

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 24 NR-4'97**  
(401-592)

# Postępy Biologii Komórki

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILINSKI (biologia rozwoju, embriologia, cytoskielet, połączenia międzykomórkowe – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jan MICHEJDA (szlaki informacyjne, błony komórek, energetyka komórki – *Zakład Bioenergetyki UAM, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*),

Maria OLSZEWSKA (komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*),

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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: – Editorial Office Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 340 344, fax 340470.*

### Recenzenci 24 rocznika PBK 1997 – Referees of the volume No 24 1997:

prof. dr Ewa Bartnik, prof. dr Wiesława Biczysko, dr hab. Barbara Bilińska, prof. dr Szczepan Biliński, prof. dr Franciszek Dubert, dr hab. Halina Gabryś, prof. dr Edward Gwóźdź, prof. dr hab. Olga Haus, prof. dr Adam Jaworski, prof. dr Jerzy Kawiak, prof. dr Jerzy Kłag, prof. dr Andrzej Klein, prof. dr Andrzej Łukaszyk, prof. dr Renata Maryniak, prof. dr Jan Michejda, prof. dr Olgierd Narkiewicz, prof. dr Maria Olszewska, prof. dr Zofia Osuchowska, prof. dr Andrzej Pawlak, prof. dr Barbara Płytycz, prof. dr Lesław Przywara, dr Jan Schmager, dr biol. Mirosław Sopol, dr hab. Józefa Styrna, prof. dr Henryk Urbanek, prof. dr Jerzy Warchoń, prof. dr Maciej Zabel

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

*Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.*

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 15,0 Ark. druk. 12,0. Podpisano do druku w sierpniu 1997 r. Druk ukończono we wrześniu 1997 r.

## W tym Zeszytcie

- Najczęściej dyskutujemy problemy odporności u ssaków (np. patrz strona 561). W tym zeszycie „Postępów” znajdziemy jednak również dyskusje odporności u owadów i u roślin. Zakażenie bakteryjne indukuje w organizmie owadów szybką i krótkotrwałą syntezę dużej liczby poli-peptydów odpornościowych działających na wiele gatunków bakterii. Prawdopodobnie w przyszłości mogą być one wykorzystane jako leki dla innych grup zwierząt bądź ludzi. Budowę i rolę tych peptydów oraz peptydów o własnościach antygrzybiczych omówiono na stronie 417.
- W odpowiedzi na infekcję, rośliny uruchamiają mechanizm obronny obejmujący generowanie reaktywnych form tlenu, reakcję nadwrażliwości, syntezę fitoaleksyn i inne procesy opisane na stronie 403.
- Problemy apoptozy są w ostatnich latach często dyskutowane, również w „Postępach” ( **23**,299,1996; **23**,421,1996; **23**,445,1996; **24**,33,1997). W tym zeszycie Czytelnik znajdzie dwa następne artykuły z tego zakresu: jeden o roli Fas,bcl-2 i IL-2 w apoptozie komórek układu odpornościowego (str. 561) oraz drugi dotyczący analizy wczesnego zjawiska apoptozy, jakim jest zmiana potencjału błonowego błon mitochondrialnych (str. 575).
- Obserwuje się znaczny postęp w poznawaniu etapów obróbki pre-rRNA. Przegląd dotyczący głównie białek uczestniczących w tym złożonym procesie zamieszczono na stronie 491.
- Tylakoidy są miejscem realizacji wszystkich etapów fazy jasnej fotosyntezy. W opracowaniu na str. 469 zebrano dane dotyczące organizacji strukturalnej i implikacje funkcjonalne błony tylakoidalnej.



## WYKORZYSTANIE KULTUR *IN VITRO* W BADANIACH REAKCJI OBRONNYCH ROŚLIN NA STRES BIOTYCZNY

### THE USE OF *IN VITRO* CULTURES TO STUDY BIOTIC STRESS INDUCED PLANT DEFENSE REACTIONS

Elżbieta KUŹNIAK

Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki

**Streszczenie:** W odpowiedzi na infekcję rośliny uruchamiają mechanizm obronny obejmujący m.in. generowanie reaktywnych form tlenu, reakcję nadwrażliwości, syntezę fitoaleksyn, indukcję hydrolaz glikozydowych  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy oraz procesy wzmacniające ścianę komórkową np. lignifikacja. Reakcje obronne roślin mogą być indukowane nie tylko po infekcji, ale również po potraktowaniu elicytorami biotycznymi i abiotycznymi. Stwierdzono, że reakcje obronne występujące w roślinach po infekcji funkcjonują także w kulturach *in vitro* zakażonych lub traktowanych elicytorami. W pracy zostały przedyskutowane możliwości wykorzystania układu modelowego roślinne kultury *in vitro*/patogen/elicytor do badania interakcji roślina/patogen i systemu transdukcji sygnałów aktywowanego w czasie patogenezy. Uwzględniono zwłaszcza wczesne reakcje obronne związane z generowaniem reaktywnych form tlenu.

**Słowa kluczowe:** kultury *in vitro*, stres biotyczny, reakcje obronne roślin, reaktywne formy tlenu, elicytory

**Summary:** Plants react to pathogen attack with a number of defense mechanisms including the production of active oxygen species (AOS), the hypersensitive reaction, the synthesis of phytoalexins, the induction of hydrolytic enzymes e. g.  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase, the construction of defensive barriers to fortify the cell wall against pathogens (e. g. lignification). These defense responses can also be induced by various biotic and abiotic elicitors. The plants defense reactions can be closely mimicked in infected or elicitor treated *in vitro* cultured cells or protoplasts. This review critically discusses the use of a model system - plant *in vitro* cultures/ elicitor/pathogen to study plant/pathogen interactions and signal transduction pathways activated in pathogenesis. The early plant defense reactions characterized by rapid AOS generation and the downstream responses promoted by AOS are discussed at considerable length in this paper.

**Key words:** *in vitro* cultures, biotic stress, plant defense responses, active oxygen species, elicitors

Odpowiedź roślin na działanie zewnętrznych czynników stresowych ma charakter bardzo złożony. W warunkach stresu biotycznego – po infekcji mikroorganizmami patogenicznymi – roślina uruchamia mechanizm obronny obejmujący zarówno procesy prowadzące do wzmocnienia istniejących barier anatomicznych utrudniających wnikanie patogenów (odkładanie kalozy, lignifikacja, synteza białek bogatych w hydroksyprolinę), jak i cały zespół reakcji związanych z aktywną odpowiedzią obronną (generowanie reaktywnych form tlenu, reakcja nadwrażliwości, synteza fitoaleksyn i białek związanych z patogenezą). Dzięki istnieniu takiego wieloskładnikowego i skoordynowanego systemu obronnego rośliny mogą skutecznie przeciwstawiać się mikroorganizmom patogenicznym.

Reakcje obronne roślin mogą być indukowane nie tylko po infekcji, ale także po potraktowaniu elicytorami [54]. Termin elicytor był pierwotnie używany w stosunku do związków indukujących syntezę fitoaleksyn. Obecnie jest stosowany w odniesieniu do wszystkich czynników, które mogą indukować te same reakcje obronne jak występujące po infekcji. Czynniki o właściwościach elicytujących klasyfikuje się jako abiotyczne (UV, detergenty, sole metali ciężkich) i biotyczne. Elicytory biotyczne zostały wyodrębnione zarówno z mikroorganizmów patogenicznych (tzw. elicytory egzogenne), jak i z roślin (tzw. elicytory endogenne) i stanowią bardzo różnorodną grupę produktów obejmującą między innymi: oligosacharydy, glikoproteiny, białka, nienasycone kwasy tłuszczowe [12, 18, 53, 69].

Złożoność interakcji roślina - patogen narzuca konieczność prowadzenia badań na modelach uproszczonych. Coraz większe zastosowanie do badania mechanizmów odpornościowych w skali komórkowej znajduje metoda kultur *in vitro* izolowanych protoplastów, komórek i tkanek oraz model doświadczalny kultury *in vitro* – elicytory. System kultur *in vitro* stwarza możliwość prowadzenia dokładnych obserwacji z uwagi na zastosowanie dużej liczby komórek rosnących w identycznych, kontrolowanych warunkach. Populacja komórek w kulturze jest bardziej jednorodna niż w poszczególnych organach rośliny i ich reakcja na działanie czynnika elicytującego może być bardziej jednoznaczna. Rodzaj elicytora, jego dawka i czas oddziaływania z komórkami roślinnymi mogą zostać bardzo precyzyjnie określone, a łatwość wprowadzenia czynnika elicytującego do kultury eliminuje reakcje indukowane zranieniem. Ponadto sterylność materiału wyklucza niepożądane działanie innych mikroorganizmów. Z drugiej jednak strony utrata wyspecjalizowanych cech indywidualnych przez komórki rosnące w zawiesinie lub w postaci tkanki kalusowej o ciągłej aktywności merystematycznej powoduje zmiany w ich metabolizmie i reakcje badane w tych warunkach mogą różnić się od obserwowanych w całym organizmie roślinnym. Ponadto niestabilność genetyczna i pewne czynniki związane z techniką kultur *in vitro* np.: składniki podłoża hodowlanego, a szczególnie regulatory wzrostu roślin, warunki prowadzenia kultury (oświetlenie, temperatura, wytrząsanie), stres związany z procedurą izolacji protoplastów mogą znacząco wpływać na badane reakcje [15, 21, 37]. Zaleca się, aby w przypadku zawiesin ko-

mórkowych wykorzystywać w badaniach tzw. kultury ustalone, czyli takie, które w kolejnych pasażach powtarzają parametry wzrostu. Pomimo pewnych trudności metody kultur *in vitro* są coraz częściej wykorzystywane w badaniach różnych aspektów interakcji roślina - patogen.

## KULTURY ZAWIESINOWE W BADANIACH MECHANIZMÓW ODPORNOŚCI ROŚLIN NA PATOGENY

Ostatnio duże zainteresowanie wywołuje udział reaktywnych form tlenu (RFT) w procesie patogenezy. Generowanie RFT tzw. „wybuch tlenowy” jest gwałtowną reakcją komórek roślin na infekcję lub traktowanie elicytorami [8, 22, 40, 42, 49]. Badania prowadzone w układzie kultura zawieszinowa – elicytor wykazały, że generowanie anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) i  $H_2O_2$  następuje już kilka minut po dodaniu elicytora i jest jedną z najwcześniejszych reakcji obronnych komórek roślinnych. Stosując superczął metodę chemiluminescencji Kondo i wsp. [29] stwierdzili, że w kulturach zawieszinowych soi produkcja RFT osiąga maksymalny poziom 7 minut po potraktowaniu elicytorem z *Phytophthora megasperma* var. *sojae* i wraca do poziomu wyjściowego po 30 minutach. Dodanie czynników usuwających RFT: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i kwasu askorbinowego hamowało badaną reakcję. Wyniki potwierdzające udział RFT we wczesnej odpowiedzi obronnej komórek roślinnych uzyskano m.in. w następujących układach kultury zawieszinowe/elicytor: pomidor/elicytor z *Cladosporium fulvum* [65], tytoń/elicytor z *Erwinia amylovora* [7], róża/elicytor z *Phytophthora* sp. [5] oraz w układach kultury zawieszinowe/bakterie: tytoń/*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* i *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* [6].

W badaniach z wykorzystaniem kultur *in vitro* stwierdzono, że generowanie RFT w komórkach roślinnych w odpowiedzi na kontakt z elicytorem następuje dwufazowo. Faza pierwsza, niespecyficzna wobec patogena, występuje w ciągu kilku minut po dodaniu elicytora. Natomiast 1–3 godziny po wprowadzeniu czynnika elicytującego rozpoczyna się faza druga, która jest charakterystyczna wyłącznie dla interakcji z patogenem niekompatybilnym i ma ścisły związek z odpornością [37]. Stwierdzono, że w kulturach zawieszinowych tytoniu w fazie drugiej dominował  $O_2^-$ , ale jego poziom był niższy niż w fazie pierwszej [25]. Natomiast w układzie kultury zawieszinowe soi/*Pseudomonas syringae* w fazie drugiej następowała produkcja głównie  $H_2O_2$  [36]. Powyższe wyniki wskazują, że zarówno kinetyka „wybuchu tlenowego”, jak i udział w nim różnych produktów częściowej redukcji tlenu mogą zależeć od gatunku rośliny. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na dominującą rolę  $H_2O_2$  w mechanizmie obronnym roślin. Wiąże się ona z:

- (1) toksycznym oddziaływaniem bezpośrednio na patogena,
- (2) udziałem w reakcji nadwrażliwości i

(3) w fortyfikowaniu ściany komórkowej przez lignifikację i zwiększanie poprzecznego usieciowania białek, co utrudnia rozprzestrzenianie się patogena [62].

Legendre i wsp. [34] ocenili, że w kulturach zawiesinowych soi traktowanych kwasem poligalakturonowym produkcja  $H_2O_2$  w czasie „wybuchu tlenowego” osiąga poziom ok. 1,2 mM  $H_2O_2$  na jednostkę masy komórek i sugerują, że jest to stężenie wystarczające do unicestwienia patogena, ponieważ już mikromolowe stężenie  $H_2O_2$  wystarcza do zahamowania kiełkowania zarodników grzybów [51].

Jedną z najskuteczniejszych strategii obronnych roślin stanowi reakcja nadwrażliwości. Polega ona na gwałtownym obumieraniu komórek roślinnych w miejscach wnikięcia patogena i pozbawieniu go w ten sposób dostępu do składników odżywczych, co ogranicza rozwój choroby i prowadzi do odporności. Reakcji nadwrażliwości, uwidaczniającej się w postaci nekroz, towarzyszą gwałtowne zmiany metaboliczne i strukturalne w komórkach mające pewne cechy wspólne z obserwowanymi w czasie apoptozy u zwierząt [20]. Wskazuje się, że w aktywacji reakcji nadwrażliwości odgrywają rolę RFT, jednak dokładny mechanizm prowadzący do śmierci komórek nie został jeszcze wyjaśniony. Levine i wsp. [36] wykazali, że w kulturach zawiesinowych soi patogen niekompatybilny – *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* wyzwał produkcję  $H_2O_2$  i obumieranie komórek, które ulegało spęgowaniu po wprowadzeniu do kultury inhibitora katalazy. Naton i wsp. [46] zaadaptowali układ modelowy kultury zawiesinowe/elicytor do badania reakcji nadwrażliwości. Opracowali warunki dla ko-kultury komórek pietruszki i zoospor *Phytophthora infestans* umożliwiającą precyzyjne badanie reakcji nadwrażliwości na poziomie pojedynczych zainfekowanych komórek. Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie ścisłej korelacji między akumulacją RFT i gwałtowną śmiercią komórek w reakcji nadwrażliwości prowadzącą do zahamowania wzrostu grzyba patogenicznego. Nierozstrzygnięty pozostaje problem, czy stężenie  $H_2O_2$  produkowanego w czasie reakcji nadwrażliwości jest wystarczające do wywołania śmierci komórek, czy też pełni on tylko funkcję wtórnego przekaźnika uruchamiającego odpowiednie geny [62].

W odniesieniu do wielu roślin stwierdzono, że mogą one reagować wzmoczoną aktywnością peroksydazy w odpowiedzi na infekcję lub traktowanie elicytorami [38, 52, 67]. Rola peroksydazy w mechanizmie obronnym roślin, oprócz udziału w lignifikacji [60], może polegać na inaktywowaniu fenolowych toksyn patogenów i utlenianiu fenoli roślinnych do form bardziej toksycznych dla mikroorganizmów patogenicznych. Messner i Boll [43] wykazali, że w kulturach zawiesinowych świerka elicytor z *Rhizosphaera kalkhoffii* wywoływał indukcję peroksydaz wewnątrzkomórkowych związanych z lignifikacją, a inaktywował peroksydazy zewnątrzkomórkowe. Traktowanie kultur zawiesinowych *Pinus taeda* „zmiataczami”  $H_2O_2$  hamowało lignifikację, co wskazuje na niezbędność  $H_2O_2$  w tym procesie [48]. Uważa się, że w lignifikacji uczestniczą izoformy anionowe peroksydazy [19], jednak dostępne dane literaturowe są niejednoznaczne. Wyniki Małolepszej i Urbanka [39] prze-



mawiają za udziałem anionowej frakcji peroksydazy (pI 4,8) w reakcji kultur zawieszinowych fasoli pod wpływem elicytora z grzybni *Botrytis cinerea*. Natomiast przeciwstawnych danych dostarczają badania udziału różnych izoform peroksydazy w procesie lignifikacji prowadzone na kulturach komórkowych gruszy [2]. Peroksydazy i  $H_2O_2$  biorą również udział w procesie przeprowadzania białek ściany komórkowej bogatych w hydroksyprolinę w formę nierozpuszczalną [9]. Jest to drugi, obok lignifikacji mechanizm prowadzący do wzmocnienia bariery fizycznej utrudniającej wnikanie patogena do komórek roślinnych. Otte i Barz [50] stwierdzili, że w czasie od 5 do 20 minut po dodaniu elicytora w kulturach zawieszinowych *Cicer arietinum* następuje przeprowadzenie białek bogatych w prolinę i hydroksyprolinę w formę nierozpuszczalną. W tym samym czasie stwierdzono chemiluminescencyjnie wzmoczone wytwarzanie  $H_2O_2$ . Zastosowanie specyficznych inhibitorów pozwoliło na potwierdzenie zależności między tymi procesami. Brown-leader i wsp. [10] wyodrębnili i scharakteryzowali izoformy peroksydazy związane jonowo ze ścianą komórkową, które uczestniczą w procesie zwiększania usieciowania ekstensyny w kulturach zawieszinowych pomidora. Stwierdzono, że zarówno aktywność peroksydazy ekstensynowej jak i proces przeprowadzania ekstensyny z formy rozpuszczalnej w nierozpuszczalną są silnie stymulowane pod wpływem elicytora.

Ze względu na wysoką reaktywność RFT mogą inicjować peroksydację lipidów, inaktywować białka, utleniać składniki kwasów nukleinowych i prowadzić do uszkodzenia struktur komórkowych. Z drugiej zaś strony wykazano, że RFT biorą udział w systemie przekazywania sygnałów drogą prowadzącą do uruchomienia reakcji obronnych. Organizmy tlenowe dysponują mechanizmami ochronnymi usuwającymi RFT i produkty ich reakcji. Subtelna równowaga między produkcją RFT i ich detoksyfikacją utrzymywana jest przez system antyoksydacyjny komórki, do którego należą m.in. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza askorbinianowa [58]. System kultura zawieszinowa/elicytor/patogen może stanowić dogodny model eksperymentalny do badania wzajemnych zależności między systemem generowania RFT i systemem antyoksydacyjnym w procesie patogenezy i pod wpływem czynników indukujących odporność. Baker i wsp. [6] zmodyfikowali metodę chemiluminescencyjną tak, że bez konieczności homogenizacji komórek roślinnych, możliwe stało się monitorowanie zarówno generowania  $H_2O_2$ , jak i aktywności systemu usuwającego  $H_2O_2$  w interakcji kultury zawieszinowe/bakterie patogeniczne. Zaletami metody są ponadto szybkość i wysoka czułość.

Jednym z mechanizmów obronnych roślin jest ich zdolność do syntezy związków mogących hamować rozwój patogena. Do takich należą fitoaleksyny i białka związane z patogenezą (białka PR) o aktywności hydrolaz glikozydowych –  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy [32] i białka typu osmotyn [1]. Kultury zawieszinowe są powszechnie wykorzystywane do badania indukcji fitoaleksyn i aktywności enzymów uczestniczących w ich syntezie [11, 63]. Mianem fitoaleksyn określa się niskocząsteczkowe, lipofilne związki o różnej strukturze, syntetyzowane *de novo* w odpowiedzi na

atak patogenów i hamujące ich rozwój. Kombrink i Hahlbrock [28] badali indukcję fitoaleksyn kumarynowych w kulturach zawiesinowych pietruszki traktowanych elicytorami ze ścian komórkowych siedmiu grzybów patogenicznych i stwierdzili, że jest ona poprzedzona wyraźnym wzrostem aktywności enzymów uczestniczących w ich syntezie. Podobną zależność wykazali Kessmann i wsp. [26] badając syntezę medykarpiny w kulturach zawiesinowych lucerny pod wpływem elicytora z *Colletotrichum lindemuthianum*. Ponadto stwierdzili oni, że indukcja amoniakolizazy L-fenyloalaniny, syntazy chalkonowej i izomerazy chalkonowej, enzymów uczestniczących w syntezie medykarpiny, była tym silniejsza, im dłużej kultury zawiesinowe utrzymywano w hodowli.

Udział hydrolaz glikozydowych –  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy w reakcjach obronnych roślin wiąże się ze zdolnością tych enzymów do rozkładania ścian komórkowych grzybów patogenicznych, co może przyczynić się do ograniczenia rozprzestrzeniania się patogena w zaatakowanej tkance [57]. Wzrost aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy, potwierdzający hipotezę o ich udziale w mechanizmie obronnym, obserwowano w wielu układach kultury zawiesinowe/elicytor [27, 28, 30]. Zastosowanie kultur zawiesinowych ułatwia badanie indukcji glukanohydrolaz zarówno zlokalizowanych wewnątrzkomórkowo, jak i wydzielanych do podłoża i może przyczynić się do wyjaśnienia roli poszczególnych frakcji obu enzymów w reakcjach obronnych. W kulturach zawiesinowych fasoli traktowanych ekstraktem z grzybni *Botrytis cinerea* obserwowano indukcję chitynazy wewnątrzkomórkowej i silny, skoordynowany wzrost aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy zewnątrzkomórkowych, potwierdzający hipotezę o współdziałaniu obu enzymów w mechanizmie obronnym [31]. Natomiast Vogelsang i Barz [66] stwierdzili, że w elicytowanych kulturach *Cicer arietinum* następuje indukcja wewnątrzkomórkowych frakcji  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy należących do klasy hydrolaz o charakterze zasadowym (pI odpowiednio 10,5 i 8,5) i jednej frakcji chitynazy o charakterze kwasowym (pI 5,7) wydzielanej do podłoża. Spośród wyodrębnionych chitynaz tylko frakcja wewnątrzkomórkowa o pI 8,5 miała zdolność hamowania wzrostu grzybów patogenicznych *Trichoderma viride*, *Helminthosporium tuberosum* i *Rhizoctonia solani*. Przypuszcza się, że niektóre frakcje glukanohydrolaz mogą przez uwalnianie w wyniku ich działania oligosacharydy o właściwościach elicytujących brać udział w wyzwalaniu innych reakcji obronnych, np. syntezы fitoaleksyn [61].

## WEWNĄTRZKOMÓRKOWE PRZEKAŹNIKI INFORMACJI W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH

Proponowane modele objaśniające wewnątrzkomórkowy system transdukcji sygnałów od rozpoznania patogena/elicytora na powierzchni komórek roślinnych do uruchomienia mechanizmu obronnego są niepełne. Przypuszcza się, że rozpoznanie

przez roślinę elicytorów biotycznych, będące sygnałem rozpoczynającym ciąg reakcji prowadzących do aktywacji systemu obronnego, następuje dzięki istnieniu specyficznych receptorów błonowych. Badania prowadzone na kulturach zawiesinowych soi, pietruszki i ziemniaka traktowanych heterogennym elicytorem z *Phytophthora megasperma* i *Phytophthora infestans* wykazały, że każda roślina nie tylko rozpoznaje inny komponent preparatu grzybowego, ale także nie reaguje na składnik wywołujący odpowiedź innej rośliny [55]. Wendehenne i wsp. [68], wykorzystując kultury zawiesinowe tytoniu, stwierdzili istnienie specyficznego miejsca wiązania dla kryptogeiny. Fath i Boller [18] scharakteryzowali i wyodrębnili w postaci aktywnej z komórek kultury zawiesinowej pomidora receptor dla glikopeptydowego elicytora z drożdży. Miejsce wiążące wykazywało specyficzne powinowactwo do glukanu połączonego z 9 resztami mannozowymi otrzymanego z elicytora.

