *Biochem Int* 1987; **14**: 443–449.
- [23] OKUMURA T, SAGO T, SAITO K. Effect of prostaglandins and their analogues on hormone stimulated glycogenolysis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988; **958**: 179–187.
- [24] PICCOLETTI R, ALETTI MG, FERIOLI ME, SCALABRINO G, BERNELLI-ZAZZERA A. Prostaglandin synthesis and early biochemical events in the liver cells during the acute-phase response. *Res Com Chem Path Pharmacol* 1987; **56**: 291–300.
- [25] RAO CV. Receptors for prostaglandins and gonadotropins in the cell membrane of bovine corpus luteum. *Prostaglandins* 1973; **4**: 567–576.
- [26] RICHELSEN B, BECK-NIELSEN H. Decrease of prostaglandin E<sub>2</sub> receptor binding is accompanied by reduced antiproliferative effects of prostaglandin E<sub>2</sub> in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 1984; **26**: 127–134.
- [27] SCHAFFER AL, COOPER B, O'HARA D, HANDIN RJ. Identification of platelet receptors for prostaglandin I<sub>2</sub> and D<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 1979; **254**: 2914–2917.
- [28] SHIMUZU T, YAMASHITA A, HAYAISHI O. Specific binding of prostaglandin D<sub>2</sub> to rat brain synaptic membrane. *J Biol Chem* 1982; **257**: 13570–13575.
- [29] SKOUTERIS GG, KASER MR. Prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> mediate to increase in c-myc expression induced by EGF in primary rat hepatocyte cultures. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; **178**: 1240–1246.
- [30] SKOUTERIS GG, ORD MG, STOCKEN LA. Regulation of the proliferation of primary rat hepatocytes by eicosanoids. *J Cell Physiol* 1988; **135**: 516–520.
- [31] SMIGIEL M, FLEISCHER S. Characterization and localization of prostaglandin E<sub>1</sub> receptors in rat liver plasma membranes. *Biochem Biophys Acta* 1974; **332**: 358–373.
- [32] SMIGIEL M, FLEISCHER S. Characterization of Triton X-100 solubilized prostaglandin E binding protein of rat liver plasma membranes. *J Biol Chem* 1977; **252**: 3689–3696.

- [33] SONNENBURG WK, ZHU J, SMITH WL. A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J Biol Chem* 1990; **265**: 8479–8483.
- [34] TRAN-THI TA, GYUFKO K, DECKER K. Fate of exogenous and endogenous prostaglandins D<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> in the perfused rat liver. *Eicosanoids* 1991; **4**: 37–44.
- [35] WATANABE T, UMEGAKI K, SMITH WL. Association of a solubilized prostaglandin E<sub>2</sub> receptor from renal medulla with a pertussis toxin-reactive guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 1986; **261**: 13430–13439.
- [36] WU-WANG CY, WANG SL, STEVENS B, NEU J. Localization and characterization of prostaglandin E<sub>1</sub> receptors in rat small intestine. *Prost Leuk Efa* 1989; **36**: 129–134.
- [37] WU-WANG CY, WANG SL, SLOMIANY A, SLOMIANY BL. Characterization of gastric mucosal prostaglandin E<sub>2</sub> receptor. *Int J Biochem* 1990; **22**: 915–919.
- [38] YEE GM, KENNEDY TG. Role of cyclic adenosine 3'5' monophosphate in mediating the effect of prostaglandin E<sub>2</sub> on decidualization in vitro. *Biol Rep* 1991; **45**: 163–171.

Otrzymano 16 marca 1992 r.

Przyjęto 25 marca 1992 r.

Adres autorów: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

## 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 wystania do redakcji).

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

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie 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 nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona 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, a 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] HNILICA 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 niezmięnionej 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 nadtetek.

## TREŚĆ

W tym zeszycie Postępów Biologii Komórki . . .	105
ROGAŁSKA S. – Charakterystyka molekularna i cytogenetyczna heterochromatyny w chromosomach żyta ( <i>Secale cereale</i> L.)	107
WITKOWSKI J. M. – Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach T. I. Kationy metali i zmiany potencjału błonowego	117
WITKOWSKI J. M. – Udział kationów w transdukcji sygnału w stymulowanych limfocytach T. II. $H^+$ i zmiana pH cytoplazmy	139
GLĄŻEWSKI S. i DANYSZ W. – Receptory dla aminokwasów pobudzających w ośrodkowym układzie nerwowym i ich rola w procesach plastyczności oraz toksyczności dla komórek	145
KAPUSTA P. i KORDOWIAK A. M. – Rola biologiczna i własności wybranych receptorów komórkowych ze szczególnym uwzględnieniem receptorów na powierzchni hepatocytów	163
KORDOWIAK A. M. i KAPUSTA P. – Prostaglandyny (PGs) jako przykład niepeptydowego ligandu wiązanego przez swoiste receptory na powierzchni komórki	179

*Warunki prenumeraty kwartalnika*  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1992*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1992 r. na 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 40 000 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**