Pomimo intensywnych wysiłków nie określono jednoznacznie, jakie mechanizmy enzymatyczne biorą udział w generowaniu RFT i nie poznano wszystkich elementów systemu transdukcji sygnałów prowadzącego do „wybuchu tlenowego”. Badania prowadzone najczęściej z wykorzystaniem kultur zawiesinowych dostarczyły danych przemawiających zarówno za syntezą  $O_2^-/H_2O_2$  przy udziale związanej z błoną oksydazy NAD(P)H, podobnie jak w fagocytach układu immunologicznego ssaków [37], jak i przy udziale peroksydaz zewnątrzkomórkowych [64]. Legendre i wsp. [33] badając „wybuch tlenowy” w elicytowanych kulturach zawiesinowych soi stwierdzili, że proces znajduje się pod kontrolą białek G. Ponadto wykazano, że inhibitory kinazy białkowej (k 252-a i staurosporyna) hamują biosyntezę  $O_2^-/H_2O_2$  w kulturach zawiesinowych soi traktowanych kwasem poligalakturonowym, a inhibitory fosfatazy indukują „wybuch tlenowy” w kulturach nie poddanych elicytacji. Zdaniem autorów wyniki te przemawiają za udziałem specyficznych kinaz w systemie przekazywania sygnałów [13]. Sugestie te zostały potwierdzone w badaniach prowadzonych na transgenicznym kulturach zawiesinowych pomidora traktowanych elicytorem lub zakażonych *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [14]. Natomiast Baker i wsp. [7] wskazują, że poza generowaniem RFT początkowej fazy reakcji nadwrażliwości w kulturach zawiesinowych soi po infekcji *Pseudomonas syringae* towarzyszyło pobieranie  $H^+$  i wypływ  $K^+$  z komórki. Ponadto  $H_2O_2$  powstający w reakcji nadwrażliwości stymulował wnikanie  $Ca^{2+}$  do komórki, co wskazuje na udział wapnia w systemie przekazywania sygnałów prowadzącym od „wybuchu tlenowego” do uruchomienia programowanej śmierci komórek [35].

Wiele kontrowersji budzi problem, czy RFT, będące produktem „wybuchu tlenowego”, odgrywa rolę sygnałów uruchamiających syntezę fitoaleksyn. Degousee i wsp. [16] stwierdzili, że  $H_2O_2$  może pełnić funkcję sygnału przekazywanego do komórek w sąsiedztwie miejsc wniknięcia patogena i uruchamiającego w nich syntezę fitoaleksyn. Niezbędność RFT dla syntezy fitoaleksyn w kulturach zawiesinowych traktowanych elicytorem wykazali m.in. Vera Estrella i wsp. [65] i Apostol i wsp. [4]. Wnioski te oparte były na obserwacjach, że egzogenny  $H_2O_2$  stymulował

syntezę fitoaleksyn, a czynniki blokujące „wybuch tlenowy” hamowały również indukcję fitoaleksyn. Podobnie Calderon i wsp. [11] stwierdzili, że w syntezie pochodnych fitoaleksynowych w kulturach zawieszinowych winorośli traktowanych elicytorem z *Trichoderma viride* bierze udział peroksydaza i procesowi towarzyszy wzrost stężenia  $H_2O_2$ . Ponadto dodanie dysmutazy ponadtlenkowej stymulowało reakcję, a katalaza wykazywała działanie hamujące. Natomiast wyniki badań prowadzonych na kulturach zawieszinowych tytoniu traktowanych elicytorami białkowymi z *Phytophthora cryptogea* i *Phytophthora capsici* [53] i na elicytowanych kulturach zawieszinowych koniczyny [17] przemawiają za brakiem zależności między syntezą fitoaleksyn a generowaniem RFT.

W ostatnich latach wskazuje się, że funkcję wtórnego przekaźnika mógłby pełnić kwas jasmonowy (JA) i jego ester metylowy (MeJA). Przemawiają za tym również wyniki badań prowadzonych z zastosowaniem kultur *in vitro*. W kulturach zawieszinowych ryżu egzogeny JA, podobnie jak elicytor, indukował syntezę fitoaleksyn [47]. W kulturach traktowanych elicytorem synteza fitoaleksyn była poprzedzona wzrostem poziomu endogennego JA. Ponadto dodanie do podłoża ibuprofenu, inhibitora syntezy JA, redukowało gromadzenie fitoaleksyn, co zdaniem autorów potwierdza, że JA jest przekaźnikiem sygnałów w tym procesie. Podobne wyniki uzyskali Mueller i wsp. [45] traktując elicytorami kultury zawieszinowe różnych gatunków roślin należących zarówno do nagozalążkowych, jak i jedno- oraz dwuliściennych. Autorzy sugerują, że JA i/lub jego prekursor – kwas 12-oksofytodienowy pełnią funkcję wtórnego przekaźnika na drodze od kompleksu elicytor - receptor do syntezy metabolitów wtórnych czynnych w procesie patogenezy. Ponadto stwierdzono, że preinkubacja z MeJA uczula komórki do intensywniejszej reakcji na następujące później traktowanie elicytorem. W kulturach zawieszinowych pietruszki poddanych 24-godzinnej preinkubacji z MeJA w odpowiedzi na elicytor z *Phytophthora megasperma* następowało silniejsze generowanie RFT [23] i synteza fitoaleksyn oraz włączanie polimerów ligninopodobnych do ścian komórkowych [24]. Przypuszcza się, że w kulturach pretraktowanych MeJA system percepcji/transdukcji sygnałów jest bardziej efektywny.

Z przedstawionych danych literaturowych wynika, że model doświadczalny kultury zawieszinowe/elicytor znalazł szerokie zastosowanie głównie w badaniach mechanizmu indukcji RFT przez czynniki patogeniczne, systemu transdukcji sygnałów aktywowanego w komórkach roślinnych i udziału RFT w innych reakcjach obronnych.

## WYKORZYSTANIE POTOPLASTÓW DO BADANIA REAKCJI ROŚLIN NA STRES BIOTYCZNY

Niewyjaśniony pozostaje problem, czy reakcje obronne indukowane po infekcji/elicytacji zachowują się w protoplastach i czy mogą one stanowić dogodny model biologiczny w badaniach odporności roślin. Istniejące dane literaturowe są kontrowersyjne. Stwierdzono, że kultury protoplastów lucerny otrzymane z kultur zawiesinowych reagujących syntezą medykarpiny na traktowanie elicytorem nie wykazują podobnej reakcji [26]. W kulturach protoplastów soi synteza gliceoliny zachodziła bez udziału elicytora i zwiększała się z wiekiem hodowli. Dodanie elicytora z *Phytophthora megasperma* nie potęgowało badanej reakcji. Ponadto wykazano, że czynniki związane z procedurą izolacyjną: mannitol, sorbitol, celuloza i poligalakturonaza mogą pełnić rolę elicytorów abiotycznych i indukować syntezę fitoaleksyn [44]. W czasie izolacji komórki z naturalnego środowiska przeniesione zostają w inne warunki fizyko-chemiczne zmieniające ich metabolizm w stosunku do „normalnych” komórek. Brak odpowiedzi protoplastów na działanie czynników indukujących reakcje obronne może być wynikiem stresu izolacyjnego, który wysycił system obronny do tego stopnia, że pozostaje on niewrażliwy na działanie elicytora lub też protoplasty są pozbawione jakiegoś istotnego elementu systemu transdukcji sygnałów uruchamiającego mechanizm odpornościowy. Dane uzyskane przez de Marco i wsp. [41] wskazują, że procedura izolacji jest przyczyną stresu oksydacyjnego, który może utrudniać regenerację protoplastów i istnieje silna dodatnia korelacja między żywotnością i zdolnością do podziałów a aktywnością systemu antyoksydacyjnego w protoplastach. Podobne wyniki uzyskał Siminis i wsp. [59] porównując aktywność katalazy w dzielących się i niezdolnych do podziałów protoplastach winorośli.

Istnieją jednak dane, że reakcje obronne występujące w roślinach i zawiesinach komórkowych zachowują się w kulturach protoplastów. Protoplasty marchwi, podobnie jak kultury zawiesinowe, z których zostały otrzymane, reagowały wzmożoną syntezą kwasu 4-hydroksybenzoesowego pod wpływem elicytora z *Pythium aphanidermatum* [56], a protoplasty fasoli wzrostem aktywności  $\beta$ -1,3-glukanazy i chitynazy po potraktowaniu elicytorem z *Botrytis cinerea* [31].

Stwierdzono, że w protoplastach tytoniu indukcja  $\beta$ -1,3-glukanazy pod wpływem elicytora z *Phytophthora megasperma* jest kontrolowana przez auksyny. Brak auksyny w podłożu do hodowli protoplastów powodował spontaniczną indukcję  $\beta$ -1,3-glukanazy, taką jak pod wpływem elicytora w kulturach hodowanych na pożywcze z auksyną [21]. Powyższe dane wskazują, że protoplasty mogą być wykorzystywane w badaniach reakcji obronnych pod warunkiem, że zostanie uwzględniona stresogenność procedury izolacyjnej i elicytujący wpływ pewnych czynników związanych z hodowlą protoplastów.

## UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione dane potwierdzają przydatność modelu biologicznego kultury *in vitro*/elicytory w badaniach reakcji roślin na stres biotyczny. Poza innymi zaletami stwarza on możliwość wnikliwej analizy interakcji roślina - patogen „od strony” rośliny. Jednak na skutek wyeliminowania czynników oddziaływania patogena (enzymy, supresory elicytacji, system antyoksydacyjny) oraz z uwagi na fakt, że środowisko poza żywym organizmem może być przyczyną zaburzeń w normalnym przebiegu badanych procesów uzyskane tą drogą wyniki powinny zostać sprawdzone w badaniach *in vivo*. Wyniki badań prowadzonych z użyciem kultur zawieszinowych i protoplastów dostarczyły wielu cennych informacji o funkcjonowaniu mechanizmów obronnych na poziomie komórkowym. Ostatnio zakres możliwości badania systemu obronnego roślin *in vitro* znacznie się poszerzył przez zastosowanie metod inżynierii genetycznej. Formy transgeniczne dostarczają nowych informacji o mechanizmach regulacji odporności [3]. Ponadto technika kultur *in vitro* w połączeniu z metodami inżynierii genetycznej umożliwia szybkie testowanie materiału roślinnego, co może skrócić czas potrzebny do selekcji nowych odmian odpornych na choroby. Badania prowadzone na kulturach zawieszinowych i protoplastach mogą przyczynić się również do poznania związków indukujących reakcje obronne i mechanizmu ich działania, co może mieć duże znaczenie przy opracowywaniu nowych metod ochrony roślin przyjaznych dla środowiska naturalnego.

## LITERATURA

- [1] ABAD LR, DURZO MP, LIU D, NARASHIMHAN ML, REUVENI M, ZHU JK, NIU X, SINGH NK, HASEGAWA PM, BRESSAN RA. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 1996; **118**: 11–23.
- [2] ABELES FB, BILES CL. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol* 1991; **95**: 269–273.
- [3] ALLEN R. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 1995; **107**: 1049–1054.
- [4] APOSTOL I, HEINSTEIN PF, LOW PS. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* 1989; **90**: 109–116.
- [5] AUH C-K, MURPHY TM. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol* 1995; **107**: 1241–1247.
- [6] BAKER CJ, HARMON GL, GLAZENER JA, ORLANDI EW. A noninvasive technique for monitoring peroxidative and  $H_2O_2$ -scavenging activities during interactions between bacterial plant pathogens and suspension cultures. *Plant Physiol* 1995; **108**: 353–359.
- [7] BAKER CJ, MOCK NM, GLAZENER JA, ORLANDI EW. Recognition responses in pathogen\nonhost and race\cultivar interactions involving soybean (*Glycine max*) and *Pseudomonas syringae* pathovars. *Physiol Mol Plant Pathol* 1993; **43**: 81–94.

- [8] BAKER CJ, ORLANDI EW. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 1995; **33**: 299–321.
- [9] BRADLEY DJ, KJELBOM P, LAMB CJ. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 1992; **70**: 21–30.
- [10] BROWNLEADER MD, AHMED N, TREVAN M, CHAPLIN MF, DEY PM. Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1115–1123.
- [11] CALDERON AA, ZAPATA JM, ROS BARCELO A. Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol Mol Plant Pathol* 1994; **44**: 289–299.
- [12] CASTORIA R, ALTAMURA MM, FABBRI AA, TOMASSI M, FANELLI C. Interrelationships between browning and phytoalexin accumulation elicited by arachidonic acid. *J Plant Physiol* 1995; **145**: 209–214.
- [13] CHANDRA S, LOW PS. Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4120–4123.
- [14] CHANDRA S, MARTIN GB, LOW PS. The Pto kinase mediates a signalling pathway leading to the oxidative burst in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13393–13397.
- [15] DEAN JFD, STERJIADES R, ERIKSSON K-EL. Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. *Physiol Plant* 1994; **92**: 233–240.
- [16] DEGOUSEE N, TRIANTAPHYLIDES C, MONTILLET J. Involvement of oxidative processes in the signalling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol* 1994; **104**: 945–952.
- [17] DEVLIN WS, GUSTINE DL. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1189–1195.
- [18] FATH A, BOLLER T. Solubilization, partial purification, and characterization of a binding site for glycopeptide elicitor from microsomal membranes of tomato cells. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1659–1668.
- [19] FERRER MA, BARCELO AR. Inactivation of cell wall acidic peroxidase isoenzymes during oxidation of coniferyl alcohol in *Lupinus*. *Phytochemistry* 1994; **36**: 1161–1163.
- [20] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [21] JOUANNEAU JP, LAPOUS D, GUERN J. In plant protoplasts the spontaneous expression of defense reactions and the responsiveness to exogenous elicitors are under auxin control. *Plant Physiol* 1991; **96**: 459–466.
- [22] KAUSS H, JEBLICK W. Influence of salicylic acid on the induction of competence for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitation. Comparison of ergosterol with other elicitors. *Plant Physiol* 1996; **111**: 755–763.
- [23] KAUSS H, JEBLICK W, ZIEGLER J, KRABLER W. Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. *Plant Physiol* 1994; **105**: 89–94.
- [24] KAUSS H, KRAUSE K, JEBLICK W. Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. *Bioch Bioph Res Comm* 1992; **189**: 304–308.
- [25] KEPPLER LD, BAKER CJ, ATKINSON MM. Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* 1989; **79**: 974–978.
- [26] KESSMANN H, CHOUDHARY AD, DIXON RA. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts. *Plant Cell Rep* 1990; **9**: 38–41.

- [27] KIRSCH C, HAHLBROCK K, KOMBRINK E. Purification and characterization of extracellular, acidic chitinase isoenzymes from elicitor-stimulated parsley cells. *Europ J Biochem* 1993; **213**: 419–425.
- [28] KOMBRINK E, HAHLBROCK K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol* 1986; **81**: 216–221.
- [29] KONDO Y, HANAŦA F, MIYAZAWA T, MIZUTANI J. Detection of rapid and transient generation of activated oxygen and phospholipid hydroperoxide in soybean after treatment with fungal elicitor by chemiluminescence assay. [w] Fritig B, Legrand M [red.] *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1993 : 148–151.
- [30] KUŹNIAK E, MAŁOLEPSZA U, PATYKOWSKI J, URBANEK H. Biochemiczne reakcje obronne liŝci, zawiesin komórkowych i protoplastów fasoli przeciw chorobom infekcyjnym. [w] Dubert F, Skoczowski A [red.] *Zastosowanie Kultur In Vitro w Fizjologii Roŝlin*. Kraków: Zakład Fizjologii Roŝlin PAN 1994: 55–63.
- [31] KUŹNIAK E, URBANEK H. Induction of hydrolytic enzymes in bean cell and protoplast cultures treated with *Botrytis cinerea* mycelium extract. *Acta Physiol Plant* 1993; **15**: 227–236.
- [32] LAWRENCE CB, JOOSTEN MH, TUZUN S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* 1996; **48**: 361–377.
- [33] LEGENDRE L, HEINSTEIN PF, LOW PS. Evidence for participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J Biol Chem* 1992, **267**: 20140–20147.
- [34] LEGENDRE L, REUTER S, HEINSTEIN PF, LOW PS. Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol* 1993; **102**: 233–240.
- [35] LEVINE A, PENNELL RI, ALVAREZ ME, PALMER R, LAMB C. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* 1996; **6**: 427–437.
- [36] LEVINE A, TENHAKEN R, DIXON RA, LAMB C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 1994; **79**: 583–593.
- [37] LOW PS, MERIDA JR. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol Plant* 1996; **96**: 533–542.
- [38] LUDWIG-MULLER J, YHERMANN P, PIEPER K, HILDENBERG W. Peroxidase and chitinase isoenzyme activities during root infection of Chinese cabbage with *Plasmidiophora brassicae*. *Physiol Plant* 1994; **90**: 661–670.
- [39] MAŁOLEPSZA U, URBANEK H. Changes in peroxidase activity in bean suspension cultures after *B. cinerea* and elicitor treatment. *J Phytopathol* 1994; **141**: 314–322.
- [40] MAŁOLEPSZA U, URBANEK H, POLIT J. Some biochemical reactions of strawberry plants to infection with *Botrytis cinerea* and salicylic acid treatment. *Acta Agrobot* 1994; **47**: 73–81.
- [41] de MARCO A, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA. The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. *Plant Physiol* 1996; **110**: 137–145.
- [42] MEHDY MC, SHARMA YK, SATHASIVAN K, BAYS NW. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiol Plant* 1996; **98**: 365–374.
- [43] MESSNER B, BOLL M. Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*): fungal elicitor-induced inactivation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1994; **36**: 81–90.
- [44] MIETH M, SPETH V, EBEL J. Phytoalexin production by isolated soybean protoplasts. *Z Naturforsch* 1986; **41c**: 193–201.
- [45] MUELLER MJ, BRODSCHELM W, SPANNAGEL E, ZENK MH. Signalling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 7490–7494.
- [46] NATON B, HAHLBROCK K, SCHMELZER E. Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells. *Plant Physiol* 1996; **112**: 433–444.



- [47] NIJIRI H, SUGIMORI M, YAMANE H, NISHIMURA Y, YAMADA A, SHIBUYA N, KODAMA O, MUROFUSHI N, OMORI T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured cells. *Plant Physiol* 1996; **110**: 387–392.
- [48] NOSE M, BERNARDS MA, FURLAN M, ZAJICEK J, EBERHARDT TL, LEWIS NG. Towards the specification of consecutive steps in macromolecular lignin assembly. *Phytochemistry* 1995; **39**: 71–79.
- [49] ORLANDI EW, HUTCHESON SW, BAKER CJ. Early physiological responses with race-specific recognition in soybean leaf tissue and cell suspensions treated with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 1992; **40**: 173–180.
- [50] OTTE O, BARZ W. The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* 1996; **200**: 238–246.
- [51] PENG M, KUČ J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 1992; **82**: 696–699.
- [52] REIMERS PJ, GUO A, LEACH E. Increased activity of a cationic peroxidase associated with an incompatible interaction between *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol* 1992; **99**: 1044–1050.
- [53] RUSTERUCCI C, STALLAERT V, MILAT M-L, PUGIN A, RICCI P, BLEIN J-P. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* 1996; **111**: 885–891.
- [54] SCHNEIDER S, ULLRICH WR. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol Mol Plant Pathol* 1994; **45**: 291–304.
- [55] SCHEEL D, COLLING C, KELLER H, PARKER J, SCHULTE W, HAHLBROCK K. Studies on elicitor recognition and signal transduction in host and non-host/fungus pathogenic interactions. [w] Lugtenberg BJJ [red.] *Signal Molecules in Plant-Microbe Interactions*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag 1989: 211–218.
- [56] SCHNITZLER J-P, SEITZ HU. Rapid responses of cultured carrot cells and protoplasts to an elicitor from the cell wall of *Phytium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. *Z Naturforsch* 1989; **44c**: 1020–1028.
- [57] SELA-BURLAGE MB, PONSTEIN AS, BRES-VLOEMANS SA, MELCHERS LS, VAN DEN ELZEN PJM, CORNELISSEN BJC. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* 1993; **101**: 857–863.
- [58] SIES H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; **215**: 213–219.
- [59] SIMINIS CI, KANELIS AK, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA. Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. *Plant Physiol* 1994; **105**: 1375–1383.
- [60] STERMER BA. Molecular regulation of systemic induced resistance. [w] Kuč J [red.] *Induced Resistance to Disease in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1995: 111–140.
- [61] TAKEUCHI Y, YOPSHIKAWA M, TAKEBA G, TANAKA K, SHIBATA D, MORINO O. Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiol* 1990; **93**: 673–682.
- [62] TENHAKEN R, LEVINE A, BRISSON LF, DIXON RA, LAMB C. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4158–4163.
- [63] TIEMANN K, FILMER B, INZED, VAN MONTAGUM, BARZ W. Phytoalexin biosynthesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cDNA cloning and regulation of NADPH: isoflavone oxidoreductase (IFR). [w] Fritig B, Legrand M [red.] *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1993: 320–323.
- [64] VERA ESTRELLA R, BLUMWALD E, HIGGINS VJ. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells: evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1208–1215.

- [65] VERA ESTRELLA R, BLUMWALD E, HIGGINS VJ. Non-specific glycopeptide elicitors of *Cladosporium fulvum*: evidence for involvement of active oxygen species in elicitor-induced effects on tomato cell suspensions. *Physiol Mol Plant Pathol* 1993; **42**: 9–22.
- [66] VOGELSANG R, BARZ W. Purification, characterization and differential regulation of one  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum*). [w] Fritig B, Legrand M [red.] Mechanisms of Plant Defense Responses. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1993: 360.
- [67] WAGIH EE. Stress proteins and isozymology of acid phosphatase, esterase, and peroxidase in *Phaseolus vulgaris* following peanut mottle virus infection. *J Phytopathology* 1993; **139**: 157–164.
- [68] WENDEHENNE D, BINET M-N, BLEIN J-P, RICCI P, PUGIN A. Evidence for specific-high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* 1995; **374**: 203–207.
- [69] YOSHIKAWA M, YAMAOKA N, TAKEUCHI Y. Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiol* 1993; **34**: 1163–1173.

*Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński*

*Otrzymano: 04.03.1997 r.*

*Przyjęto: 26.04.1997 r.*

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

## POSTĘPY W POZNANIU STRUKTURY I FUNKCJI POLIPEPTYDÓW ODPORNOŚCIOWYCH OWADÓW O DZIAŁANIU PRZECIWDROBNOUSTROJOWYM

### ADVANCES IN STUDIES ON STRUCTURE AND FUNCTION OF INSECT IMMUNE ANTIMICROBIAL POLYPEPTIDES

Zdzisław GLIŃSKI<sup>1</sup>, Jan JAROSZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, Lublin,

<sup>2</sup>Zakład Patologii Owadów, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

*Streszczenie:* Zakażenie bakteryjne indukuje w organizmie owadów szybką i krótkotrwałą syntezę dużej liczby polipeptydów odpornościowych działających na wiele gatunków bakterii, niekiedy też na fitopatogenne grzyby oraz grzyby chorobotwórcze dla ludzi. Dokładnie poznano strukturę i rolę w odporności owadów lizozymu oraz wielu przeciwbakteryjnych indukowanych polipeptydów (cecropiny, attacyny, dipterycyny). W ostatnich latach postęp w immunologii owadów dotyczy określenia struktury pierwszorzędowej, mechanizmu działania oraz roli defenzyn, cyklicznych peptydów o aktywności przeciugrybiczej, O-glikozylowanych przeciwdrobnoustrojowych peptydów i indukowanych polipeptydów odpornościowych pszczoły miodnej.

*Słowa kluczowe:* odporność owadów, indukowane białka o działaniu przeciwbakteryjnym, lizozym hemolimfy, cecropiny, attacyny, apidycyny, defenzyny owadów, O-glikozylowane przeciwdrobnoustrojowe peptydy.

*Summary:* Insects respond to bacterial infection by a rapid and transient synthesis of a large number of potent antimicrobial peptides active against many different bacterial species, sometimes also against filamentous fungi – phytopathogens and human pathogens. The insect lysozymes and various inducible antibacterial peptides (cecropins, attacins, diptericins) are well characterized in biochemical and immunological terms. During the last decade advances in insect immunology concern the primary structure, mode of action upon target microorganisms, and the role in insect defenses of defensins, cyclic peptides of antifungal activity, O-glycosylated antimicrobial peptides and the group of inducible immune peptides of the honey bee.

*Key words:* insect immunity, inducible antibacterial proteins, hemolymph lysozyme, cecropins, attacins, apidaecins, insect defensins, O-glycosylated antimicrobial peptides.

## WSTĘP

Niewiele jest odkryć, które zrewolucjonizowały dotychczasowe poglądy na istotę zjawisk odpornościowych u bezkręgowców i które przyczyniły się do poznania ewolucji układu odpornościowego oraz sposobów jego działania w obronie przeciwważnej [22]. Punktem zwrotnym było odkrycie fagocytozy przez Miecznikowa [49], które zapoczątkowało badania nad komórkowymi odczynami obronnymi u bezkręgowców, badania Glassera [21] i Metalnikowa [48] nad czynnikami humoralnymi hemolimfy owada niszczącymi bakterie, a także badania Mohriga i Messnera [50, 51] dotyczące roli lizozymu w odporności przeciwbakteryjnej owadów. Nowe horyzonty otworzyły studia Bomana i wsp. [3] nad indukowanymi białkami i polipeptydami odpornościowymi hemolimfy owadów holometabolicznych, uwarunkowaniem genetycznym ich biosyntezy, strukturą cząsteczki oraz ich rolą w odporności.

Rozwój nowych metod, które znalazły zastosowanie w badaniach indukowanych białek odpornościowych oraz poszukiwanie analogów i homologów peptydów odpornościowych owadów w świecie roślin i zwierząt, w tym także u człowieka, stworzyło racjonalne podstawy do wykorzystania w przyszłości białek odpornościowych owadów w takich dziedzinach, jak: onkologia, biologiczne metody zwalczania szkodników, selektywna osłona układu oddechowego i przewodu pokarmowego przed zakażeniem mikroorganizmami odpornymi na klasyczne środki przeciwbakteryjne [47].

Ocena roli, jaką pełnią białka i polipeptydy odpornościowe owadów w całości kształcie mechanizmów obronnych, jest możliwa na tle podstawowych mechanizmów zaangażowanych w odporności owada, zwłaszcza całej gamy zjawisk rozgrywających się w ich jamie ciała, których efektem jest likwidacja zakażenia. Procesy odpornościowe u owadów, podobnie jak u ssaków, zapoczątkowuje rozpoznanie intruza jako składnika obcego (*non self*) dla organizmu [56]. Rozpoznanie uruchamia całą kaskadę zjawisk związanych z odpornością. W odporności owada uczestniczy układ oksydazy polifenolowej i lektyny jako główne czynniki zaangażowane w proces rozpoznania immunologicznego [14, 53], hemokiny (odpowiednik cytokin kręgowców) pełniące rolę rozpuszczalnych mediatorów odpowiedzi immunologicznej [11], hemocytarne odczyny obronne, na które składa się nie tylko fagocytoza, ale także nodulacja i inkapsulacja [26, 55, 57, 58] oraz humoralne odczyny obronne o charakterze wrodzonym (lizozym hemolimfy) i indukowane (nabyte), pojawiające się z chwilą naruszenia integralności fizjologicznej organizmu owada [1, 3, 12, 25]. Wśród mechanizmów odporności nabytej kluczowe znaczenie odgrywają drobnocząsteczkowe białka i polipeptydy zasadowe definiowane jako antysomy – białka odpornościowe owada (*immune proteins*) [38].

Odporność nabyta owadów różni się zasadniczo od odporności nabytej ssaków. U owadów pojawia się ona szybko (po kilku godzinach) po zakażeniu lub zadziałaniu induktorów abiotycznych (np. jałowy bulion bakteriologiczny), utrzymuje się zaledwie przez kilka (3–5) dni, w zasadzie jest pozbawiona swoistości w rozumieniu swoistości immunologicznej kręgowców, to znaczy u jej podstaw nie znajduje się reakcja serologiczna typu antygen - przeciwciało lub antygen - uczulony limfocyt T. Odporność owadów jest zasadniczo ukierunkowana na drobnoustroje saprofityczne, z którymi zwierzęta te spotykają się najczęściej w środowisku. Tylko wyjątkowo występuje u owadów pamięć immunologiczna i związana z nią odpowiedź wtórna przypominająca odpowiedź wtórna ssaków [22].

Na podstawie struktury, zakresu aktywności przeciwbakteryjnej i mechanizmu działania na drobnoustroje wyróżniono u owadów 5 klas przeciwbakteryjnych peptydów i białek odpornościowych [7], a mianowicie: lizozymy, polipeptydy o strukturze  $\alpha$ -helikalnej, peptydy zawierające wiązania dwusiarczkowe w cząsteczce, drobnocząsteczkowe polipeptydy bogate w reszty argininy - proliny oraz duże polipeptydy o wielu domenach [4]. Większość z nich cechuje lityczno-jonoforowy mechanizm działania na docelowe drobnoustroje, dzięki czemu zwiększeniu ulega przepuszczalność bakteryjnych błon cytoplazmatycznych. Przez powstające kanały jonowe w warstwie lipidowej błony komórki bakteryjnej, komórka traci jony potasu, czego efektem jest zanik potencjału błonowego i śmierć bakterii [3].

Sprawność układu immunologicznego owadów, u których nie występują limfocyty T i limfocyty B oraz substancje efektorowe, jest zadziwiająco duża. Owady pojawiły się na Ziemi w środkowym dewonie przed ponad 300 mln lat, a obecnie są zdecydowanie największą grupą zwierząt, która obejmuje co najmniej 850 000 gatunków [52]. Dzięki sprawności tego, zdawało by się prymitywnego układu odpornościowego, owady mogły zasiedlić nawet nisze ekologiczne o ekstremalnych warunkach [52].

Spośród wielu białek odpornościowych owadów, o znanej strukturze i funkcji na szczególną uwagę zasługują: lizozym [10, 34, 39, 50, 51, 54], cekropiny [2, 3, 16], attacyny [32], dipterycyny [33, 38], apidycyny i defenzyny [5, 6, 7, 8, 9]. W grupie ponad 100 opisanych w ostatnich latach białek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, istotną rolę w poznaniu szlaków ewolucyjnych odporności, stopnia zaangażowania w obronie przeciwzakaźnej oraz możliwości wykorzystania jako antybiotyków nowej generacji odgrywają defenzyny [20, 42], cykliczne peptydy przeciwgrzybicze [17] 0-glikozylowane peptydy przeciwbakteryjne [59], indukowane przeciwbakteryjne polipeptydy pszczoły miodnej, a także metalnikowiny, morycyna [28] skoleksyna [40] i miecznikowiny [43].

## LIZOZYM OWADÓW

Za podstawowy humoralny czynnik przeciwbakteryjny owadów uznawany był do niedawna lizozym hemolimfy, enzym bakteriolityczny o aktywności N-acetylo-

muramylohydrolazy (EC 3.2.1.17). Niezależnie od źródła pochodzenia, lizozymy owadów stanowią klasę drobnocząsteczkowych białek zasadowych o masie około 15 kDa i właściwościach zbliżonych do lizozymu białka jaja kurzego; zaliczane są one do lizozymów właściwych typu C (*chicken*) [39]. U owadów źródłem lizozymu jest ciało tłuszczowe (*fat body*), będące głównym organem biosyntezy białek, w tym białek hemolimfy. U niektórych gatunków owadów lizozym powstaje także w hemocytach, a nawet w komórkach nabłonka jelita środkowego [34]. Na ciało tłuszczowe, jako główny organ syntezy lizozymu, wskazuje spadek aktywności lizozymu hemolimfy po iniekcji do jamy ciała pobudzonego immunologicznie owada aktywnymyocyny D lub cykloheksymidu, inhibitorów transkrypcji kwasów nukleinowych i biosyntezy białek rybosomalnych u organizmów eukariotycznych [35, 36, 37].

Względnie niski wrodzony (fizjologiczny) poziom lizozymu hemolimfy wzrasta drastycznie, nawet stokrotnie, w zakażeniach bakteryjnych lub po iniekcji substancji abiotycznych do jamy ciała owada. Osiąga on maksymalny poziom w hemolimfie 24–48 godzin po immunizacji. Zakażenie bakteryjne jamy ciała w każdym przypadku indukuje maksymalny wzrost poziomu lizozymu w hemolimfie. Stężenie tego enzymu w hemolimfie immunizowanych gąsienic barciaka większego *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*) osiąga wartość nawet  $8 \times 10^3$   $\mu\text{g/ml}$  i utrzymuje się na tak wysokim poziomie przez co najmniej 72 godz.

Spektrum bakteriobójczego działania lizozymu jest wąskie i ogranicza się w zasadzie do saprofitycznych bakterii Gram dodatnich z rodzaju *Micrococcus*, *Bacillus* i *Sarcina* [51, 54]. Wzrostowi stężenia lizozymu w hemolimfie towarzyszy z reguły niepodatność owada na zakażenie bakteryjne. U nieimmunizowanych gąsienic motyla *G. mellonella* śmiertelna posocznica rozwija się po zakażeniu jamy ciała kilkoma komórkami *Pseudomonas aeruginosa*. Natomiast gąsienice immunizowane, gdy stężenie lizozymu w hemolimfie osiąga miano maksymalne, przeżywają zakażenie liczbą bakterii przekraczającą wielokrotnie dawkę letalną ( $0,9 \times 10^3$ ). Bakterie w hemocelu immunizowanego owada szybko giną, podczas gdy u gąsienic nieimmunizowanych, *P. aeruginosa* namnaża się w hemolimfie powodując padanie owadów wśród objawów posocznicy [35].

## **INDUKOWANE POLIPEPTYDY I BIAŁKA ODPORNOŚCIOWE HEMOLIMFY O DZIAŁANIU PRZECIWBAKTERYJNYM**

### **Cekropiny**

Pod koniec lat siedemdziesiątych grupa badawczy z Uniwersytetu w Sztokholmie reprezentująca szkołę Bomana wykryła w hemolimfie poczwarki jedwabnika dębowego *Hyalophora cecropia* (*Lepidoptera*) obecność polipeptydów o właściwo-

ściach bakteriobójczych [16]. Te indukowane peptydy odpornościowe określone mianem cekropin [2, 3, 16], są reprezentowane przez zasadowe, termostabilne peptydy o strukturze  $\alpha$ -helikalnej, masie około 4 kDa. Część cząsteczki cekropiny składa się z 37 reszt aminokwasowych, w tym 8 reszt aminokwasów zasadowych (rys. 1). Amfipatyczna N-terminalna część łańcucha polipeptydowego jest zasadowa, podczas gdy region C-terminalny jest obojętny i ma długie rozgałęzienia hydrofobowe. Centralny region cząsteczki cekropiny, złożony z 20–30 reszt aminokwasowych jest silnie hydrofobowy. Część C-terminalna cząsteczki zawierająca azot w postaci reszty amidowej jest odpowiedzialna za działanie bakteriobójcze cekropiny.

W obrębie 6 poznanych cekropin jedwabnika dębowego *Hyalophora cecropia* wyróżniono 3 cekropiny główne (A, B i D) i trzy poboczne (C, E, F) uznane za prekursorów cekropin głównych. Wszystkie cekropiny cechują się daleko posuniętą homologią struktury pierwszorzędowej. Cekropiny A i B z *H. cecropia* zawierają 25 homologicznych aminokwasów w cząsteczce, zaś cekropina D ma 18 homologicznych reszt aminokwasowych z cekropinami A i B. Wysoki stopień homologii struktury pierwszorzędowej polipeptydów cekropin wskazuje na pochodzenie cekropin od wspólnego przodka. Najprawdopodobniej gen odpowiedzialny za syntezę cekropiny D pojawił się w ewolucji wcześniej, natomiast geny kodujące cząsteczkę cekropiny A i B są efektem duplikacji genu wyjściowego i pojawiły się co najmniej przed około 50 milionami lat [3, 30].

Cekropiny, które cechuje aktywność bakteriobójcza skierowana przeciwko bakteriom Gram ujemnym i wielu gatunkom bakterii Gram dodatnich, pojawiają się w hemolimfie owadów holometabolicznych po 8–10 godz. od zakażenia. Charakterystyczną cechą cekropin A i B jest działanie na potencjalne patogeny bakteryjne owadów, takie jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* i *Xenorhabdus nematophilus*, ale nie na *Bacillus thuringiensis*. Najlepszymi induktorami syntezy cekropin są żywe komórki bakterii saprofitycznych, a także zabite bakterie patogenne. W słabym stopniu syntezę cekropin indukują czynniki abiotyczne, np. jałowy bulion bakteriologiczny. Cekropiny są syntetyzowane głównie w ciele tłuszczowym, skąd uwalniane są do hemolimfy owada [2, 3].

I.	W--NPFKEL	EKVGQRVRDA	VISAGPAVAT	VAQATALAK*
II.	W--NPFKEL	ERAGQRVRDA	IISAGPAVAT	VAQATALAK*
III.	W--NPFKEL	ERAGQRVRDA	VISAAPAVAT	VGQAAAIARG*
IV.	RW--KLFKKI	EKVGRNVRDG	LIKAGPAIAV	IGQAKSL*

Rys. 1. Struktura pierwszorzędowa cząsteczki: (I) cekropiny D *Hyalophora cecropia*, (II) cekropiny D *Antheraea pernyi*, (III) cekropiny B *Manduca sexta* i (IV) cekropiny C *Bombyx mori*, \* reszta amidowa zakończenia C-terminalnego cząsteczki cekropiny [12], legenda: A – alanina, D – kwas asparaginowy, E – kwas glutaminowy, F – fenyloalanina, G – glicyna, H – histydyna, I – izoleucyna, K – lizyna, L – leucyna, M – metionina, N – asparagina, P – prolina, Q – glutamina, R – arginina, S – seryna, T – treonina, V – walina, W – tryptofan, wytłuszczenia wskazują na homologię struktury pierwszorzędowej

Docelową strukturą działania cekropin jest ściana komórki bakteryjnej. Częśćeczka dimeru cekropiny przyłącza się częścią zawierającą ugrupowanie amidowe do lipidów błony komórkowej, czego efektem jest powstanie kanałów jonowych, przez które uciekają z komórki bakteryjnej jony potasu [3, 15]. Rolę cekropin w odporności przeciwwakaźnej owada można sprowadzić do obrony organizmu przed zakażeniem bakteriami saprofitycznymi, które występują obficie w otoczeniu owada.

### Attacyny

Zakażenie bakteriami saprofitycznymi jamy ciała poczwarki jedwabnika dębowego *Hyalophora cecropia* indukuje pojawienie się w hemolimfie co najmniej 15 białek, z których co najmniej dwa – cekropiny i attacyny działają przeciwbakteryjnie. Attacyny stanowią grupę blisko spokrewnionych, indukowanych białek odpornościowych o masie 20–23 kDa i wąskim spektrum działania na bakterie, zwłaszcza na *Escherichia coli*. Działanie przeciwbakteryjne attacyn jest znacznie słabsze w porównaniu do cekropin. W przeciwieństwie do bakteriobójczego działania lizozymu i cekropin, attacyny działają bakteriostatycznie [32].

Na podstawie składu aminokwasowego i budowy pierwszorzędowej cząsteczki wyróżnia się dwie grupy attacyn: formy zasadowe A, B C i D oraz formy kwaśne E i F (rys. 2). Cząsteczka attacyny zawiera dużo reszt glicyny i dlatego attacyny zostały zaliczone łącznie z sarkotoksyną, koleopterycyną, dipterycyną i hymenoptecyną do grupy polipeptydów bogatych w prolinę (*proline-rich antibacterial peptides*). Wszystkie formy attacyn mają wspólne determinanty antygenowe, a ponadto attacyny kwaśne są wyposażone w dodatkową wspólną determinantę. Synteza attacyn u owadów pobudzonych immunologicznie, podobnie jak cekropin, ma miejsce w ciele tłuszczowym i jest sterowana przez dwa odrębne promotory genów, jeden kieruje syntezą form zasadowych, a drugi jest odpowiedzialny za syntezę form kwaśnych [12].

Spektrum działania przeciwbakteryjnego attacyn jest wąskie. Oprócz *Escherichia coli* na attacyny podatne są *Acetobacter calcoaceticus* i *Pseudomonas maltophilia*, i to wyłącznie w fazie podziałów komórkowych. Miejscem działania docelowego

Attacyna A  
Attacyna E

AGALTINSNGTSGAVVKVPI  
NAHGALTLSNGTSGAVVKVPFAGNNLNI

Rys. 2. Skład aminokwasowy cząsteczki attacyny A i E *Hyalophora cecropia* [32], legenda patrz rys. 1



jest ściana komórki bakterii, która pod wpływem attacyin staje się bardziej podatna na destrukcyjny wpływ cekropin i lizozymu [32].

## CYKLICZNE POLIPEPTYDY

Badając różne aspekty odporności przeciwważkowej owadów zwrócono uwagę na właściwości biochemiczne i immunologiczne polipeptydów cyklicznych. Cykliczne polipeptydy mają indukowany charakter i cechują się obecnością mostków dwusiarczkowych stabilizujących strukturę cząsteczki, a tym samym oporność na wysokie temperatury i niskie pH. Spośród wielu cyklicznych polipeptydów owadów istotne znaczenie w odporności przeciwważkowej odgrywają defenzyny o działaniu przeciwbakteryjnym oraz peptydy o działaniu przeciwważkowym.

### Defenzyny

Defenzyny owadów stanowią liczną grupę zasadowych polipeptydów o masie 4–5 kDa, zawierających w cząsteczce 6 reszt cysteiny i 3 mostki dwusiarczkowe [42, 44]. W budowie czwartorzędowej defenzyny muchówki *Phormia terranovae* (Diptera) występują trzy domeny: N-terminalna pętla utworzona przez 13 reszt aminokwasowych i cechująca się pewnym stopniem elastyczności, centralna amfipatyczna  $\alpha$ -helisa utworzona przez aminokwasy w pozycji 14–24, oraz C-terminalna  $\beta$ -kartka zawierająca aminokwasy od pozycji 27 do 40. Dwa mostki dwusiarczkowe łączące  $\beta$ -kartkę z N-terminalnym zakończeniem cząsteczki defenzyny stabilizują  $\alpha$ -helisę cząsteczki defenzyny [20, 45].

Defenzyny występują u muchówek (Diptera), błonkówek (Hymenoptera), chrząszczy (Coleoptera), pluskwiaków (Hemiptera) i ważek (Odonata), nie stwierdzono ich u motyli (Lepidoptera). Wszystkie defenzyny owadów, z wyjątkiem defenzyny muchówki *Sarcophaga peregrina*, są syntetyzowane przez komórki ciała tłuszczowego jako pre-prodefenzyny [13]. Zawierają one 29 reszt aminokwasowych, w tym 4 reszty aminokwasów zasadowych.

Działanie defenzyn polega na zmianie przepuszczalności i częściowej depolaryzacji błony cytoplazmatycznej komórki bakteryjnej, obniżeniu zawartości ATP w cytoplazmie, co pociąga za sobą zahamowanie oddychania i szybko prowadzi

I.	ATCDLLS	GTGINHSAC	AAHCLLRGNRGGYCNGKAVCVCRN
II.	FTCDVLGFEIAGTKLNSAAC		GAHCLALGRRGGYCNSKSVCVCR
III.	VTCDLLSFK	GQVNSDAC	AANCLSLGKAGGHCE KGVICRKT –SFKDLWDKYF

Rys. 3. Struktura pierwszorzędowa: (I) defenzyny A *Sarcophaga peregrina*, (II) defenzyny A *Zophobas atratus* i (III) rojalizyny *Apis mellifera* (wg [12] zmienił), legenda patrz rys. 1

do śmierci bakterii. Defenzyny działają bakteriobójczo na bakterie Gram dodatnie, przy nieznacznej aktywności w stosunku do bakterii Gram ujemnych [13] (rys. 3).

Dotychczas określono strukturę 11 defenzyn owadów: defenzyny A, B i C *Phormia terranova* (Diptera), defenzyny *Eristalis tenax* (Diptera), sapecyny A, B i C *Sarcophaga peregrin* (Diptera), rojalizyny pszczoły miodnej *Apis mellifera* (Hymenoptera), defenzyny A i B. *Zophobas atratus* (Coleoptera), defenzynę *Aeschna cyanea* (Odonata) i harybdotoksynę skorpionia *Leiurus quinquestriatus*. Najlepiej poznano strukturę defenzyn muchówki *P. terranova*. Wszystkie defenzyny mają wspólne sekwencje aminokwasowe zarówno w pętli, jak i w helisie i w karcie  $\beta$  (rys. 3). Interesującą cechą defenzyn owadów jest ich strukturalne podobieństwo do defenzyn ssaków występujących między innymi w neutrofilach i wydzielinach przewodu pokarmowego. Defenzyny owadów wykazują także podobieństwa do polipeptydów o działaniu przeciwbakteryjnym występujących u roślin [4]. Ponieważ defenzyny występują też u pajęczaków i u ślimaków, przypuszcza się, że odgrywają one kluczową rolę w odporności przeciwwakaznej bezkręgowców.

**Rojalizyna.** Defenzyna o masie około 5,5 kDa i strukturze amfipatycznej, obecna w mleczku pszczelim i w hemolimfie zakażonych pszczół. Częsteczka rojalizyny zawiera 51 reszt aminokwasowych oraz trzy mostki dwusiarczkowe stabilizujące jej strukturę (rys. 3). Zakończenie C-terminalne cząsteczki rojalizyny ma ładunek ujemny, zaś 6 reszt cysteiny nadaje strukturę globularną cząsteczce i czyni ją oporną na ogrzewanie i niskie wartości pH. Rojalizynę cechuje silna aktywność skierowana przeciwko bakteriom Gram dodatnim. Szczególnie podatne na jej działanie są: *Lactobacillus aerofaciens*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Leuconostoc* sp., *Streptococcus cremoris* i *Staphylococcus aureus* [19, 29]. Rojalizyna łącznie z kwasem 1-hydroksy- $\Delta^2$ -decenowym warunkuje aktywność przeciwbakteryjną mleczka pszczelego, a za jego pośrednictwem hamuje zakażenia bakteryjne w jelicie czerwia. Współdziała ona także w utrzymaniu równowagi biologicznej w przewodzie pokarmowym pszczoły [24].

**Sapecyny.** Defenzyny *Sarcophaga peregrina*, zwane sapecynami, stanowią grupę indukowanych polipeptydów przeciwbakteryjnych syntetyzowanych w hemocytach pod wpływem zakażenia lub urazów mechanicznych i wydzielanych do hemolimfy. Promotor sterujący syntezą sapecyn ulega także samoistnej aktywacji w okresie embrionalnym i podczas przepoczwarzania [60]. Z tych względów przypisuje się pewne znaczenie sapecynom jako czynnikom sterującym metamorfozą owada. Aktywność przeciwbakteryjna sapecyn dotyczy nie tylko bakterii Gram dodatnich (*Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*). W wyższych stężeniach sapecyny działają także na bakterie Gram ujemne. Miejscem działania docelowego sapecyn są struktury lipidowe błony komórki bakteryjnej [46].

**Koleopterycyny.** Spośród trzech znanych defenzyn, indukowanych białek bogatych w cysteinę (*cysteine-rich peptides*) zidentyfikowanych u chrząszcza *Zophobas atratus* (*Coleoptera*), najlepiej poznano koleopterycyny B i C. Te dwie izoformy zawierające 43 reszty aminokwasowe mają aż 6 reszt cysteiny w cząsteczce. Koleopterycynę C cechuje silna aktywność w stosunku do *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus pyogenes* i *Bacillus subtilis*. Słabiej działa na drobnoustroje z rodzaju *Corynebacterium*. Bakterie Gram ujemne nie są podatne na działanie koleopterycyny C [4].

## O-GLUKOZYLOWANE POLIPEPTYDY PRZECIWGRZYBICZE OWADÓW

W 1994 r. Fehlbaum i wsp. [17] wyodrębnili z hemolimfy muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (*Diptera*) polipeptyd (drozomycyna) o działaniu przeciwgrzybiczym. W dwa lata później ci sami autorzy stwierdzili obecność polipeptydu o działaniu przeciwgrzybiczym, a także działaniu przeciwbakteryjnym w hemolimfie *Podisus maculiventris*.

### Drozomycyna

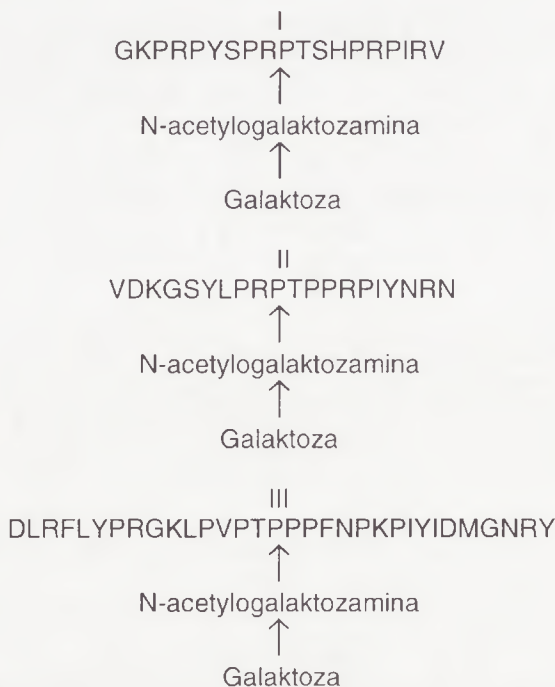
Drozomycyna o cząsteczce zawierającej 44 reszty aminokwasowe ma aż 8 reszt cysteiny tworzących 4 mostki dwusiarczkowe. Obecność cysteiny warunkuje oporność na ogrzewanie i skrajne wartości pH. Struktura pierwszorzędowa drozomycyny wykazuje duży stopień homologii z roślinnymi polipeptydami o działaniu przeciwgrzybowym (defenzyny roślinne). W stężeniu poniżej 1  $\mu\text{M}$  drozomycyna działa na grzyby patogenne dla roślin i zwierząt [18].

### Tanatyna

Tanatyna, indukowany polipeptyd o cząsteczce złożonej z 21 reszt aminokwasowych ma jeden mostek dwusiarczkowy stwierdzono ją w hemolimfie *Podisus maculiventris*. Ten polipeptyd w stężeniu 0,5–5,0  $\mu\text{M}$  działa na zoopatogenne i fitopatogenne grzyby, a także na bakterie Gram dodatnie i Gram ujemne. Za aktywność przeciwgrzybową odpowiada trójpeptyd zlokalizowany w części N-terminalnej cząsteczki tanatyny [4].

## O-GLUKOZYLOWANE POLIPEPTYDY ODPORNOŚCIOWE O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ

Prototypem polipeptydów odpornościowych O-glikozylowanych o aktywności przeciwbakteryjnej jest drozomycyna (rys. 4) [59]. Glikozylacja cząsteczki jest od-



Rys. 4. Struktura O-glikozylowanych polipeptydów: (I) drozocyny *Drosophila melanogaster*, (II) pyrokorycyny *Pyrrhocoris apterus* i (III) ebocyny *Bombyx mor.*, legenda patrz rys. 1

powiedzialna za przeciwbakteryjną aktywność polipeptydu. Polipeptyd nie glikozylowany działa słabo przeciwbakteryjnie. Istnieją sugestie, że O-glikozylowane polipeptydy odpornościowe wywodzą się bądź od metalnikowin, u których uległ skróceniu region N-terminalny cząsteczki, bądź od apidycyn po skróceniu regionu C-terminalnego cząsteczki [4].

### Drozocyna

Drozocyna, która jest indukowanym bogatym w prolinę polipeptydem odpornościowym o cząsteczce zbudowanej z 19 reszt aminokwasowych, zawiera w pozycji 11 (treonina) resztę N-acetyloglukozamino galaktozy. Nawet w niskich stężeniach (0,1  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) drozocyna wywiera silne działanie na bakterie Gram ujemne [59].

### Pyrokorycyna

W hemolimfie zakażonych osobników kowala bezskrzydłego *Pyrrhocoris apterus* (*Hemiptera*) występuje polipeptyd o strukturze zbliżonej do drozocyny i do me-

talnikowin, nazwany pyrokorycyną. Pyrokorycyna różni się od metalnikowin obecnością treoniny, której nie zawiera cząsteczka metalnikowiny. Podobnie jak w przypadku drozocyny, O-glikozylacja jest koniecznym warunkiem do silnego działania przeciwbakteryjnego pyrokorycyny [12]. Proces ten schematycznie przedstawiono na rysunku 4.

### Lebocyna

Lebocyny występujące w trzech izoformach zidentyfikowano po raz pierwszy w hemolimfie jedwabnika morwowego *Bombyx mori* (*Lepidoptera*). Izoforma 1 i 2 różnią się od izoformy 3 resztą aminokwasową w pozycji 16. Fenyloalaninę występującą w cząsteczce lebocyny 1 i 2 zastępuje leucyna w izoformie 3 (rys. 4). Lebocyny działają wyłącznie na bakterie Gram ujemne [4].

## PRZECIWBAKTERYJNE POLIPEPTYDY PSZCZOŁY MIODNEJ

Odporność humoralna jamy ciała pszczoły miodnej zależy od aktywności przeciwbakteryjnej lizozymu, apidycyn, abycyny i hymenoptecyny.

### Apidycyny

W grupie polipeptydów o dużej zawartości reszt proliny w cząsteczce (*proline-rich peptides*) szczególną pozycję zajmują apidycyny – odpornościowe peptydy pszczołowatych (*Apoidea*), a także innych przedstawicieli błonkówek (*Hymenoptera*) i muchówek (*Diptera*). Dotychczas zidentyfikowano 16 rodzajów tych przeciwbakteryjnych, drobnocząsteczkowych (około 2 kDa) białek hemolimfy. Poziom apidycyn w hemolimfie pszczoły miodnej *Apis mellifera* osiąga nawet 25  $\mu\text{M}$ . Apidycyny występują u czerwia pszczoły miodnej w formie biologicznie nieaktywnego prekursora (proapidycyna) (rys. 5), który u imago pszczoły ulega konwersji do biologicznie aktywnej postaci pod wpływem proteolitycznej degradacji cząsteczki proapidycyny [6]. Cztery znane izoformy apidycyny pszczoły miodnej (Ia, Ib, II

Proapidycyna Ia/b	EAKPEAKP	GNNRPVYIPQPRPPHPR <sup>1/L</sup>
Apidycyna Ia		GNNRPVYIPQPRPPHPRI
Apidycyna Ib		GNNRPVYIPQPRPPHPRL
Apidycyna II		GNNRPIYIPQPRPPHPRL
Apidycyna III		GNNRPVYISQPRPPHPRI

Rys. 5. Sekwencja aminokwasów w cząsteczce proapidycyny i apidycyn *Apis mellifera* [5], legenda patrz rys. 1

i III), każda zbudowana z 18 reszt aminokwasowych (rys. 5) różniących się jedynie nieznacznie składem aminokwasowym, są odporne na ogrzewanie w odczynie kwaśnym (pH 2,0). Obecność 6 reszt proliny w cząsteczce jest odpowiedzialna za stabilność apidycyny [5, 7, 8, 9].

Apidycyny działają bakteriobójczo na trzy duże grupy bakterii Gram ujemnych, z którymi pszczoła spotyka się w czasie zbierania nektaru i pyłku oraz pobierania wody. Szczególnie na apidycyny podatne są bakterie fitopatogenne, takie jak: *Erwinia salicis* i *Pseudomonas syringae*, bakterie związane symbiotycznie z roślinami (*Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium melliloti*) oraz bakterie jelitowe patogenne dla człowieka i zwierząt, takie jak *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*. Bakterie jelitowe wraz z wydaliniami ludzi i zwierząt zanieczyszczają wodę i rośliny odwiedzane przez pszczoły. Spektrum działania przeciwbakteryjnego apidycyn jest zbliżone zaś mechanizm ich działania na bakterie polega na zwiększeniu przepuszczalności błony komórki bakteryjnej dla jonów, czego efektem jest śmierć bakterii.

Pojawienie się apidycyn w hemolimfie osobników dorosłych pszczoły miodnej przy względnie niskiej aktywności lizozymu może wskazywać na daleko posuniętą adaptację mechanizmów obrony jamy ciała do zwalczania bakterii obecnych w niszach ekologicznych zasiedlanych przez ten gatunek [23].

### Abycyna

Abycyna jest bogatym w prolinę indukowanym polipeptydem o masie około 4,0 kDa i zakresie działania na bakterie Gram ujemne i Gram dodatnie. Cząsteczka abycyny zawiera 10 reszt proliny i jest pozbawiona cysteiny. Równomierny rozkład reszt proliny w łańcuchu polipeptydowym cząsteczki zapobiega przyjęciu przez polipeptyd struktury  $\alpha$ -helikalnej (rys. 6). Abycyna wykazuje dużą homologię z apidycynami pszczoły *Apis mellifera* i dipterycynami muszki owocowej *Drosophila* [31].

Aktywność abycyny ujawnia się wyłącznie w środowisku o niskiej sile jonowej. Wydaje się, że w organizmie pszczoły istnieją czynniki aktywujące działanie przeciwbakteryjne tego peptydu. Działa on na bakterie Gram ujemne, takie jak: *Agrobacter tumefaciens*, *Erwinia salicis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, a także na bakterie Gram dodatnie – *Bacillus alvei*, *B.*

YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY

Rys. 6. Struktura pierwszorzędowa abycyny *Apis mellifera* [6], legenda patrz rys. 1

*megaterium* i *Micrococcus luteus*. Aktywność abycyny w stosunku do *A. tumefaciens*, *E. salicis* i *E. coli* przewyższa około 200-krotnie aktywność apidycyn. Najprawdopodobniej mechanizm działania abycyny polega na lizie ściany komórki bakteryjnej.

Można przypuszczać, że zarówno apidycyny, jak i abycyna świadczą o zastosowaniu pszczoły miodnej do likwidacji fitopatogennych bakterii, które występując powszechnie w środowisku życia tego gatunku, mogą z łatwością przedostawać się do jego jamy ciała przez zraniony oskórek względnie przez uszkodzoną ścianę jelita środkowego [25].

### Hymenoptecyna

Hymenoptecyna, polipeptyd z grupy peptydów odpornościowych bogatych w prolinę o masie 10 kDa składa się z 93 reszt aminokwasowych. Działa ona na bakterie Gram ujemne oraz bakterie Gram dodatnie zwiększając przepuszczalność błony komórki bakteryjnej. Zarówno indukcja hymenoptecyny, jak i abycyny wymaga zakażenia jamy ciała dużymi ilościami bakterii. Obydwa te polipeptydy pojawiają się w hemolimfie później aniżeli apidycyny, a przy tym w znacznie mniejszych stężeniach [9].

## MORYCYNA I METALNIKOWINY

### Morycyna

Badając aktywność hemolimfy immunizowanych gąsienic jedwabnika morwowego *Bombyx mori* (*Lepidoptera*), Hara i Yamakawa wykryli w 1995 r. polipeptyd złożony z 42 reszt aminokwasowych (rys. 7), hamujący wzrost *Staphylococcus aureus*. Strukturą na którą działa ten polipeptyd nazwany morycyną jest błona komórki bakteryjnej [27]. Dalsze badania wykazały, że na morycynę podatne są również: *Escherichia coli*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* i *B. cereus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Streptococcus pyogenes*. Bakterie Gram dodatnie są bardziej wrażliwe na działanie morycyny aniżeli bakterie Gram ujemne.

AKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKPKKRKH

Rys. 7. Sekwencja aminokwasów w cząsteczce morycyny *Bombyx mori* [27], legenda patrz rys. 1

Struktura  $\alpha$ -helikalna cząsteczki morycyny upodabnia ją do cekropin, z tym że morycyna nie zawiera azotu aminowego. Ponadto w cząsteczce morycyny nie ma mostków dwusiarczkowych. Morycyna jako indukowane białko odpornościowe o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego jest jednym z głównych czynników humoralnych obrony przeciwbakteryjnej jamy ciała jedwabnika morwowego. Aktywność przeciwgrzybowa morycyny jest słabo zaznaczona i w zasadzie ukierunkowana na drożdżaki. Morycyna o silnym działaniu na bakterie Gram dodatnie, łącznie z cekropinami jedwabnika morwowego o działaniu ukierunkowanym zasadniczo na bakterie Gram ujemne, likwidują skutecznie zakażenia jamy ciała gąsienicy *Bombyx mori* [28].

### Metallikowiny

Metallikowiny stanowią interesującą grupę bogatych w prolinę (*proline-rich peptides*) peptydów odpornościowych, ponieważ ich spektrum działania dotyczy zarówno bakterii, jak i grzybów [4]. Te indukowane drobnocząsteczkowe polipeptydy opisane u pluskwiaka *Palomena prasina* występują w czterech izoformach (I, IIa, IIb i III), każda zbudowana z 26 reszt aminokwasowych (rys. 8). W przeciwieństwie do bakteriobójczego działania drozycyny i pyrokorycyny, działają one bakteriostatycznie. Metallikowiny muszki owocowej *Drosophila melanogaster* nie działają na bakterie Gram ujemne, natomiast cechują się wysoką aktywnością skierowaną przeciwko bakteriom Gram dodatnim i grzybom. Na uwagę zasługuje fakt, że C-terminalne domeny abycyny, lebcocyn i metallikowin wykazują daleko posunięte podobieństwa w budowie [43].

I	VDKPDYRPRPRPPNM
IIa	VDKPDYRPRPWPRPN
IIb	VDKPDYRPRPWPRNMI
III	VDKPDYRPRPWPRPNM

Rys. 8. Pierwotna struktura metallikowin I, IIa, IIb i III *Palomena prasina* [4], legenda patrz rys. 1

### Miecznikowiny

Miecznikowiny, ostatnio opisana grupa polipeptydów odpornościowych owadów, została wykryta w hemolimfie zakażonych muszek *Drosophila melanogaster*. Cząsteczka złożona z 26 reszt aminokwasowych wykazuje duże podobieństwo z abycyną pszczoły miodnej i lebcocynami jedwabnika morwowego. Zakres działania miecznikowin jest szeroki i obejmuje bakterie oraz grzyby [43].



## UWAGI KOŃCOWE

Jakkolwiek świat owadów cechuje ogromna różnorodność budowy ciała, zasiedlanych nisz ekologicznych, różnorodność zdolności wykorzystywania rozmaitych źródeł pożywienia oraz przebiegu rozwoju osobniczego, to jednak strategie odporności przeciwwakażnej są u wszystkich owadów identyczne lub bardzo zbliżone. Bariery ochronne okrywy ciała i struktury anatomiczno-fizjologiczne przewodu pokarmowego, które chronią jamę ciała owada przed zakażeniem, są w zasadzie takie same u wszystkich grup owadów. Również mechanizmy rozpoznawania składników obcych od struktur własnych ustroju, a także hemocytarne odczyny obronne są zbliżone. U wszystkich gatunków owadów bardzo aktywna jest fagocytoza, z reguły wspomagana przez tworzenie guzków. Tworzenie guzków (nodulacja) polega na otoczeniu fagocytów z pochłoniętymi bakteriami przez kilka warstw komórek krwi [38]. W przypadku inwazji pasożytów do hemolimfy pojawia się dodatkowy odczyn komórkowy jakim jest inkapsulacja. Proces inkapsulacji polega na utworzeniu wokół pasożytów otoczki złożonej z kilku lub kilkudziesięciu warstw hemocytów. Substancja obca łącznie z otoczką hemocytarną tworzy kapsułę. Często w ścianie otoczki odkłada się melanina [38]. Również u wszystkich owadów naturalnym (fizjologicznym) czynnikiem obrony przeciwbakteryjnej jamy ciała jest lizozym. Owady o miękkiej okrywie ciała, tym samym częściej narażone na zakażenia bakteryjne i atak pasożytów, reagują szybkim i drastycznym podwyższeniem poziomu lizozymu w hemolimfie (hipersynteza lizozymu).

Indukowalna (nabyta) odporność humoralna jest realizowana u owadów według identycznego schematu. W zakażonym osobniku są syntetyzowane *de novo* zasadowe białka i polipeptydy o aktywności skierowanej głównie przeciwko bakteriom, w większości przeciwko bakteriom Gram ujemnym. W nielicznych tylko przypadkach, aktywności przeciwbakteryjnej towarzyszy działanie przeciwgrzybicze, a wyjątkowo indukowane polipeptydy cechuje wyłącznie aktywność przeciwgrzybowa. Pomimo identycznego miejsca działania docelowego przeciwbakteryjnych białek odpornościowych owadów, jakim są struktury ściany komórki bakteryjnej, i identycznej roli w odporności przeciwwakażnej, indukowane białka odpornościowe owadów różnią się wielkością, składem aminokwasowym i budową przestrzenną cząsteczki. Niemniej jednak, w obrębie poszczególnych grup polipeptydów odpornościowych (cekropiny, attacyny, dipterycyny, apidycyny) stwierdzono daleko posuniętą homologię w strukturze pierwszorzędowej cząsteczki. Sprawność mechanizmów immunologicznych owadów jest zadziwiająca, co zapewnia tym bezkręgowcom przeżycie w ekstremalnych warunkach środowiska.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BOMAN HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Ann Rev Immun* 1995; **13**: 61–92.
- [2] BOMAN HG, FAYEI, GUDMUNDSSON GH, LEE JY, LINDHOLM DA. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Eur J Biochem* 1991; **201**: 23–31.
- [3] BOMAN HG, HULTMARK D. Cell-free immunity in insects. *Ann Rev Microbiol* 1987; **41**: 103–126.
- [4] BULET P, HOFFMAN D, HETRU C. Antimicrobial peptides/polypeptides from insects: biochemical aspects. Cooperation in Science and Techniques, Action - 819 Entomopathogenic Nematodes Workshop, Punta del Gada Univ. of Azores March 18–22, 1996; 1–14.
- [5] CASTEELS PR, AMPE C, JACOB F, VAECK M, TEMPST P. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 1989; **8**: 2387–2391.
- [6] CASTEELS PR, AMPE C, RIVIERE L, VAN DAMME J, ELICONE C, FLEMING M, JACOBS F, TEMPST P. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem* 1990; **187**: 381–389.
- [7] CASTEELS P, AMPE C, JACOBS F, TEMPST P. Functional and chemical characterisation of hymenoptaecin, an antibacterial peptide that is infection-unducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Biol Chem* 1993; **268**: 7044–7054.
- [8] CASTEELS P, ROMAGNOLO J, CASTLE M, CASTEELS-JOSSON K, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P. Biodiversity of apidaecin-type peptide antibiotics. Prospects of manipulating the antibacterial spectrum, and combating acquired resistance. *J Biol Chem* 1994; **269**: 26107–26115.
- [9] CASTEELS-JOSSON K, ZHANG W, CAPACI T, CASTEELS P, TEMPST P. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structure. *J Biol Chem* 1994; **269**: 28569–28575.
- [10] CHADWICK J. Relation of lysozyme concentration to acquired immunity against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 1970; **15**: 455–456.
- [11] CHADWICK JS, ASTON WP. Antibacterial immunity in *Lepidoptera*. In: Immunology of Insects and other Arthropods. Ed. A.P. Gupta. CRC Press, Boca Raton, Ann Harbor, London. 1991. pp. 347.
- [12] COCIANCICH S, BULET P, HOFFMANN JA. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today* 1994; **10**: 132–139.
- [13] DIMARCQ JL, KEPPI E, DUNBAR B, LAMBERT J, REICHHART JM, HOFFMANN D, RANKINE SM, FOTHERGILL JE, HOFFMANN JA. Insect immunity: purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranovae* and complete amino acid sequence of the predominant member, dipteracin A. *Eur J Biochem* 1988; **171**: 17–22.
- [14] DUNN PE. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann Rev Ent* 1986; **31**: 321–339.
- [15] DURELL SR, RAGHUNATHAN G, GUY HR. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys J* 1992; **62**: 1623–1631.
- [16] FAYEI, WYATT G. The synthesis of antibacterial proteins in isolated fat body from *Cecropia pupae*. *Experientia* 1980; **36**: 1325.
- [17] FEHLBAUM P, BULET P, MICHAUT L, LAGUEUX M., BROEKAERT WF, HETRU C, HOFFMANN JA. Insect immunity: septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *J Biol Chem* 1994; **264**: 33156–33163.
- [18] FLYG C, DALHAMMAR G, RASMUSON B, BOMAN HG. Insect immunity. Inducible antibacterial activity in *Drosophila*. *Insect Biochem* 1987; **17**: 153–160.

- [19] FUJIWARA S, IMAI J, FUJIWARA M, YAESHIMA T, KAWASHIMA T, KOBAYASHI K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. 1990; **265**: 11333–11337.
- [20] GANZ T, SELSTED ME, LEHRER RI. Defensins. *Eur J Haematol* 1990; **44**: 1–8.
- [21] GLASSER RW. On the existence of immunity proteins in insects. *Psyche* 1918; **25**: 38–46.
- [22] GLIŃSKI Z, JAROSZ J. Zarys immunologii owadów. Wyd. AR. Lublin, 1992.
- [23] GLIŃSKI Z, JAROSZ J. Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta* 1993; **28**: 69–78.
- [24] GLIŃSKI Z, JAROSZ J. Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 1995; **76**: 195–205.
- [25] GLIŃSKI Z, JAROSZ J. Immunobiologia pszczoły miodnej. Wyd. AR Lublin, 1995.
- [26] GOTZ P. Encapsulation in Arthropods. In: Immunity in Invertebrates, M. Brehelin ed. Springer, Berlin, Heidelberg 1986; 153–170.
- [27] HARA S, YAMAKAWA M. A novel antibacterial peptide family isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem J* 1995; **310**: 651–656.
- [28] HARA S, YAMAKAWA M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biochem* 1995; **270**: 29923–29927.
- [29] HENNEGHEN J, JACOBS FJ. The humoral response of adult honeybees in relation to injection with *Bacillus larvae* and *Bacillus pumilus*. *Proc Exper Appl Entomol NEV* 1994; **5**: 73–76.
- [30] HOFFMANN JA, HETRU C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology Today* 1992; **13**: 411–415.
- [31] HULTMARK D. *Drosophila*, as a model system for antimicrobial peptides. *Ciba Foundation Symp* 1994; **186**: 107–119.
- [32] HULTMARK D, ANGSTRÖM A, ANDERSSON K, STEINER H, BENNICHT H, BOMAN HG. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J* 1983; **2**: 571–576.
- [33] ISHIKAWA M, KUBO T, NATORI S. Purification and characterization of a dipterin homolog from *Sarcophaga peregrina*. *Biochem J* 1992; **287**: 573–578.
- [34] JAROSZ J. Lizozym jako podstawowy czynnik odporności przeciwbakteryjnej u owadów. *Post Mikrobiol* 1977; **16**: 87–112.
- [35] JAROSZ J. Simultaneous induction of protective immunity and selective synthesis of haemolymph lysozyme in larvae of *Galleria mellonella*. *Biol Zentralbl* 1979; **98**: 459–471.
- [36] JAROSZ J. Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Comp Biochem Physiol* 1993; **106B**: 415–421.
- [37] JAROSZ J. Modulation of cell-free immune responses in insects. *Cytobios* 1994; **79**: 169–180.
- [38] JAROSZ J, GLIŃSKI Z. Leksykon immunologii owadów. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1996.
- [39] JOLLES J, SCHOENTGEN F, CROIZIER G, CROIZIER L, JOLLES P. Insect lysozymes from three species of *Lepidoptera*: their structural relatedness to the C (chicken) type lysozyme. *J Biol Evol* 1979; **14**: 309–315.
- [40] KYRIAKIDES TR, BEDOYAN JK, PATIL CS, SPENCE KD. In vivo distribution of immune protein scolexin in bacteria-injected *Manduca sexta* larvae. *Tissue and Cell* 1993; **25**: 423–434.
- [41] LEMAITRE B, MEISTER M, GOVIND S, GEORGEL P, STEWART R, RECHHART JM, HOFFMANN JA. Functional analyses and regulation of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J* 1995; **14**: 536–548.
- [42] LEPAGE P, BITSCH F, ROECKLIN D, KEPPI E, DIMARCQ JL, RECHHART JM, HOFFMANN JA, ROITSCH C, VAN DORSSELAER A. Determination of disulfide bridges in natural and recombinant insect defensin A. *Eur J Biochem* 1991; **174**: 735–742.

- [43] LEVASCHINA E, OHRESSER S, BULET P. Metchnikowin a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *Eur J Biochem* 1995; **233**: 694–700.
- [44] MARRIFIELD RB, MARRIFIELD EL, JUVVADI P, ANDREU D, BOMAN HG. Design and synthesis of antimicrobial peptides. *Ciba Foundation Symp* 1994; **186**: 5–26.
- [45] MATSUYAMA K, NATORI S. Purification of three antibacterial proteins from the cell culture medium of NIH Sdape 4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17112–17116.
- [46] MATSUYAMA K, NATORI S. Mode of action of sapecin a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*. *J Biochem* 1990; **108**: 128–132.
- [47] MATSUZUKI K, SUGISHITA K, FUJII N, MYAJIMA K. Molecular basis for membrane selectivity for an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* 1995; **34**: 3423–3429.
- [48] METALNIKOW S. Recherches experimentales sur les chenilles de *Galleria mellonella*. *Arch Zool Expl Gen* 1920; **8**: 489–588.
- [49] METCHNIKOW E. Lecons sur la pathologie comparee de l'inflammation. Paris. 1892.
- [50] MOHRIG W, MESSNER B. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als Grundlegender antibakterieller Faktor in humoralen abwehrmechanismus der Insekten. *Biol Zentralbl* 1968; **87**: 439–470.
- [51] MOHRIG W, MESSNER B. Immunreaktionen bei Insekten. II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten. *Biol Zentralbl* 1968; **87**: 705–718.
- [52] PLYTYCZ B. Ewolucja odporności. *Wszechświat* 1996; **97**: 135–140.
- [53] POINAR GO, JR LEUTENNEGER R. Ultrastructure of the formation of a melanotic capsule of *Diabrotica* (Coleoptera) in response to parasitic nematode (Mermithidae). *J Ultrastruct Res* 1968; **25**: 293–306.
- [54] POWING RTF, DAVIDSON WJ. Studies on insect bacteriolytic enzyme. I. Lysozyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* 1973; **45**: 669–686.
- [55] RATCLIFFE NA. Cellular defense reactions of insects. In: Immune Reaction to Parasites. Ed. W. Frank. Fisher Verlag, Stuttgart, 1982; 233–244.
- [56] RATCLIFFE NA, GOTZ P. Functional studies on insect haemocytes including non-self recognition. *Res Immunol* 1990; **141**: 919–923.
- [57] SALT G. The cellular defense reactions of insects. Cambridge Monogr Exp Biol **16**. Cambridge Univ. Press., Cambridge, 1970.
- [58] VAARA M, VAARA T. Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995; **38**: 2498–2501.
- [59] WILSON IBH, GAVEL Y, VON HEIJNE G. Amino acid distribution around O-linked glycosylation sites. *Biochem J* 1991; **275**: 529–534.
- [60] YAMADA K, NATORI S. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. *Biochem J* 1993; **291**: 275–279.

Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński

Otrzymano: 27.02.1997 r.

Przyjęto: 05.05.1997 r.

Adres autora: ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

# MOLEKULARNE PODŁOŻE ZESPOŁÓW PRADERA-WILLEGO I ANGELMANA A MECHANIZMY RODZICIELSKIEGO PIĘTNOWANIA GENOMU U CZŁOWIEKA

MOLECULAR BASIS OF PRADER-WILLI AND ANGELMAN  
SYNDROMES, AND MECHANISMS OF GENOMIC IMPRINTING  
IN MAN

Beata BIELIŃSKA

Zakład Genetyki Medycznej, Instytut-Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka,  
Warszawa-Międzylesie

*Streszczenie:* Zespoły Pradera-Willego i Angelmana spowodowane są utratą funkcji odrębnych, sprzężonych genów, które znajdują się w regionie 15q11-13 i poddane są piętnowaniu rodzicielskiemu. Charakter piętna rodzicielskiego determinowany jest przez obszar regulatorowy położony w regionie 15q11-13 i określony terminem centrum piętnowania.

*Słowa kluczowe:* zespoły Pradera-Willego i Angelmana, rodzicielskie piętnowanie genomu, centrum piętnowania.

*Summary:* Prader-Willi and Angelman syndromes are caused by the loss of function distinct but closely linked genes in 15q11-13, subject to genomic imprinting. The parental imprint of these genes is determined by the genetic element for control of imprinting throughout 15q11-13 defined as an imprinting centre.

*Key words:* Prader-Willi and Angelman syndromes, genomic imprinting, imprinting centre.

## I. WSTĘP

Zjawisko rodzicielskiego piętnowania genomu (ang. *genomic imprinting*) obserwowane u wyższych *Eucaryota* polega na naznaczeniu chromosomów zgodnie

z ich rodzicielskim pochodzeniem i prowadzi do zróżnicowanej ekspresji alleli ojcowskich i matczynych podczas rozwoju osobniczego.

Rodzicielskie piętnowanie genomu wykazano doświadczalnie u zwierząt. Zaobserwowano również, że odgrywa ono istotną rolę w ujawnianiu się niektórych chorób genetycznie uwarunkowanych u człowieka, takich jak: guz Wilmsa [1], embrionalny nowotwór mięśni (*rhabdosarcoma*) [2], pewna forma raka kości (*osteosarcoma*) [2] oraz zespołów Beckwitha-Wiedemana [3], Huntingtona [4, 5], Pradera-Willego [6] i Angelmana [6].

Rezultaty dotychczasowych badań wskazują, że piętnowanie genomowe jest zjawiskiem kompleksowym obejmującym zmiany zarówno struktury i aktywności transkrypcyjnej chromatyny, jak i przebiegu replikacji oraz metylacji sekwencji DNA [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Piętnowanie zachodzi już podczas gametogenezy. Nadane wówczas piętno rodzicielskie przekazywane jest od gamety do zygoty, gdzie utrzymuje się przez cały okres rozwoju zarodkowego, a w komórkach somatycznych nawet do końca życia. W komórkach linii płciowej piętno odziedziczone po rodzicach zostaje wymazane, a w jego miejsce wprowadzane jest nowe, którego specyfika zależy od płci.

Mechanizm piętnowania pozostaje dotychczas nieznany. W 1993 roku Barlow wysunęła hipotezę, zgodnie z którą piętnowane geny zawierają sekwencje matczyne i ojcowskie podlegające specyficznej metylacji podczas gametogenezy (ang. *imprinting box*) [32]. W 1995 roku Buiting i wsp., na podstawie rezultatów badań nad zespołami Pradera-Willego i Angelmana uznali, że piętno genomowe oddziałuje nie na pojedyncze geny, lecz na duże domeny chromosomalne za pośrednictwem sekwencji regulatorowych, które określili jako centrum piętnowania IC (ang. *imprinting centre*). Według modelu piętnowania, który zaproponowali, IC reguluje w układzie cis zarówno strukturę chromatyny, metylację DNA, jak i ekspresję genów wzdłuż rozległego regionu chromosomu 15 [15].

Poniżej przedstawione zostały rezultaty badań nad zespołami Pradera-Willego i Angelmana, które pozwoliły bliżej poznać podłoże molekularne tych chorób u człowieka i stały się podstawą modelu piętnowania chromosomu 15 z udziałem IC.

## II. ZMIANY MOLEKULARNE W REGIONIE 15q11-13 OBSERWOWANE U CHORYCH Z ZESPOŁAMI PRADERA-WILLEGO I ANGELMANA

Zespoły Pradera-Willego (PWS) i Angelmana (AS) to schorzenia neurogenetyczne o odmiennym obrazie klinicznym występujące z częstością około 1 na 25 000 żywych urodzeń.

Zarówno PWS, jak i AS wywołane są nieprawidłowym dziedziczeniem regionu 11-13 położonego na długim ramieniu chromosomu 15 (15q11-13). Jak wykazuje analiza częstości aberracji chromosomowych (w tym delecji, jednorodzielskich disomii, trisomii, translokacji i innych przegrupowań genowych), region 15q11-13 należy do najbardziej niestabilnych fragmentów ludzkiego genomu [16]. W zależności od obserwowanych w nim zmian molekularnych, wyróżniono cztery klasy pacjentów z PWS i AS [6].

Jedną z nich stanowią chorzy z PWS (70–75% ogółu przypadków) oraz z AS (65–70%), u których stwierdza się rozległą delecję powstałą *de novo* w regionie q11-13 na chromosomie 15 pochodzącą od jednego z rodziców. U chorych z AS delecję obserwuje się wyłącznie na chromosomie odziedziczonym od matki, natomiast u chorych z PWS na chromosomie przekazany przez ojca [6, 17, 18, 19].

Do drugiej grupy zaliczani są chorzy charakteryzujący się jednorodzielską disomią chromosomu 15: disomią matczyną, tzn. obecnością dwóch chromosomów pochodzących od matki i brakiem chromosomu ojcowskiego lub disomią ojcowską, tzn. obecnością dwóch chromosomów odziedziczonych od ojca i brakiem chromosomu matczynego. Disomię matczyną zaobserwowano wyłącznie w PWS (25% ogółu przypadków), natomiast disomię ojcowską w AS (2–3%) [6, 17, 18].

Trzecią, nieliczną grupę stanowią pacjenci z AS (3–4% ogółu przypadków) i PWS (1–2%), u których jedynie wykrywa się odmienny niż u osób zdrowych, a typowy dla każdego zespołu, wzór metylacyjny w regionie 15q11-13 [6, 15, 19].

Osobną grupę reprezentują chorzy z AS, którzy odznaczają się pozornie prawidłowym dziedziczeniem chromosomu 15 [6, 20, 21, 22, 23] i są prawdopodobnie nosicielami drobnych mutacji w genie AS.

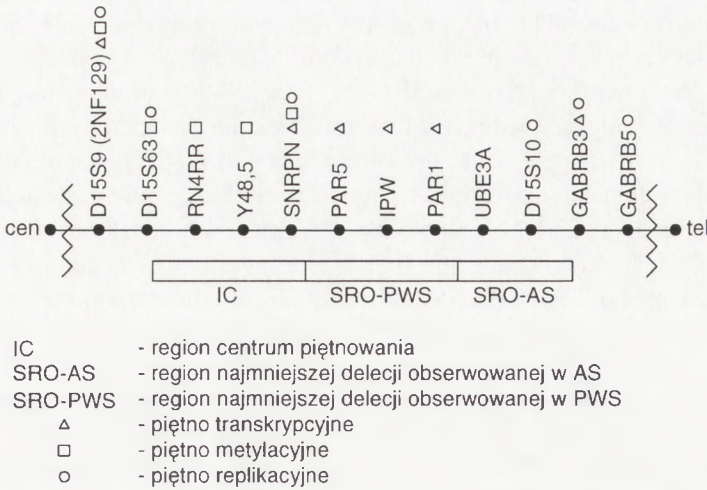
Fakt występowania ostatniej z wymienionych klasy chorych z AS oraz brak analogicznych przypadków wśród pacjentów z PWS sugeruje, że za cechy fenotypowe AS odpowiedzialny jest tylko jeden gen strukturalny, natomiast za PWS dwa lub więcej genów. Analiza dziedziczenia markerów polimorficznych w regionie 15q11-13 dowiodła, że geny zaangażowane w patogenezę AS i PWS zajmują odrębne, choć sprzężone loci. Ustalenie ich dokładnego położenia i funkcji było utrudnione przez duży zasięg delecji (~5 Mb) obserwowanych u większości pacjentów z AS i PWS. Wykryte ostatnio mikrodelecje pozwoliły ustalić odrębne, krytyczne subregiony (ang. SRO-AS i SRO-PWS), w których poszukiwano genów strukturalnych odpowiedzialnych za objawy kliniczne AS i PWS (rys. 1). Uznano, że geny obecne w poszczególnych subregionach podlegają piętnowaniu rodzicielskiemu [20, 21, 22, 23, 24]. Wskazywało na to jednorodzielskie pochodzenie chromosomu ulegającego delecji oraz występowanie jednorodzielskiej disomii u chorych z AS i PWS.

### III. EKSPRESJA GENÓW W REGIONIE 15q11-13 ZALEŻNA OD POCHODZENIA RODZICIELSKIEGO (PIĘTNO TRANSKRYPCYJNE)

W obszarze minimalnej delecji AS (SRO-AS) nie udało się dotychczas znaleźć genu, który ulegałby piętnowaniu ojcowskiemu, a jedyny gen ulegający ekspresji wyłącznie na chromosomie matczynym zidentyfikowano w locus GABRB3 położonym w regionie 15q11-13, poza SRO-AS (rys. 1) [19, 23]. Wykazano natomiast, że położony w SRO-AS gen UBE3A, według dotychczasowych badań, aktywnie transkrybowany zarówno na matczynej, jak i na ojcowskiej kopii chromosomu 15 jest zaangażowany w patogenezę AS (rys. 1) [47, 48]. Produkt białkowy tego genu, enzym E<sub>3</sub>, ligaza ubikwityna-białko odgrywa centralną rolę w selekcji substratów (w tym białka p53) poddanych proteolizie przebiegającej z udziałem ubikwityny [49,50,51,52]. Mutacje genu UBE3A, wykryte ostatnio w zespole Angelmana, stanowią pierwszy, poznany u ssaków, przykład genetycznych zaburzeń ubikwitynozależnej proteolizy wywołujących nieprawidłowości w funkcjonowaniu centralnego układu nerwowego. Wcześniej obserwowano, że mutacje w genie kodującym enzym E<sub>2</sub> (jeden z nośników ubikwityny) powodują zmianę przewodnictwa synaptycznego w układzie nerwowym u *Drosophila melanogaster* [53]. Obecnie przypuszcza się, że objawy neurologiczne charakterystyczne dla pacjentów z zespołem Angelmana są rezultatem mutacji genu UBE3A poddanego, w rozwijającym się mózgu, procesom piętnowania ojcowskiego. Występowanie tkankowo-specyficznego i zależnego od stadium rozwoju piętna rodzicielskiego opisano już dla genów, odpowiednio, IgFII i genów insuliny 1,2 oraz dla genów IgFII i genu proinsuliny u myszy [54,55,56,]. Wydaje się prawdopodobne, że transkrypty genu UBE3A powstają analogicznie jak piętnowane i niepiętnowane transkrypty genu IgFII, tj. dzięki istnieniu alternatywnych promotorów lub alternatywnych miejsc składania transkryptu dla pojedynczego locus genu [48,57].

Mechanizm powstawania piętna transkrypcyjnego genu UBE3A oraz innych genów w regionach minimalnej delecji, u pacjentów z zespołami AS i PWS, jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. W regionie minimalnej delecji u pacjentów z PWS (SRO-PWS) scharakteryzowano dotychczas cztery geny, które podlegają piętnowaniu matczynemu i ulegają ekspresji jedynie na chromosomie ojcowskim [25, 26, 27, 28, 44, 45] (rys. 1). Jeden z nich to gen SNRPN (ang. *small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*), którego produktem jest polipeptyd uczestniczący w dojrzewaniu mRNA w mózgu. Pozostałe geny to PAR1, PAR5 i IPW kodujące poliadenylowane, nie ulegające translacji mRNA o nieznanym dotąd funkcji. Przypuszcza się, że transkrypty genów PAR1, PAR5, IPW uczestniczą w regulacji w układzie cis całego obszaru PWS/AS. Regulacja za pośrednictwem wyżej wymienionych produktów może przebiegać w sposób analogiczny do modulowania ekspresji genu IgF2 bądź inaktywacji chromosomu X przez transkrypty





Rys. 1. Mapa genetyczna regionu q11-13 na chromosomie 15 z zaznaczonym położeniem wybranych loci: na skali nie uwzględniono odległości między loci, nawiasy zaznaczone linią falistą ograniczają region najczęściej ulegający delecji u chorych z AS i PSW

genów odpowiednio H19 i XIST [29, 30].

Wykrycie genów SNRPN, PAR1, PAR5, IPW podlegających piętnowaniu matczynemu wskazuje na istnienie w regionie 15q11-13 dużej domeny transkrypcyjnej, której aktywność zależy od piętna rodzicielskiego. W tej samej domenie może też znajdować się gen ZNF129 zidentyfikowany w locus D15S9 położonym w regionie 15q11-13, proksymalnie w stosunku do obszaru SRO-PWS (rys. 1). Stwierdzono bowiem, że wysoce konserwatywny gen ZNF129, kodujący białko zawierające tzw. palce cynkowe, podlega piętnowaniu matczynemu tak u myszy, jak i u człowieka [7].

#### IV. METYLACJA W LOCI REGIONU 15q11-13 ZALEŻNA OD POCHODZENIA RODZIELSKIEGO (PIĘTNO METYLACYJNE)

Dwunukleotydowe sekwencje CpG w genach ZNF129 i SNRPN, a także w czterech loci położonych pomiędzy nimi są metylowane w sposób zależny od rodzicielskiego pochodzenia (piętno stanowi tu zarówno obecność, jak i brak grupy metylowej) (rys. 1).

Piętno metylacyjne wykryto po raz pierwszy u ssaków w locus D15S9 dla genu ZNF 129. Obejmuje ono 11 miejsc metylowanych zależnie od rodzicielskiego pochodzenia, przy czym zarówno allel ojcowski, jak i matczyny charakteryzują się własnym, niepowtarzalnym wzorem metylacji [7].

W loci: SNRPN ekson-1 (przypuszczalny region promotorowy), D15S63 i RN4RR zaobserwowano, że sekwencje CpG są metylowane tylko na matczynym chromosomie. Natomiast w intronie 5 genu SRNPN i locus X48.5 metylowane są sekwencje tylko na chromosomie ojcowskim [26]. W komórkach rozrodczych odkryto odmienne wzory metylacyjne reprezentujące prawdopodobnie dziedziczne piętno metylacyjne. W gametach męskich stwierdzono metylację intronu 5 oraz brak metylacji w regionie promotorowym genu SNRPN, natomiast w komórkach żeńskich zaobserwowano brak metylacji zarówno w intronie 5, jak i promotorze tego genu [26].

Chorzy z zespołami AS i PWS charakteryzują się odmiennym niż osoby zdrowe wzorem metylacyjnym w regionie 15q11-13. Wszyscy lub prawie wszyscy z zespołem PWS oraz 75% z AS odznaczają się brakiem odpowiednio ojcowskiego lub matczynego wzoru metylacyjnego w loci D15S63 i SNRPN ekson-1 [9, 14, 19, 26]. Analiza wzorów metylacyjnych w regionie 15q11-13, przeprowadzona, tak u osób zdrowych, jak i chorych z PWS i AS, potwierdziła związek między piętnem metylacyjnym a piętnem transkrypcyjnym [25, 26, 28]. Wcześniej zależność taką wykazano dla znanych piętnowanych genów myszy (IgF2, IgF2r, H19) oraz człowieka (H19, IgF2) [29, 30, 31, 32].

Analiza wzorów metylacyjnych dowiodła ponadto, że dziedziczny sygnał metylacyjny (obserwowany w gametach) nie występuje w sekwencjach kodujących lub promotorowych genu, lecz w sekwencjach intronowych [26]. Specyficzną metylację sekwencji intronowych wykryto wcześniej u ssaków, w intronie genu HPRT ulegającego ekspresji na aktywnym chromosomie X [33]. Ustalono, że intronowe piętno metylacyjne genu HPRT występuje w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji wiążących domeny (pętle chromatynowe) z macierzą jądrową\*, tzw. MARs (ang. *matrix attachment region*) i wpływa na ich aktywność. MARs podobnie jak sekwencje wzmacniające (ang. *enhancers*) i sekwencje osłabiające (ang. *silencers*) należą do regulatorów transkrypcji działających w układzie cis [33]. Coraz większa liczba doniesień wskazuje, że sekwencje typu MARs mogą być kluczowym punktem regulacji, tak struktury domen chromosomowych, jak i przebiegających w ich obrębie transkrypcji, replikacji, metylacji oraz innych procesów wiążących się z aktywnością genomu (w tym również procesów tkankowo specyficznych) [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].

Struktura domen chromatynowych w regionie krytycznym dla AS i PWS nie jest dotychczas znana. Wyniki badań nad ekspresją i replikacją alleli ojcowskich i matczynych w tym regionie wskazują na duże prawdopodobieństwo istnienia domen, w których geny funkcjonują w sposób zależny od istniejącego piętna genomowego.

\*Macierz jądrowa – białkowa struktura jądra komórkowego określana czasami jako szkielet jądra komórkowego, uważana za wyłączne miejsce replikacji, transkrypcji, metylacji, dojrzewania mRNA oraz szeregu innych procesów związanych z aktywnością genomu.

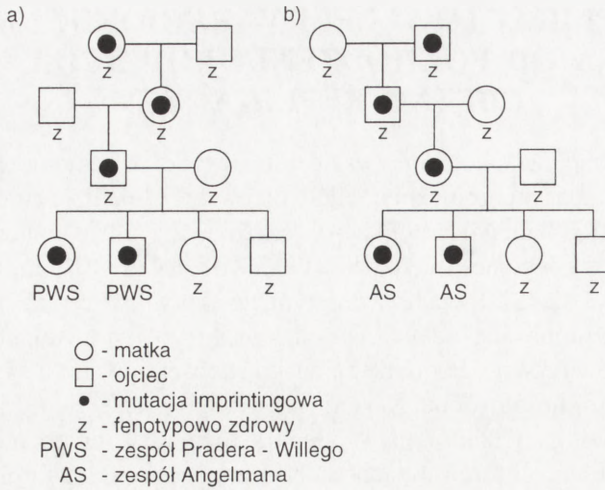
## V. REPLIKACJA ALLELI W REGIONIE 15q11-13 ZALEŻNA OD POCHODZENIA RODZICIELSKIEGO (PIĘTNO REPLIKACYJNE)

Zaobserwowano, że allele ojcowskie i matczyne w regionie krytycznym dla AS/PWS replikują asynchronicznie. Allele ojcowskie zlokalizowane pomiędzy loci D15S63 i GABRB3 ulegają replikacji wcześniej niż allele matczyne, natomiast allele matczyne występujące między loci GABRB3, a GABRB5 replikują wcześniej niż ojcowskie [13,42,43]. Świadczy to o tym, że aktywność replikacyjna w regionie 15q11-13 uzależniona jest od piętna rodzicielskiego i prawdopodobnie koreluje z ekspresją genów (rys. 1). Podobne zjawisko zaobserwowano u ssaków, u których na nieaktywnym chromosomie X geny replikują w fazie S później niż na jego aktywnym homologu i u których występują różnice w przebiegu replikacji dla genów H19 i IgF2 na chromosomach pochodzenia ojcowskiego i matczynego [42].

U pacjentów z AS i PWS, u których choroba jest wynikiem odpowiedniej, jedno-rodzicielskiej disomii chromosomu 15, wykryto odmienny niż u osób zdrowych wzór replikacyjny – zarówno dla ojcowskich, jak i matczynych alleli regionu q11-13 [13, 14, 42]. Wskazuje to na występowanie podczas ontogenezy wzajemnych oddziaływań między imprintami chromosomów homologicznych, które umożliwiają wprowadzenie prawidłowego wzoru replikacyjnego. Oddziaływania te mogłyby zachodzić przy udziale sekwencji działających w układzie trans, tak jak proponuje to model *allelic cross-talk* wyjaśniający ekspresję dominującej mutacji w locus *Ubx* u *Drosophila* [43]. Dotychczas nie wykryto sekwencji uczestniczących w postulowanej wzajemnej regulacji piętnowania w układzie trans pomiędzy dwoma homologicznymi chromosomami 15.

## VI. MUTACJE IMPRINTINGOWE U CHORYCH Z AS I PWS. OBECNY MODEL GENETYCZNY DLA ZESPOŁÓW PRADERA- WILLEGO I ANGELMANA ZAKŁADAJĄCY UDZIAŁ CENTRUM PIĘTNOWANIA W PIĘTNOWANIU REGIONU 15q11-13

Ostatnio udało się ustalić położenie sekwencji, które działają w układzie cis, wzdłuż regionu 15q11-13 i decydują o charakterze piętna rodzicielskiego położonych w tym regionie genów [15]. Odkrycia tych sekwencji dokonano przeprowadzając badania pacjentów z AS i z PWS, u których obserwowano odziedziczone od obojga rodziców, pozornie normalne chromosomy 15, charakteryzujące się jedynie nieprawidłowym wzorem metylacyjnym w regionie 15q11-13. U niektórych z tych chorych wykryto mikrodelecje w regionie położonym proksymalnie w stosunku do subregionów krytycznych dla AS i PWS [15, 19, 44]. Ustalono, że dzieci z PWS dziedziczyły mikrodelecje od fenotypowo normalnych ojców, którzy dzie-

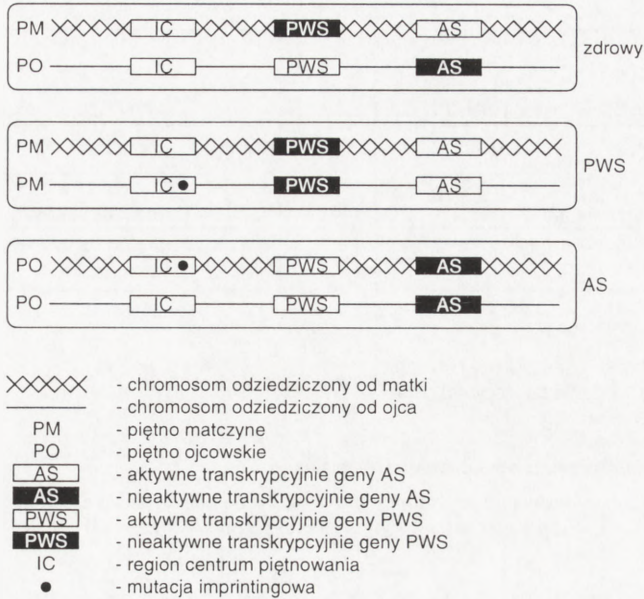


Rys. 2. Schemat dziedziczenia mutacji imprintingowej prowadzącej do wystąpienia rodzinnego PWS (A) lub AS (B) [19]: a) – mutacja imprintingowa, która pojawiła się *de novo* w linii żeńskiej powoduje utrwalenie na chromosomie 15 piętna matczynego; mutacja przekazywana jest bezobjawowo przez kobiety; jeżeli jej nosicielem jest mężczyzna, przekazuje połowie swego potomstwa chromosom 15 z ustalonym piętnem matczynym; u dzieci dziedziczących zmutowany chromosom rozwijają się objawy PWS; b) – mutacja, która wystąpiła *de novo* w linii męskiej powoduje utrwalenie na chromosomie 15 piętna ojcowskiego; jeżeli transmisji mutacji towarzyszy zmiana płci u kolejnych nosicieli, u dzieci rozwija się AS

dziczyli je od klinicznie zdrowych matek. Natomiast w rodzinach z zespołem AS, bezobjawowymi nosicielami mikrodelecji byli: matka chorego oraz uprzednio jej ojciec (rys. 2).

Korelacja dziedziczenia mikrodelecji z występowaniem objawów chorobowych w wielopokoleniowych rodzinach z AS i PWS wykazała, że mikrodelecja jest mutacją imprintingową (ang. *imprinting mutation*), która nie wywiera prostego wpływu pozycyjnego na sąsiednie geny, lecz utrwała istniejące w tych genach piętno rodzicielskie. Konsekwencją tej mutacji jest niezdolność do wymazania piętna genomowego w komórkach linii płciowej podczas gametogenezy. Tego rodzaju mutacje przekazywane są z pokolenia na pokolenie bezobjawowo przez nosicieli tej samej płci (rys. 2). Natomiast jeżeli transmisji mutacji u kolejnych nosicieli towarzyszy zmiana płci, to u ich dzieci występują objawy zespołu Pradera-Willego lub Angelmana (zależnie od tego, jakie piętno zostało utrwalone na zmutowanym chromosomie) (rys. 2).

Identyfikacja mutacji imprintingowej u chorych z AS i PWS stała się podstawą obecnego modelu genetycznego zespołów Pradera-Willego i Angelmana. Model ten zakłada, że oba zespoły są spowodowane utratą funkcji odrębnych, choć sprzężonych genów położonych w regionie 15q11-13 i poddanych piętnowaniu rodzicielskiemu. Charakter piętna rodzicielskiego zarówno genów AS, jak i PWS



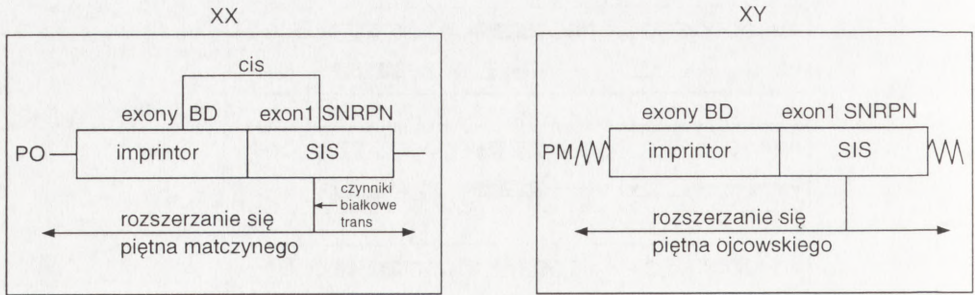
Rys. 3. Hipoteza centrum piętnowania regionu q11-13 chromosomu 15 [15]: Ekspresja genów PWS i AS w regionie q11-13 chromosomu 15 jest regulowana przez centrum piętnowania. Geny AS są aktywnie transkrybowane wyłącznie na matczynej kopii chromosomu 15, natomiast geny PWS na kopii pochodzącej od ojca. W niektórych rodzinnych przypadkach PWS i AS delecja bądź mutacja w centrum piętnowania powoduje utrwalenie istniejącego piętna rodzicielskiego na chromosomie 15 i niezdolność do jego wymazania podczas gametogenezy. W konsekwencji mutacji imprintingowej pacjent z PWS ma dwa chromosomy z piętnem matczynym, na których nie ulegają ekspresji geny PWS, natomiast u chorego z AS występują dwa chromosomy z piętnem ojcowskim i nieaktywnymi genami AS.

zdeteterminowany jest przez jeden ośrodek regulatorowy, tzw. centrum piętnowania (ang. *imprinting centre*), które znajduje się w proksymalnej części regionu 15q11-13, (rys. 1,3) [15]. Uważa się, że centrum piętnowania reguluje w układzie cis strukturę chromatyny oraz replikację i ekspresję genów rozległego (~2 Mb) regionu chromosomu. Mechanizm regulacji aktywności piętnowanej domeny, z udziałem IC, nie został dotychczas całkowicie wyjaśniony.

## VII. STRUKTURA I FUNKCJONOWANIE CENTRUM PIĘTNOWANIA W REGIONIE 15q11-13

Rezultaty ostatnich badań wykazują, że centrum piętnowania obejmuje region ok. 100 kb, w tym tzw. eksony BD i ekson 1 genu SNRPN, oraz koduje alternatywny transkrypt genu SNRPN, pozbawiony miejsc startu translacji (rys. 4) [45]. Ekspresję obszaru IC zaobserwowano w niewielu tkankach, głównie w jajnikach, jądrach, mózgu i sercu, wyłącznie na ojcowskiej kopii chromosomu 15 [45].

Wykazano, że mikrodelecje i mutacje punktowe w eksonach BD bądź w miejscach



⌘ - chromosom 15 odziedziczony od matki  
 — - chromosom 15 odziedziczony od ojca

PO - piętno ojcowskie

PM - piętno matczyne

SIS - miejsce inicjacji przełączania piętna rodzicielskiego

Rys. 4. Struktura i funkcjonowanie centrum piętnowania (IC) podczas żeńskiej (XX) i męskiej (XY) gametogenezy [48], opis zamieszczono w rozdz. VII

donorowych dla składania transkryptu uniemożliwiają zmianę piętna ojcowskiego na matczyne [45]. Mutacje takie znaleziono bowiem u pięciu spośród sześciu znanych rodzin z AS, u których obserwowano zaburzenia procesu piętnowania chromosomu 15. U jednej z sześciu omawianych rodzin wykryto delecję o wielkości 6 kb, która występowała w bezpośrednim sąsiedztwie eksonów BD, a więc mogła mieć wpływ na procesy transkrypcji lub składania transkryptu. Stwierdzono natomiast, że mikrodelecje w eksonie 1 genu SNRPN uniemożliwiają zmianę piętna matczynego na ojcowskie. Mikrodelecje w eksonie 1 genu SNRPN znaleziono u wszystkich znanych rodzin z PWS, u których obserwowano zaburzenia procesu piętnowania [45].

Powyższe obserwacje stały się podstawą modelu funkcjonowania centrum piętnowania na chromosomie 15 (rys. 4) [45]. Model ten zakłada, że centrum piętnowania jest dwuczęściową strukturą, którą tworzą sekwencje piętnujące, tzw. imprintor (ang. *imprintor*) i miejsce inicjacji przełączania piętna rodzicielskiego (ang. *switch initiation site*; SIS)

Imprintor ulega aktywnej ekspresji wyłącznie na ojcowskiej kopii chromosomu 15 i koduje transkrypt BD. Za pośrednictwem transkryptu BD, imprintor oddziałuje, w układzie cis, na miejsce inicjacji przełączania piętna (SNRPN ekson 1, SNRPN promotor lub miejsce położone w pobliżu) prawdopodobnie indukując lokalne zmiany w strukturze chromatyny.

Na podstawie rezultatów badań metylacji i replikacji DNA w regionie 15q11-13 autorzy modelu sugerują, że ojcowska kopia piętnowanej domeny, z której transkrybowane są geny PWS ma strukturę euchromatyny, natomiast matczyna kopia, na której ekspresji ulega gen AS, występuje w postaci heterochromatyny. Miejsce

inicjacji przełączania piętna rodzicielskiego (SIS) reprezentuje przypuszczalne, jądrowe centrum determinujące stopień kondensacji chromatyny.

Miejsca indukujące stan heterochromatynowy, jakkolwiek niezidentyfikowane dotychczas u ssaków, zostały dość dobrze poznane u *Drosophila melanogaster*. Podczas rozwoju osobniczego tego gatunku, wraz z pojawieniem się określonych wzorów ekspresji genów, obserwuje się zmiany stopnia upakowania chromatyny. Jako przykład może posłużyć oddziaływanie sekwencji DNA z białkowymi czynnikami z grupy Polycomb (PcG) działającymi w układzie trans i indukującymi powstanie struktur podobnych do heterochromatynowych [46].

Model piętnowania rodzicielskiego proponowany dla chromosomu 15 zakłada, że przełączanie piętna ojcowskiego na matczyne, podczas żeńskiej gametogenezy, indukowane jest przez transkrypt BD w miejscu inicjacji przełączania (SIS) i przebiega z udziałem matczynek czynników działających w układzie trans. Przełączanie piętna matczynego na ojcowskie podczas męskiej gametogenezy zachodzi przy nieobecności transkryptu BD i żeńskich czynników białkowych. Rozszerzanie się piętna matczynego w domenie 15q11-13 podczas żeńskiej gametogenezy powoduje inaktywację imprintora, natomiast rozchodzenie się piętna ojcowskiego, podczas gametogenezy męskiej, jego ponowną aktywację.

Przedstawiony model sugeruje zatem, że przełączanie piętna jest procesem samo-regulacyjnym i specyficznym płciowo. Nasuwa również pewne wyjaśnienie ewolucji piętnowania regionu 15q11-13. Ojcowski epigenotyp wydaje się być podobny do epigenotypu innych, niepiętnowanych regionów chromosomalnych, a matczynek epigenotyp mógł rozwinąć się z epigenotypu ojcowskiego, po pojawieniu się transkryptu BD oraz matczynek czynników białkowych działających w układzie trans.

Należy podkreślić, że powyższy model proponuje jedynie mechanizm przełączania piętna rodzicielskiego podczas gametogenezy. Nie wyjaśnia natomiast, w jaki sposób ekspresja poszczególnych genów jest regulowana przez matczynek lub ojcowski epigenotyp. Oczekuje się, że dalsze badania nad strukturą i funkcjonowaniem centrum piętnowania pozwolą poznać mechanizm powstawania piętna rodzicielskiego w IC i sposób komunikowania go poszczególnym genom w regionie 15q11-13.

## PODZIĘKOWANIE

Praca powstała dzięki pomocy doc. dr hab. Małgorzaty Krajewskiej-Walasek oraz dr Ewy Popowskiej, którym za cenne uwagi autor pragnie wyrazić serdeczne podziękowania.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ZHANG Y, SHIELDS T, CRENSHAW T, HAO Y, MOULTON T, TYCKO B. Imprinting of human H19: allele – specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms tumor, and potential for somatic allele switching. *Am J Hum Genet* 1993; **53**: 113–124.

- [2] FEINBERG AP. Genomic imprinting and gene activation in cancer. *Nature Genet* 1993; **4**: 110–113.
- [3] MANNENS M, HOOVERS JMN, REDEKER E, VERJAAL M, FEINBERG AP. Parental imprinting of human chromosome region 11.15.3-pter involved in the Beckwith-Wiedeman syndrome and various human neoplasms. *Eur J Hum Genet* 1994; **2**: 3–23.
- [4] SOLTER D. Relevance of genomic imprinting to human diseases. *Curr Opin Biotechnol* 1992; **22**: 5–10.
- [5] CHATKUP T S, ANTONOWICZ M, JOHNSON WG. Parents do matter: genomic imprinting and parental sex effects in neurological disorders. *J Neurol Sci* 1995; **130**: 1–10.
- [6] NICHOLLS RD. New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 1994; **54**: 733–740.
- [7] MOVERY-RUSHTON PA, DRISCOLL DJ, NICHOLLS RD, LOCKER J, SURTI U. DNA methylation patterns in human tissues of uniparental origin using a zinc-finger gene (ZNF 127) from the Angelman/Prader-Willi region. *Am J Med Genet* 1996; **61**: 140–146.
- [8] DITTRICH B, BUITING K, GROSS S, HORSTHEMKE B. Characterisation of a methylation imprint in the Prader-Willi syndrome chromosome region. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1995–1999.
- [9] DRISCOLL DJ, WATERS MF, WILLIAMS ChA, ZORIRT, GLENN ChC, AVIDANO KM, NICHOLLS RD. A DNA methylation imprint, determined by the sex of the parent distinguishes the Angelman and Prader-Willi syndromes. *Genomics* 1992; **13**: 917–924.
- [10] GILLESSEN-KAESBACH G, GROSS S, KAYA-WESTERLOH S, PASSARGE E, HORSTHEMKE B. DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1995; **32**: 88–92.
- [11] REED ML, LEFF SE. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. *Nature Genet* 1994; **6**: 163–167.
- [12] SUTCLIFFE JS, NAKAO M, CHRISTIAN S, ÖRSTAVIK KH, TOMMERUP N, LEDBETTER DH, BEAUDET AL. Deletion of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nature Genet* 1994; **8**: 52–58.
- [13] KNOLL JHM, CHENG S, LALANDE M. Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nature Genet* 1994; **6**: 41–46.
- [14] GLENN ChC, NICHOLLS RD, ROBINSON W, SAITOH S, NUKANA N, SCHINZEL A, HORSTHEMKE B, DRISCOLL DJ. DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1377–1382.
- [15] BUITING K, SAITOH S, GROSS S, DITTRICH B, SCHWARTZ S, NICHOLLS RD, HORSTHEMKE B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genet* 1995; **9**: 395–400.
- [16] ROBINSON WP, SPIEGEL R, SCHINZEL A. Deletion breakpoints associated with the Prader-Willi and Angelman syndromes (15q11-q13) are not sites of high homologous recombination. *Hum Genet* 1993; **91**: 181–184.
- [17] KNOLL JHM, WAGSTAFF J, LALANDE M. Cytogenetic and molecular studies in the Prader-Willi and Angelman syndromes: an overview. *Am J Med Genet* 1993; **46**: 2–6.
- [18] GILLESSEN-KAESBACH G, ROBINSON W, LOHMANN D, KAYA-WESTERLOH S, PASSARGE E, HORSTHEMKE B. Genotype-phenotype correlation in a series of 167 deletion and non-deletion patients with Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 1995; **96**: 638–643.
- [19] REIS A, DITTRICH B, GREGER V, BUITING K, LALANDE M, GILLESSEN-KAESBACH G, ANVRET M, HORSTHEMKE B. Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Genet* 1994; **54**: 741–747.
- [20] WAGSTAFF J, SHUGART YY, LALANDE M. Linkage analysis in familial Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1994; **8**: 52–58.
- [21] MEIJERS-HEIBOER EJ, SANDKUYL LA, BRUNNER HG, SMEETS HJM, HOOGEBO-



- OM AJM, DEELEN WH, VAN HEMEL JO, NELEN MR, SMEETS DFCM, NIERMEIJER MF, HALLEY DJJ. Linkage analysis with chromosome 15q11-13 markers shows genomic imprinting in familial Angelman syndrome. *J Med Genet* 1993; **30**: 853-857.
- [22] CLAYTON-SMITH J, WEBB T, ROBB SA, DIJKSTRA I, WILLEMS P, LAM S, CHENG XJ, PEMBREY ME, MALKOLM S. Further evidence for dominant inheritance at the chromosome 15q11-13 locus in familial Angelman syndrome. *Am J Med Genet* 1992; **44**: 256-260.
- [23] NELEN MR, VAN DER BURGT CJAM, NILLESEN WN, VIS A, SMEETS HJM. Familial Angelman syndrome with a cross-over in the critical deletion region. *Am J Med Genet* 1994; **52**: 352-357.
- [24] ÖZELIK T. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N(SNRPN) on expressed gene in Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genet* 1992; **2**: 265-269.
- [25] LALANDE M. In and around SNRPN. *Nature Genet* 1994; **8**: 5-7.
- [26] GLENN ChC, SAITOH S, JONG MTC, FILBRANDT MM, SURTI V, DRISCOLL DJ, NICHOLLS RD. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. *Am J Hum Genet* 1996; **58**: 335-346.
- [27] WEVRICK R, KERNS JA, FRANCKE U. Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 1887-1882.
- [28] NAKAO M, SUTCLIFFE JS, DURTSCHI B, MUTIRANGURA A, LEDBETTER DH, BEAUDET AL. Imprinting analysis of three genes in the Prader-Willi/Angelman region SNRPN, E6-associated protein, and PAR-2 (D15S225E). *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 309-315.
- [29] LEIGHTON PA, INGRAM RS, EGGENSCHWITER J, EFSTRATIADIS A, TILGHMANN SM. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 1995; **375**: 34-39.
- [30] BROWN C, HENDRICH B, RUPERT J, LAFRENIERE R, XING Y, LAWRENCE J, WILLARD H. The human XIST: analysis of 17kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* 1992; **71**: 527-542.
- [31] TREMBLAY KD, SAAM JR, INGRAM RS, TILGHMAN SM, BARTOLOMEI MS. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. *Nature Genet* 1995; **9**: 407-413.
- [32] STRÖGER R, KUBICKA P, LIU CG, KAFRI T, RAZIN A, CEDAR H, BARLOW DP. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse IgF2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993; **73**: 61-71.
- [33] CHONG S, TAYLOR KA, PIPER AA. Intragenic matrix attachment and DNA-protein interactions in the human X-linked HPRT gene. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1264**: 103-114.
- [34] ZONG RT, SCHEUERMANN RH. Mutually exclusive interaction of a novel matrix attachment region binding protein and the NF-uNR enhancer repressor. Implications for regulation of immunoglobulin heavy chain expression. *J Biol Chem* 1995; **270**: 24010-24018.
- [35] BETZ AG, MILSTEIN C, GONZALES-FERNANDEZ A, PANNELL R, LARSON T, NEUBERGER MS. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin K gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell* 1994; **77**: 239-248.
- [36] BOULIKAS T. Transcription factor binding sites in the matrix attachment region (MAR) of the chicken alpha-globin gene. *J Cell Biochem* 1994; **55**: 513-529.
- [37] GROMOVA JJ, NIELSEN OF, RAZIN SV. Long-range fragmentation of the Eucaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18685-18690.
- [38] FORRESTER WC, VAN GENDEREN C, JENUWEIN T, GROSSCHEDL R. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* 1994; **265**: 1221-1225.
- [39] STOKES DG, PERRY RP. DNA-binding and chromatin localization properties of CHDI. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2745-2753.
- [40] CHARRON G, JULIEN JP, BIBOR-HARDY V. Neuron specificity of the neurofilament light

- promoter in transgenic mice requires the presence of DNA unwinding elements. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25739–25745.
- [41] HENDZEL MJ, SUN JM, CHEN HY, RATTNER JB, DAVIE JR. Histone acetyltransferase is associated with the nuclear matrix. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22894–22901.
- [42] KITSBERG G et al. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* 1993; **364**: 459–463.
- [43] LASALLE JM, LALANDE M. Domain organization of allele specific replication within the GABRB3 gene cluster requires a biparental 15q11-13 contribution. *Nature Genet* 1995; **9**: 386–394.
- [44] GLENN ChC, PORTER KA, JONG MTC, NICHOLLS RD, DRISCOLL DJ. Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 2001–2005.
- [45] DITTRICH B, BUITING K, KORN B, RICKARD S, BUXTON J, SAITOH S, NICHOLLS RD, POUSTKA A, WINTERPACHT A, ZABEL B, HORSTHEMKE B. Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nature Genet* 1996; **14**: 163–170.
- [46] ORLANDO V, PARO R. Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. *Curr Opin Genet Dev* 1995; **5**: 174–179.
- [47] KISHINO T, LALANDE M, WAGSTAFF J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* 1997; **15**: 70–73.
- [48] MATSUURA T, SUTCLIFFE JS, FANG P, GALJAARD RJ, JIANG Y, BENTON CS, ROMMENS JM, BEAUDET AL. *De novo* truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nature Genet* 1997; **15**: 74–77.
- [49] JENTSCH S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu. Rev. Genet* 1992; **26**: 179–207.
- [50] CIECHANOVER A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994; **79**: 13–21.
- [51] JENTSCH S, SCHLENKER S. Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 1995; **82**: 881–884.
- [52] HOCHSTRASSER M. Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 1996; **84**: 813–815.
- [53] OHCE, MCMAHON R, BENZER R, TANOUYE M. A bendless, a Drosophila gene affecting neuronal connectivity, encodes a ubiquitin-conjugating enzyme homolog. *J Neurosci* 1994; **14**: 3166–3179.
- [54] GIDDINGS SJ, KING CD, HARMAN KW, FLOOD JF, CARNAGHI LR. Allele specific inactivation of insulin I and 2, in the mouse yolk sac, indicates imprinting. *Nature Genet* 1994; **6**: 310–313.
- [55] EKSTROM TJ, CUI H, LI X, OHLSSON R. Promoter-specific IGF2 imprinting status and its plasticity during human liver development. *Development* 1995; **121**: 309–316.
- [56] DELTOUR L, MONTAGUTELLI X, GUENET JL, JAMI J, PALDI A. Tissue and developmental stage-specific imprinting of the mouse proinsulin gene. *Ins 2 Dev Biol* 1995; **168**: 686–688.
- [57] VU TH, HOFFMAN AR. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor II gene. *Nature* 1994; **371**: 714–717.

Redaktor prowadzący: Maciej Zabel

Otrzymano: 04.03. 1997 r.

Przyjęto: 02.06. 1997 r.

Adres autora: 04-736 Warszawa Międzylesie,

Al. Dzieci Polskich 20

## CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW- $\alpha$ W KOMÓRKACH ŻEŃSKIEGO UKŁADU ROZRODCZEGO\*

### TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$ IN THE FEMALE REPRODUCTIVE TRACT CELLS

Sławomir TERLIKOWSKI \*, Stanisław SULKOWSKI \*\*

\* Klinika Ginekologii i Położnictwa Septycznego Instytutu Położnictwa i Chorób  
Kobiety; \*\* Zakład Anatomii Patologicznej  
Akademii Medycznej w Białymstoku

*Streszczenie:* Biologiczne właściwości czynnika martwicy nowotworów (*Tumor Necrosis Factor, TNF- $\alpha$* ) pierwotnie wiązano z wywoływaniem martwicy krwotocznej guzów nowotworowych. Obecnie wiadomo, że cytokina ta czynnie uczestniczy w wielu mechanizmach regulujących stan prawidłowej homeostazy organizmu. W układzie rozrodczym potwierdzono istotną rolę TNF- $\alpha$  w rozwoju gamety i pęcherzyka, sterydogenezie, cyklicznych przemianach endometrium, różnicowaniu się komórek łożyska, rozwoju zarodka oraz porodzie. W przedstawionym przeglądzie piśmiennictwa omówiono wielokierunkowe zaangażowanie TNF- $\alpha$  w procesy związane z biologią reprodukcji oraz jego interakcje w sieci cytokin.

*Słowa kluczowe:* TNF- $\alpha$ , żeński układ płciowy, biologia reprodukcji

*Summary:* Biological properties of Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ) was primarily associated with the induction of hemorrhagic necrosis of neoplastic tumors. At present, this cytokine is known to actively participate in a number of mechanisms which regulate the state of normal homeostasis of the organism. In the reproductive system, a significant role of TNF- $\alpha$  has been revealed in the development of gamete and follicle, in steroidogenesis, endometrium cyclicity, placental differentiation, embryo growth, and parturition. The literature survey presented discusses pleiotropic contribution of TNF- $\alpha$  to the processes connected with the biology of reproduction and its interactions in the cytokine network.

*Key words:* TNF- $\alpha$ , female reproductive system, biology of reproduction

---

\*Praca wykonana w ramach projektu badań statutowych AM Białystok Nr 303817

## I. WSTĘP

Badania ostatnich lat dostarczają wielu istotnych informacji dotyczących syntezy oraz funkcji, jakie pełnią cytokiny w żeńskim układzie płciowym [45, 58]. TNF- $\alpha$  po raz pierwszy opisano jako produkt syntezy zaktywowanych makrofagów, który doprowadzał do martwicy krwotocznej w doświadczalnych guzach nowotworowych [15]. Obecnie wiadomo, iż jest to wielokierunkowo działająca cytokina, której efekt działania na komórki uzależniony jest zarówno od jej stężenia, jak też od pochodzenia komórek efektorowych [33]. TNF- $\alpha$  nie tylko reguluje procesy wzrostu komórek, ale także odgrywa istotną rolę przez wpływ na ich funkcje [73]. Białko to oraz jego mRNA stwierdzone jest w układzie rozrodczym przy braku objawów zakażenia i nowotworzenia, co potwierdza, iż pełni ono rolę mediatora prawidłowej homeostazy komórek i tkanek [18, 44].

Modele doświadczalne opracowane do badań funkcji, jakie pełni TNF- $\alpha$  w układzie rozrodczym, obejmują: dojrzewanie oocytów i pęcherzyków, zmiany wsteczne zachodzące w ciałku żółtym (CL), cykliczne przemiany endometrium, dojrzewanie morfologiczne i czynnościowe łożyska oraz mechanizm porodu. Przedmiotem badań są też interakcje między TNF- $\alpha$  a gonadotropinami i jajnikowymi hormonami płciowymi.

Przedstawiany przegląd piśmiennictwa omawia wyniki badań nad ekspresją genową TNF- $\alpha$  oraz jego regulacyjną rolą w fizjologii i patologii procesów reprodukcji u ludzi i zwierząt.

## II. BIAŁKA GRUPY GENOWEJ TNF, JEJ PRZEDSTAWICIELE I RECEPTORY

Pierwszym opisanym białkiem tej grupy był TNF- $\alpha$ . W ostatnich latach wykryto jeszcze 8 białek o zbliżonej sekwencji aminokwasowej N-końcowej domeny [6, 9]. Gen TNF- $\alpha$  zlokalizowany jest w regionie klasy II głównego układu zgodności tkankowej (*major histocompatibility complex*, MHC) i koduje formę o masie cząsteczkowej (m. cz.) 26 kilodaltonów (kDa), związaną z błoną komórkową. Z niej, po oddzieleniu tzw. peptydu sygnałowego (pro-TNF- $\alpha$ ) uwalniana jest wolna cząsteczka o m. cz. 17 kDa [73]. Bardzo aktywny biologicznie, wolny TNF- $\alpha$  występuje w środowisku w postaci homotrimeru. Cząsteczka ta łączy się z obecnymi w surowicy krwi wolnymi receptorami rozpuszczalnymi (TNF-Rs) [27] lub z dwoma receptorami komórkowymi, które w zależności od ich m.cz. nazwano: p55/p60 (TNF-R1) i p75/p80 (TNF-R2) [67]. Receptory TNF-Rs w zjawisku konkurencji z TNF-R1 i R2 wiążą wolny TNF- $\alpha$ . Ustala to prawdopodobnie fizjologiczne stężenie cytokiny w organizmie, chroniąc go przed niepożądanym działaniem jej nadmiaru [27]. Zewną-

trzkomórkowe domeny TNF-R wykazują pewną homologię sekwencji aminokwasowej, natomiast ich domeny wewnątrzkomórkowe różnią się całkowicie [6, 9]. Z faktu tego wynika, iż przekazywanie różnych sygnałów do komórek jest rezultatem przyłączenia TNF- $\alpha$  do jego różnych TNF-R. Stwierdzono, że TNF-R1 związany jest z cytotoksycznością [66]. Transgeniczne myszy pozbawione tego receptora nie są wrażliwe na wywołujący objawy wstrząsu septycznego LPS mimo indukcji wysokiego stężenia TNF- $\alpha$  [50]. TNF-R2 wydaje się być związany z proliferacją limfocytów, jednak może także przenosić sygnał cytotoksyczny [66].

W badaniach oceniających rozkład ekspresji genowej TNF- $\alpha$  stosowane są metody wysoce specyficzne, ale nie pozbawione możliwości błędu. Wiele przeciwciał (Ab) używanych do identyfikacji tego białka ma charakter poliklonalny. Mogą one łączyć się z pozostałymi przedstawicielami rodziny (LT $\alpha$ ,  $\beta$ , Fas, CD40, CD27, CD30, 4-1BB, OX40) [14, 26, 64], co może mieć wpływ na wyniki prowadzonych badań. W związku z tym zachodzi konieczność weryfikacji uzyskiwanych danych przy pomocy innych technik, które łącznie potwierdzają obecność TNF- $\alpha$  i określają rolę, jaką pełni on w żeńskim układzie rozrodczym.

### III. TNF- $\alpha$ W JAJNIKU

1. W jajniku myszy transkrypcja genu TNF- $\alpha$  została zlokalizowana przy pomocy technik hybrydyzacji *in situ* oraz metod immunocytochemicznych [18]. Immunoreaktywność mRNA TNF- $\alpha$  obserwowano w oocytach pęcherzyków z dwoma lub więcej warstwami komórek ziarnistych (GCs). Brak jej w oocytach zawiązkowych, pęcherzykach z pojedynczą warstwą GCs i we wczesnych stadiach pęcherzyków atrezyjnych. Obecność mRNA i aktywnego TNF- $\alpha$  w podścielisku stwierdzano tylko w komórkach makrofagopodobnych. Natomiast w CL obecność TNF- $\alpha$  wykazano zarówno w komórkach lutealnych, jak i makrofagopodobnych.

Przeprowadzone analizy wykazały obecność w jajniku myszy mRNA oraz odpowiadające mu proporcje TNF- $\alpha$ , które nie zmieniały się podobnie jak immunoreaktywność TNF- $\alpha$  przez całą fazę estrus. Wyniki te wskazują, iż transkrypcja genu TNF- $\alpha$  w oocycie zbiega się z syntezą immunoreaktywnego TNF- $\alpha$  oraz że procesy te zachodzą w różnych okresach rozwoju pęcherzyka. Formowanie drugiej warstwy GCs jest najprawdopodobniej związane z początkową fazą transkrypcji genu TNF- $\alpha$  w oocycie i koreluje ze wzrostem stężenia tego białka i jego mRNA. Wynika z tego możliwość hamowania jego jajnikowej ekspresji przez zastosowanie syntetycznych oligonukleotydów i ograniczenie efektu działania TNF- $\alpha$  na wzrost oocytów.

2. U szczurów miejscem pierwotnej lokalizacji TNF- $\alpha$  jest oocyt [18, 44]. W przeciwieństwie do myszy TNF- $\alpha$  jest obecny w pęcherzykach zawiązkowych, pę-

cherzykach z jedną warstwą GCs oraz pęcherzykach dużych. TNF- $\alpha$  stwierdzano w oocytach szczurzych noworodków już w 2 dobie po porodzie. Oocyty płodowe jeszcze na dobę przed porodem nie zawierają TNF- $\alpha$ . W okresie tym rzadko stwierdzany jest także jego mRNA. Sugeruje to możliwość inicjowania syntezy TNF- $\alpha$  inną drogą niż pobudzenie czynnikami pochodzącymi z organizmu matki. Stężenie kortykosteronu w krążeniu matczynym wzrasta wraz z zaawansowaniem ciąży [76]. Kortykoidy hamują genową transkrypcję i translację TNF- $\alpha$  [8]. Jest to podstawą hipotezy, że kortykoidy matczyno-płodowe są odpowiedzialne za hamowanie syntezy TNF- $\alpha$  w okresie płodowym, a pozbawienie noworodków ich działania wyzwała translację TNF- $\alpha$ .

Izolowane GCs wykazują obecność immunoreaktywnego TNF- $\alpha$  [44, 53]. Nie jest jednak potwierdzone, czy są one zdolne do jego syntezy. Najprawdopodobniej TNF- $\alpha$  pochodzi z oocytów oraz komórek mononuklearnych. Przedowulacyjne oocyty badano na obecność bioaktywnego TNF- $\alpha$  *in vitro* przy użyciu linii komórek L929, które pod wpływem tej cytokiny ulegają lizie [44]. Stwierdzono, iż aktywność obecnego w nich TNF- $\alpha$  zbliżona jest do aktywności rekombinowanego mysiego TNF- $\alpha$ .

3. W środowisku hodowli tkanki lutealnej pochodzącej z ciąży rzekomej królic wykazano aktywność TNF- $\alpha$  w biometodzie z użyciem komórek linii LM [4, 5]. Stwierdzono, iż w 17/19 dniu, po inkubacji z LPS wyraźnie wzrasta w nich stężenie TNF- $\alpha$  i że za ten wzrost odpowiedzialne są obecne w hodowli makrofagi. Zaobserwowano je w 17 dniu, w okresie inwolucji CL i wykazano, że ich liczba korelowała z wysokim poziomem TNF- $\alpha$  uwalnianym do środowiska hodowli.

4. U owiec wykryto mRNA TNF- $\alpha$  w różnych stadiach inwolucji CL. Aktywność TNF- $\alpha$  wzrastała w odpowiedzi na prostaglandynę F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), a wyraźnie malała wraz z obniżaniem się poziomu progesteronu, co towarzyszy zmianom wstecznym i rozpadowi CL. Możliwe jest, iż w przebiegającej w tym okresie fazie uprzątnania, naciekające CL komórki jednojądrowe odpowiadają częściowo za wzrost poziomu TNF- $\alpha$  [38].

5. Immunoreaktywność TNF- $\alpha$  i jego mRNA obserwowano także w krowich pęcherzykach atrezyjnych, pęcherzykach zatokowych, CL oraz jednojądrowych komórkach makrofagopodobnych [53]. Stężenie TNF- $\alpha$  w płynie pęcherzykowym było stałe między 3 a 20 dniem fazy estrus, a najwyższe wartości osiągało w dniu owulacji [90].

6. W ludzkim cyklu miesięczkowym TNF- $\alpha$  występuje zarówno w fazie folikularnej, jak i lutealnej [55, 90]. Pęcherzyki wykazują immunoreaktywność TNF- $\alpha$  w warstwach GCs, pęcherzykach atrezyjnych i płynie pęcherzykowym [53]. TNF- $\alpha$  zawierają też CL, duże komórki luteopodobne oraz komórki osłonki [55].

Prowadzone badania wskazują na GCs jako główne źródło jajnikowego TNF- $\alpha$  [55, 90]. Pobrane od kobiet w procesie zapłodnienia *in vitro* (*in vitro fertilization*, IVF) uwalniają TNF- $\alpha$  do środowiska hodowli jedynie podczas inkubacji z fo-

litropiną (FSH) [90]. W badaniach tych zaobserwowano także synergizm działania skojarzenia czynnika stymulującego kolonie makrofagowe (*macrophage-colony stimulating factor*, M-CSF/CSF-1) i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (*human chorionic gonadotrophin*, hCG), pomimo braku ich samodzielnego wpływu na syntezę TNF- $\alpha$ .

Przy użyciu Ab wykryto na GCs białka odpowiedzialne za łączenie LPS [61]. Badano je w hodowli, w obecności LPS, stwierdzając po 16 godz. inkubacji wzrost syntezy mRNA TNF- $\alpha$  oraz zwiększenie sekrecji TNF- $\alpha$  do środowiska. Niestety, licznie obecne makrofagi i krwinki białe mogły mieć istotny wpływ na wyniki tych badań i stąd w ocenie tego procesu niezbędne jest zastosowanie dodatkowych metod (43).

W hodowlach ludzkich oocytów, GCs, komórek wzgórką jajonośnego oraz komórkach zarodka badano także stężenie innych cytokin [89]. Stwierdzono, iż po 24 godz. tylko w środowisku kompleksu oocyty-komórki wzgórką jajonośnego wzrastały poziomy interleukiny 1 (interleukin 1, IL-1), interleukiny 6 (IL-6) oraz CSF-1, natomiast stężenie TNF- $\alpha$  było niskie. Wzrastało ono wyraźnie w okresie podziałów komórek zarodka, co może świadczyć o jego roli jako czynnika wzrostu.

#### IV. REGULACJA EKSPRESJI TNF- $\alpha$ W JAJNIKU

Czynniki wpływające na ekspresję TNF- $\alpha$  w jajniku nie są dokładnie poznane. Ilościowa ocena jajnikowego mRNA TNF- $\alpha$  w fazie estrus u myszy oraz u niedojrzałych szczurów po zastosowaniu gonadotropiny uzyskanej z surowicy ciężarnych klaczy (*pregnant mare's serum gonadotrophin*, PMSG) nie wykazała istotnych różnic [18, 62], podobnie jak jakościowa analiza immunocytochemiczna [18, 44, 62]. Interesujące jest, że po zastosowaniu LPS u niedojrzałych szczurów dochodzi do napływu zależnych od TNF- $\alpha$  komórek immunokompetentnych, które obserwowano w podścielisku, osłonce i tkance śródmiąższowej. Komórki te produkują jednak niewielkie ilości mRNA TNF- $\alpha$  [62]. W jajniku szczura oocyty wydają się być podstawowym źródłem TNF- $\alpha$  [44].

Istnieje prawdopodobieństwo hormonalnej regulacji poziomów stężeń jajnikowego TNF- $\alpha$ . Wykazano, że bioaktywność TNF- $\alpha$  wzrasta w płynie pęcherzykowym w przedziale 3–20 dzień fazy estrus u krów [90]. Wraz z dojrzewaniem pęcherzyków wzrasta transkrypcja genu TNF- $\alpha$ , ilość jego mRNA i stężenie TNF- $\alpha$ . Część TNF- $\alpha$  może pochodzić z napływowych komórek makrofagopodobnych, które dostają się do wzrastającego pęcherzyka w wyniku zwiększonego przepływu krwi. Nie można jednak wykluczyć regulacyjnej roli gonadotropin, które wpływając na wzrost pęcherzyków mogą także oddziaływać na ekspresję genową i indukcję syntezy

TNF- $\alpha$ , w przeciwieństwie do progesteronu i estradiolu, które w hodowli monocytów uzyskanych w fazie lutealnej wyraźnie zmniejszają ekspresję mRNA TNF- $\alpha$  [43].

## V. WPŁYW TNF- $\alpha$ NA FUNKCJE JAJNIKA

1. W hodowli GCs pochodzących od niedojrzałych szczurów poddanych działaniu dietylostylbestrolu (DES) TNF- $\alpha$  hamuje aktywność zależnej od FSH aromatazy [25]. Stopień hamowania uzależniony jest od zastosowanej dawki cytokiny (0,001–10 ng/ml) [74]. Jej wpływ zachodzi na poziomie indukcji przez FSH. TNF- $\alpha$  hamuje także indukcję aktywności aromatazy wywołwaną przez transformujący czynnik wzrostu- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* , TGF- $\beta$ ), a także zmniejsza poziom progesteronu indukowany przez TGF- $\alpha$  i FSH [1]. Mechanizm działania TNF- $\alpha$  na GCs oparty jest na zmniejszaniu poziomu cAMP, który pobudza aktywność aromatazy, a którego syntezę nasilają: FSH, PGE<sub>2</sub> oraz naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (*vasoactive intestinal polypeptide*, VIP). W stężeniu 1 ng/ml TNF- $\alpha$  hamuje przez 24 godz. działanie pobudzające FSH na ekspresję i liczbę receptorów LH *in vitro*. Wydaje się, że nie ma na to wpływu działanie cytotoksyczne TNF- $\alpha$ , ponieważ liczba GCs nie ulega zmianie [22].

Stwierdzone *in vitro* działanie hamujące syntezę progesteronu [1, 25] i 20- $\alpha$ -hydroksyprogesteronu [1] oraz pobudzanie syntezy 5- $\alpha$ -pregnandiolu [1] potwierdza udział TNF- $\alpha$  w przemianach tego hormonu. Śródmiaższowe komórki otoczki wykazują *in vitro* zależny od dawki TNF- $\alpha$  stopień hamowania pobudzanej przez LH syntezy androstendionu [2, 85]. Efekt ten zanika po usunięciu go ze środowiska hodowli lub jest neutralizowany przez zastosowanie Ab p/TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  indukuje tworzenie się zrębu komórek śródmiaższowych [85]. Podobny proces zachodzi w odpowiedzi na nabłonkowych czynnik wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF) [86]. Znaczenie fizjologiczne tych procesów nie jest poznane. Możliwe, że TNF- $\alpha$  działa w oocyte jako czynnik wzrostowy w przebiegu wczesnego stadium dojrzewania pęcherzyka. Jego okresowy wpływ na proces sterydogenezy może chronić dojrzewający pęcherzyk przed wczesną odpowiedzią na wzrastające poziomy gonadotropin.

Stwierdzono, iż TNF- $\alpha$  zwiększa aktywność kinazy białkowej C oraz zależnej od EGF kinazy tyrozynowej, która przez aktywację kinazy białkowej C powoduje pobudzenie komórek śródmiaższowych. Inhibitory tych białek nie blokują hamującego działania TNF- $\alpha$  na syntezę androgenów [86]. Dlatego wydaje się prawdopodobne, że TNF- $\alpha$  indukuje w otoczce syntezę transformującego czynnika wzrostu- $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* , TGF- $\alpha$ ) lub EGF, a następnie mediatory zależne od nich pośredniczą w formowaniu zrębu komórkowego.



2. Pęcherzyki przedowulacyjne dorosłych szczurów pochodzące z fazy proestrus także syntetyzują TNF- $\alpha$  [54]. Niskie stężenia TNF- $\alpha$  hamują syntezę androstendionu, wysokie jego produkcję pobudzają. Stężenie estradiolu w okresie 24 godz. inkubacji z TNF- $\alpha$  nie ulega zmianom [11]. Wykazano jednak w tym czasie atreję pęcherzyków, indukcję procesów apoptozy i hamowanie stymulowanej przez FSH syntezy progesteronu. Wykazano także, że TNF- $\alpha$  stymuluje syntezę i gromadzenie progesteronu przez komórki osłonki oraz hamuje jego akumulację w GCs [54].

Badane formy przedowulacyjne pęcherzyków niedojrzałych szczurów po zastosowaniu gonadotropiny kosmówkowej klaczy (*equine chorionic gonadotrophin*, eCG) wykazały po podaniu TNF- $\alpha$  pobudzenie syntezy: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , prostacykliny i progesteronu [10]. Nie odnotowano opisanego wcześniej hamującego wpływu TNF- $\alpha$  na stężenie progesteronu w izolowanych GCs. Potwierdzono natomiast, iż może on stymulować jego syntezę w komórkach osłonki [10]. Wydaje się, że gromadzenie progesteronu indukowane przez TNF- $\alpha$  nie jest uzależnione od syntezy prostaglandyn. Przemawia za tym fakt, że zastosowanie inhibitora ich syntezy (indometacyny) nie blokuje indukcji jego syntezy przez TNF- $\alpha$  [10]. W badaniach GCs pochodzących z dojrzałych pęcherzyków przedowulacyjnych nie stwierdzono istotnego działania TNF- $\alpha$  na sekrecję pobudzanego przez LH progesteronu [63].

3. Wstępne doniesienia opisują hamowanie przez TNF- $\alpha$  stymulowanej przez FSH i insulinę syntezy progesteronu w GCs pochodzących od świń [74]. Okresowo stwierdzano w nich syntezę PGE<sub>2</sub> i PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Obserwowano też, że hamuje on pobudzaną przez LH syntezę progesteronu w komórkach otoczki średniej wielkości niedojrzałych pęcherzyków [69].

W badaniach CL pochodzących z przedziału 3–10 dzień cyklu u świń wykazano, iż TNF- $\alpha$  całkowicie hamuje aktywność estradiolu i progesteronu indukowaną przez hCG [51]. Natomiast CL pochodzące z 10–14 dnia cyklu nie były wrażliwe na jego działanie [69]. Wydaje się, że CL może tracić wrażliwość na działanie TNF- $\alpha$  w procesie regresji.

4. TNF- $\alpha$  ma wyraźny wpływ na komórki lutealne pochodzące z 9–12 dnia cyklu krów [7]. W zależności od dawki indukuje on wzrost syntezy PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  i 6-ketoPGF<sub>1 $\alpha$</sub>  bez wpływu na poziom progesteronu.

5. U ludzi badano jedynie wpływ TNF- $\alpha$  na komórki lutealne [20, 28, 71, 77, 78, 90]. Indukuje on ich proliferację, a w ich środowisku wzrost stężeń PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  i PGE<sub>2</sub> [77, 81]. W komórkach lutealno-ziarnistych TNF- $\alpha$  wyraźnie zwiększa po 4–6 dniach hodowli wydzielanie estradiolu [81]. Stężenie progesteronu w środowisku jest także wyraźnie wyższe niż w kontroli [81]. Stwierdzono synergistyczne działanie hCG i TNF- $\alpha$  na wzrost jego poziomu [71]. Wykazano także zwiększenie łączenia się hCG z receptorami komórkowymi pod wpływem TNF- $\alpha$  w 10 dniu hodowli, co może sugerować, że synergizm działania hCG i TNF- $\alpha$  polega na zwiększeniu liczby miejsc receptorowych dla hCG. TNF- $\alpha$  zwiększa także indukowaną przez prolaktynę syntezę progesteronu [20]. Prowadzone są też badania

oceniające efekt działania TNF- $\alpha$  oraz IFN- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  na produkcję progesteronu [28, 78]. *In vitro* IFN- $\alpha$  nie wpływa na sekrecję progesteronu, a IFN- $\gamma$  hamuje jego wydzielanie. TNF- $\alpha$  w skojarzeniu z IFN- $\gamma$  również powoduje supresję syntezy progesteronu, co może sugerować ich wspólne działanie w procesie regresji CL.

## VI. REGULACYJNA ROLA TNF- $\alpha$ W JAJNIKU

Wiele badań wskazuje, że TNF- $\alpha$  wpływa na wzrost różnych typów komórek zarówno w sposób pobudzający, jak i hamujący, w tym także cytotoksyczny [46, 47]. Pierwotnie stwierdzono jego aktywny wpływ na komórki guzów nowotworowych wyrażający się wywoływaniem martwicy krwotocznej [15]. Późniejsze badania potwierdziły jego rolę w procesie apoptozy, co skłoniło do podjęcia prób oceny wpływu TNF- $\alpha$  na zmiany zachodzące w CL oraz proces atrezji pęcherzyków. Stwierdzono *in vitro* cytotoksyczne działanie tej cytokiny na krowie komórki lutealne [7]. Sam TNF- $\alpha$  nie wpływa na liczbę komórek, ale w skojarzeniu z IFN- $\gamma$  zmniejsza ich liczbę o ok. 80% [78]. W innych badaniach odnotowano, iż pobudza on podziały ludzkich komórek lutealno-ziarnistych [77, 81]. Komórki te uzyskiwano w trakcie IVF, a zwiększanie ich podziałów obserwowano w zależności od zastosowanej dawki TNF- $\alpha$  (0,1–10 ng/ml) [81]. Możliwe, że komórki lutealne wrażliwe są na działanie cytolityczne TNF- $\alpha$  tylko w obecności IFN- $\gamma$ , a w stadiach początkowych fazy lutealnej mogą odpowiadać na TNF- $\alpha$  zwiększoną proliferacją. Nie stwierdzono istotnego wpływu TNF- $\alpha$  na GCs i komórki osłonki niedojrzałych szczurów [1, 22, 81, 85].

Celem oceny wpływu TNF- $\alpha$  na proliferację komórek badano także linie komórkowe nowotworów nabłonkowych jajnika stwierdzając w niektórych przypadkach pobudzenie, natomiast w innych zahamowanie wzrostu [46, 47, 80]. Wykazano także, że niskie dawki skojarzonego TNF- $\alpha$  z IFN- $\gamma$  pobudzają proliferację, a wysokie hamują [80]. Wpływ na proliferację komórek nabłonkowych raków jajnika ma też IL-1 $\beta$  oddziałująca przez zwiększenie ekspresji TNF- $\alpha$ . Zastosowanie razem z IL-1 $\beta$  Ab p/TNF- $\alpha$  zapobiegało indukcji proliferacji, stąd wydaje się możliwa rola promująca cytokiny TNF- $\alpha$  w tych nowotworach [80].

Przeprowadzono szereg badań w celu precyzyjnego określenia roli, jaką pełni TNF- $\alpha$  w jajniku. W fazie folikularnej stwierdzono TNF- $\alpha$  w ooplazmie oocytów szczurów i myszy oraz w procesie pobudzania *in vitro* organizacji komórek śródmiąższowych osłonki. Jest to podstawą hipotezy, że TNF- $\alpha$  pochodzący z oocyta może być czynnikiem organizacyjnym w fazie folikularnej będąc sygnałem do migracji komórek i ich skupiania się wokół oocyta. Dotychczas tylko na GCs wykryto receptory dla TNF- $\alpha$  [74]. Efekt TNF- $\alpha$  wywołany przy stężeniu 0,1–10 ng/ml stwierdzany w komórkach śródmiąższowych osłonki także sugeruje obecność re-

ceptora. Prawdopodobnie TNF-R1 pośredniczy w hamowaniu pobudzonej przez gonadotropiny sterydogenezy, hamowaniu wzrostu komórek i efekcie cytotoxicznym. TNF-R2 może pośredniczyć w działaniu pobudzającym proliferację komórek i w ich migracji. Do badania roli tych receptorów stosowano syntetyczne oligonukleotydy i Ab p/TNF-R oraz blokery syntezy TNF- $\alpha$ , takie jak pentoksyfilina i inhibitory fosfodiesterazy [24].

Pochodzący z oocytów i makrofagów TNF- $\alpha$  może wpływać modulująco na sterydogenezę w GCs i komórkach otoczki, ponieważ potwierdzono jego hamujący wpływ na syntezę androgenów w osłonce i zmniejszenie aktywności aromatazy w GCs. We wczesnych stadiach dojrzewania pęcherzyka oocytarny TNF- $\alpha$  rozmieszczony jest w pobliżu GCs i w komórkach otoczki modulując ich funkcje. Jest prawdopodobne, że komórki leżące w pewnej odległości nie podlegają wpływom tej cytokiny. Przykładem może być mniejsza zdolność sterydogenezy wzgórka GCs oocyta w porównaniu z komórkami ściennymi [32]. W tym wypadku działanie TNF- $\alpha$  może chronić oocyt przed wpływem estrogenów. Badania wykazały, że opóźniona owulacja, w wyniku której oocyt narażony jest na nadmiar estrogenów zwiększa w nim liczbę zaburzeń rozwojowych i wad [12]. Przeciwdziałają temu antyestrogeny. Z kolei efekt ich oddziaływania może być odwracany przez DES [13]. Estrogeny i FSH synergistycznie uczestniczą w regulacji wzrostu pęcherzyków, wpływając na zwiększenie liczby receptorów LH i liczbę podziałów komórkowych [52]. Dlatego możliwe jest, że we wczesnych stadiach rozwoju pęcherzyków TNF- $\alpha$  moduluje wpływ gonadotropin i chroni pęcherzyki przed atrezią indukowaną przez androgeny. Nadmiar TNF- $\alpha$  w fazie wzrostu może także indukować atrezię pęcherzyków w wyniku hamowania aromatazy w GCs [1, 25] i hydroksylazy w komórkach otoczki [87].

W fazie lutealnej TNF- $\alpha$  obecny w CL pochodzi z makrofagów, komórek paralutealnych i komórek lutealno-ziarnistych. Makrofagi są głównym źródłem TNF- $\alpha$  w późnych stadiach CL [4, 5]. Komórki te będąc *in vitro* w kontakcie z mysimi lub ludzkimi komórkami lutealnymi zaczynają wykazywać właściwości luteotropowe z chwilą gromadzenia się progesteronu w środowisku hodowli [30]. We wszystkich wzrastających we wczesnej fazie lutealnej komórkach TNF- $\alpha$  zwiększa stężenie progesteronu [81], wrażliwość na hCG [72] oraz nasila proliferację ludzkich GCs [77, 81]. Wzrost liczby TNF-R lub gwałtowne uwalnianie TNF- $\alpha$  mogą hamować działanie luteotropowe LH i powodować regresję CL.

TNF- $\alpha$  pobudza syntezę *in vitro* PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  [4, 77, 90], której luteolityczne działanie stwierdzono u szczurów, krów i ludzi [48]. U owiec podczas indukowanej przez PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  regresji CL zmian w mRNA TNF nie obserwowano. Jego bioaktywność stwierdzano jednak wraz z malejącym stężeniem progesteronu, co może świadczyć o udziale TNF- $\alpha$  w późnych stadiach regresji związanych z procesami uprzątania [38].

Wykazano, że TNF- $\alpha$  zmniejsza odpowiedź GCs na gonadotropiny w wyniku hamowania aktywności cyklicznej adenylowej [2, 78]. Obecność TNF- $\alpha$  jest także stwierdzana w CL po zastosowaniu *in vitro* LPS [4, 5]. Występuje tu wyraźna korelacja między wzrostem stężenia cytokiny a liczbą makrofagów [4, 5]. W hodowli luteinowych komórek szczurów, krów i ludzi TNF- $\alpha$  hamuje pobudzaną przez hCG (LH) sekrecję progesteronu [2, 7, 88].

## VII. TNF- $\alpha$ W JAJOWODZIE I W ZARODKU PRZED ZAGNIEŹDZENIEM

TNF- $\alpha$  i jego mRNA stwierdzano u myszy i szczurów głównie w komórkach nabłonka, podścielisku oraz mięśniach gładkich jajowodu [36, 37]. Wstępne badania sugerują, iż ekspresję TNF- $\alpha$  w jajowodzie może indukować progesteron oraz CSF-1 [37]. Nie stwierdza się obecności mRNA TNF- $\alpha$  u myszy w komórkach I i II podziału, moruli i blastocyste [37]. Wykazano, że na komórkach mysiego zarodka obecny jest TNF-R1 [49]. Zarodkowa ektoderma jest oporna na cytotolyczne działanie rekombinowanego TNF- $\alpha$  i przez to może chronić inne, wrażliwe komórki. Zarodek ludzki w przeciwieństwie do mysiego wykazuje obecność TNF- $\alpha$ , który prawdopodobnie uczestniczy w eliminacji komórek wieńca promienistego [89]. Stężenie TNF- $\alpha$  w tym procesie określane przy użyciu biometody L929 wynosi od 2 do 3 U/ml [89].

## VIII. TNF- $\alpha$ I TNF-R W ENDOMETRIUM

Transkrypcję i translację genu TNF- $\alpha$  stwierdzono w komórkach endometrium szczurzego [83], mysiego [37, 57] i ludzkiego [34]. Immunoreaktywny TNF- $\alpha$  obecny jest w endometrium i komórkach podścieliska, w których obecne są skupienia makrofagów [35]. Poziomy TNF- $\alpha$  w przebiegu badanych cykli były zróżnicowane, zaś w ludzkim endometrium stwierdzono dwufazowość [34]. Wykazano stopniowo wzrastającą aktywność TNF- $\alpha$  w czasie fazy proliferacyjnej, osiągającą najwyższe wartości w początkowej fazie wydzielniczej. W późniejszym okresie obserwowano utrzymywanie się poziomów średnich. W szczurzym endometrium i podścielisku mRNA TNF- $\alpha$  wykrywano w II fazie diestrus [57]. Potwierdza to wspólną cechę endometrium obu gatunków, jaką jest skłonność do ekspresji wysokich poziomów mRNA TNF- $\alpha$  po wstępnym zadziałaniu estrogenów i późniejszej ekspozycji na progesteron.

Nie wszystkie przeprowadzone badania wykrywały w macicy obecność TNF- $\alpha$ . Być może miały na to wpływ metodyka badań [29] lub zbyt mała czułość zastosowanych metod. Wydaje się jednak prawdopodobne, że najistotniejszym źródłem TNF- $\alpha$  w macicy są makrofagi. Inne komórki syntetyzują go w hodowli, w ilościach niewielkich (od 5 do 15 pg/ml) [82].

W przebiegu cyklu miesięczkowego zmienia się także ilość TNF-R. TNF-R1 jest praktycznie nieobecny w fazie proliferacyjnej i wczesnej wydzielniczej. Jego ekspresja gwałtownie wzrasta od połowy fazy wydzielniczej. TNF-R2 wykazuje pik od połowy do późnej fazy proliferacyjnej i drugi podobny w fazie wydzielniczej.

## IX. REGULACJA GENOWA TNF- $\alpha$ W PRZEMIANACH ENDOMETRIUM

Cykliczne zmiany ekspresji genowej TNF- $\alpha$  i TNF-R w macicy wyraźnie sugerują regulacyjny wpływ hormonów płciowych. Badania przeprowadzone po usunięciu jajników i zastosowaniu substytucji hormonalnej u myszy wykazują ostatecznie, iż są one niezbędne do syntezy TNF- $\alpha$  [57]. Częściowa substytucja 17- $\beta$ -estradiolu (E2) wyzwała dwie fale syntezy TNF- $\alpha$ : pierwszą, występującą po 1 godz. po zastosowaniu hormonu i drugą po 72 godz. Po zastosowaniu progesteronu lub progesteronu i E2 synteza TNF- $\alpha$  jest największa po upływie 24 godz. Może to wskazywać, iż każdy z tych hormonów ma wyraźny, czasowy wpływ na profil wydzielania TNF- $\alpha$ . Nie jest do końca poznane, w jaki sposób ta wysoka intensywność syntezy zależy od wzrostu tempa transkrypcji lub zmian stabilności mRNA, jednak wstępne oceny sugerują, że intensywność immunoreakcji świadczącej o obecności TNF- $\alpha$  ściśle odpowiada poziomom przekąźnika w postaci mRNA.

Gromadzone są dowody na hormonalną regulację TNF-R1. Badania ludzkiego endometrium sugerują, iż maksymalna ekspresja tego receptora wymaga przed stymulacją progesteronem działania estrogenów [57]. Hormonalna regulacja TNF-R2 nie była jeszcze badana, można jednak podejrzewać, iż estrogeny mogą być głównym, ale nie jedynym ich regulatorem.

Hormonalną regulacją mogą kierować w regionie genów TNF- $\alpha$ /TNF-R elementy odpowiadające na estrogeny (ERE) lub progesteron (PRE). Zwiększać lub zmniejszać ekspresję tych genów mogą także czynniki wzrostu oraz produkty metabolizmu kwasu arachidowego. Syntezą wielu macicznych czynników wzrostu kierują hormony jajnikowe [58]. Wykazano bezpośredni efekt działania E2 na mRNA TNF- $\alpha$  z pominięciem roli CSF-1, co także potwierdza istnienie hormonalnej regulacji [37]. Nie należy jednak wykluczać możliwości regulacyjnego wpływu samych TNF-R, które mogą ulegać internacjonalizacji lub złuszczeniu [31]. Wzrost poziomu TNF- $\alpha$  w endometrium stwierdzono także w wyniku zakażenia bakteriami gram ujemnymi.

Aktywują one przez LPS obecne w macicy makrofagi, pobudzając je do gwałtownej syntezy TNF- $\alpha$  [29, 35].

Interleukinę 10 (IL-10) opisywano jako główną cytokinę ciężarnej, mysiej macicy [42]. W ludzkich monocytach jej indukcję uaktywnia TNF- $\alpha$  [79]. Ponieważ zwiększa ona syntezę TNF- $\alpha$ , wydaje się, że ta droga stymulacji wynika z istniejącego sprzężenia zwrotnego. Inną możliwością wpływu na ekspresję TNF- $\alpha$  w macicy jest transformacja nowotworowa. Stwierdzono, iż komórki nowotworowe zawierają znacznie więcej mRNA TNF- $\alpha$ . Trudno ocenić, w jaki sposób oddziałuje na nie ta cytokina, jednak badania komórek *chorioncarcinoma* sugerują, iż wykorzystują one TNF- $\alpha$  jako czynnik wzrostu z zaangażowaniem TNF-R1 [82].

## X. FUNKCJE TNF- $\alpha$ W PRZEMIANACH ENDOMETRIUM

Na podstawie badania ludzkiego endometrium opracowano model, w którym niskie stężenia TNF- $\alpha$  indukowane przez estrogeny we wczesnej fazie proliferacyjnej cyklu pobudzają syntezę DNA w komórkach endometrium i podścielisku, zaś wysokie są efektem pobudzania przez estrogeny i progesteron, a osiągając szczyt prowadzą do menstruacji w następstwie cytolizy [36]. Ekspresja TNF-R2 w skojarzeniu z TNF- $\alpha$  prawdopodobnie promuje fazę proliferacyjną i ekspresję obu receptorów, co w obecności TNF- $\alpha$  może prowadzić do lizy komórki. Modułacja wzrostu komórek endometrium pod wpływem TNF- $\alpha$  odbywa się także na podstawie indukcji procesu apoptozy oraz pobudzanie migracji leukocytów [65].

## XI. TNF- $\alpha$ I TNF-R W MACICY CIĘŻARNEJ

Badania ekspresji TNF- $\alpha$  w macicach ciężarnych wykazują, że wzrost poziomu TNF- $\alpha$  następuje podczas implantacji [37, 83]. Wraz z rozwojem ciąży stężenie TNF- $\alpha$  i liczba TNF-R w komórkach doczesnej macicy maleje, a wzrasta w endometrium. Obecne w endometrium komórki makrofagopodobne zawierają duże ilości mRNA TNF- $\alpha$ , ale niewielkie ilości samego białka [37, 83]. W ludzkich komórkach makrofagopodobnych TNF- $\alpha$  występuje często w komórkach związanych z dojrzałym łożyskiem i błonami płodowymi [17, 75].

## XII. REGULACJA EKSPRESJI GENOWEJ TNF- $\alpha$ W MACICY CIĘŻARNEJ

Nie wiadomo dokładnie, jakim procesom towarzyszy ekspresja genu TNF- $\alpha$  w macicy ciężarnej [19]. Egzogenne zastosowanie TNF- $\alpha$  prowadzi u ciężarnych

zwierząt do zmian wstecznych w tkankach płodu [70]. Poziomy TNF- $\alpha$  wyraźnie wzrastają w płynie owodniowym w przypadku zakażenia bakteriami gram ujemnymi i ściśle łączą się z porodem przedwczesnym [59]. Wykazano, że komórki doczesnej i przypuszczalnie matczyne makrofagi produkują TNF- $\alpha$  w odpowiedzi na LPS, co może być przyczyną porodu przedwczesnego lub poronienia [16]. Stosowany u zwierząt doświadczalnych egzogenny TNF- $\alpha$  może także prowadzić do niepłodności [68].

### XIII. PRAWDOPODOBNE DZIAŁANIE TNF- $\alpha$ W MACICY CIĘŻARNEJ

Obecność mRNA TNF- $\alpha$ , samego białka i TNF-R w macicy ciężarnej sugeruje, że ta silnie działająca cytokina może odgrywać podobną rolę jak w przebiegu cyklu miesięczkowego. Jest prawdopodobne, że TNF- $\alpha$  bierze udział w różnicowaniu i wzroście komórek endometrium oraz przemianach tkankowych, które odpowiadają za przygotowanie endometrium do przyjęcia zarodka. Badania wykazują, iż w związku z brakiem tej cytokiny w przedimplantacyjnym zarodku TNF- $\alpha$  pochodzenia matczynego może być głównym czynnikiem wzrostu i różnicowania się komórek trofoblastu we wczesnych stadiach, gdy jego synteza w zarodku jest jeszcze niewydolna. W ciąży późniejszej TNF- $\alpha$  może pełnić rolę w ograniczaniu nacieku mięśnia macicy przez trofoblast. Postuluje się, że wysokie poziomy TNF- $\alpha$  syntetyzowane przez matczyne makrofagi mogą odgrywać rolę w indukcji porodu [17, 75].

### XIV. TNF- $\alpha$ I TNF-R W ŁOŻYSKU

Potwierdzono obecność TNF- $\alpha$  w komórkach łożysk zwierząt doświadczalnych i ludzi [36]. We wczesnej ludzkiej ciąży mRNA TNF- $\alpha$  i TNF- $\alpha$  wykrywane są zarówno w dobrze zróżnicowanym syncytiotrofoblastie [17, 41], jak i w pozakosmkowych komórkach cytotrofoblastu [82]. W ciąży późniejszej jest on częściej obserwowany w komórkach zrębu (prawdopodobnie makrofagach) [17]. W ciąży u gryzoni mRNA TNF- $\alpha$  i TNF- $\alpha$  związane są przede wszystkim z komórkami olbrzymimi, wykazując wartości średnie w okresie od 10 do 13 dnia ciąży, z pikiem w dniu 16 i zachowaniem wysokiego poziomu do chwili porodu [29].

Gen TNF- $\alpha$  ulega także transkrypcji i translacji w hodowlach linii komórek trofoblastu. Wykazano, że komórki *chorioncarcinoma* (Jar i JEG-3) syntetyzują

niewielkie ilości TNF- $\alpha$  [82] oraz stwierdzono mRNA TNF- $\alpha$  w komórkach mysiego trofoblastu (PL/B6) [39].

Ekspresja TNF-R w łożysku także zmienia się w przebiegu ciąży [84]. W łożyskach ludzkich mRNA TNF- $\alpha$  i TNF-R jest obecny we wszystkich typach komórek i jego poziomy wzrastają w miarę zbliżania się do terminu porodu. W przeciwieństwie do TNF-R1, TNF-R2 jest ograniczony do trofoblastu ciąży wczesnej, a w stadiach późniejszych koncentruje się w komórkach mezenchymalnych łożysk. Badania u myszy potwierdzają koncepcję względnie stałej ekspresji TNF-R1 i zmiennej TNF-R2.

Łożyskowemu TNF- $\alpha$  przypisuje się wiele funkcji łącznie z wpływem na różnicowanie się komórek [60]. Ostatnie badania wykazują, że różnicowanie się komórek linii trofoblastu szczurzego Rcho-1 jest związane z dużą ilością mRNA TNF- $\alpha$  [56]. Uzyskany z trofoblastu TNF- $\alpha$  indukuje przy udziale IL-6 uwalnianie gonadotropiny kosmówkowej [41], może uczestniczyć w procesie angiogenezy, indukcji porodu, a także ułatwia migrację komórek trofoblastu wchodzących w interakcje z fibronektyną i lamininą [3]. Łożyska mysie, w których stwierdzono zmiany budowy TNF-R wykazują dezorganizację i niewydolność prowadzącą do poronień.

## XV. TNF- $\alpha$ I TNF-R W ZARODKU

W mysim przedimplantacyjnym zarodku mRNA TNF- $\alpha$  nie jest obecny [37]. Cytokina ta syntetyzowana jest w późniejszym okresie ciąży [40]. Wykazano, że mysz gen TNF- $\alpha$  jest pobudzany w połowie ciąży i ulega ekspresji między 10 a 14 dniem na komórkach serca, płuc i naskórka [37], w 12 dniu w wątrobie [40] i w 18 dniu w grasicy [29]. Wykazano też stałość poziomów mRNA TNF-R1 i zmienność mRNA TNF-R2 tak w tkankach zarodka [40], jak i w łożysku [84].

Działanie embrionalnego TNF- $\alpha$  nie jest dotychczas poznane. W badaniach z zastosowaniem poliklonalnych Ab p/TNF- $\alpha$  u myszy wzrost zarodka był opóźniony oraz stwierdzano nieprawidłowości w układzie limfatycznym [23]. Zastosowanie TNF-Rs u ciężarnych myszy efektywnie blokowało interakcje TNF- $\alpha$ /TNF-R i prowadziło do przerwania ciąży [29].

## UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując obecny stan wiedzy należy stwierdzić, iż pewne procesy zachodzące w żeńskim układzie rozrodczym wymagają czasowej ekspresji genów cytokin, ich receptorów oraz ścisłej regulacji niezbędnych ligandów. Omawiane



modele doświadczalne mogą być oceniane krytycznie, ponieważ zwierzęta transgeniczne, pozbawione genów cytokin i ich receptorów w warunkach doświadczalnych także rozmnażają się prawidłowo [21, 50]. Prawdopodobnie, w przypadku TNF- $\alpha$  możliwe jest zastępcze działanie innych czynników, np. IL-1 [68]. Mechanizmy te wymagają ścisłego określenia wzajemnych zależności w całej sieci cytokinowej istniejącej na terenie żeńskiego narządu płciowego, która może stanowić alternatywną drogę poszukiwania przyczyn niepowodzeń w procesie reprodukcji. Nie można wykluczyć, iż dokładne poznanie wszystkich wzajemnych zależności w jej obrębie umożliwi ustalenie efektywnych form terapii pewnych typów niepłodności.

## LITERATURA

- [1] ADASHI EY, RESNICK CE, CROFT CS, PAYNE DW. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits gonadotrophin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 1989; **264**: 11591–11597.
- [2] ADASHI EY, RESNICK CE, PACKMAN JN, HURWITZ A, PAYNE DW. Cytokine-mediated regulation of ovarian function: Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits gonadotrophin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **163**: 889–899.
- [3] ALON R, CAHALON L, HERSHKOVITZ R, ELBAZ D, REIZIS B, WALLACH D, AKIYAMA KM, LIDER O. TNF- $\alpha$  binds to the N-terminal domain of fibronectin and aguments the  $\beta_1$ -integrin-mediated adhesion of CD4+T lymphocytes to the glycoprotein. *J Immunol* 1994; **152**: 1304–1313.
- [4] BAGAVANDOSS P, KUNKEL SL, WIGGINS RC, KEYES PL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 1988; **122**: 1185–1187.
- [5] BAGAVANDOSS P, WIGGINS RC, KUNKEL SL, REMICK DG, KEYES PL. Tumor necrosis factor production and accumulation of inflammatory cells in the corpus luteum of pseudopregnancy and pregnancy in rabbits. *Biol Reprod* 1990; **42**: 367–376.
- [6] BAZAN JF. Emerging families of cytokines and receptors. *Curr Biol* 1993; **3**: 603–606.
- [7] BENYO DF, PATE JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992; **130**: 854–860.
- [8] BEUTLER B, HAN J, KRUYIS V, GIROIR BP. Coordinate regulation of TNF biosynthesis at the levels of transcription and translation. [w] Beutler B, red. *Tumor Necrosis Factors: The Molecules and Their Emerging Role in Medicine*. New York: Raven Press 1992: 561–574.
- [9] BEUTLER B, van HUFFEL C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994; **264**: 667–668.
- [10] BRANNSTROM M, WANG L, NORMAN R. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. *Biol Reprod* 1993; **48**: 165–171.
- [11] BRAW R, TSAFRIRI A. Follicles explanted from phenobarbitone-treated rats provide a model for atresia. *J Reprod Fertil* 1980; **59**: 259–268.
- [12] BUTCHER RL, COLLINS WE, FUGONW. Altered secretion of gonadotrophins and steroids resulting from delayed ovulation in the rat. *Endocrinology* 1975; **96**: 576–586.
- [13] BUTCHER RL, POPE RS. Role of estrogen during prolonged estrous cycles of the rat on subsequent embryonic death or development. *Biol Reprod* 1979; **21**: 491–495.

- [14] CAMERINI D, WALZ G, LOENEN WAM, BORST J, SEED B. The T cell activation antigen CD27 is a member of the NGF/TNF receptor gene family. *J Immunol* 1991; **147**: 3165–3169.
- [15] CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666–3670.
- [16] CASEY ML, COX SM, BEUTLER B, MILEWICH L, MacDONALD PC. Cachectin/tumor necrosis factor- $\alpha$  formation in human decidua. *J Clin Invest* 1989; **83**: 430–436.
- [17] CHEN H-L, YANG Y, HU X-L, YELAVARTHI KK, FISHBACK JL, HUNT JS. Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol* 1991; **139**: 327–335.
- [18] CHEN H-L, MARCINKIEWICZ JL, SANCHO-TELLO M, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol Reprod* 1993; **48**: 707–714.
- [19] CLARK DA, BANWATT D, CHAOUAT G. Effect of prostaglandin synthesis inhibitors on spontaneous and endotoxin-induced abortion in mice. *J Reprod Immunol* 1993; **24**: 29–44.
- [20] CLINTON TK, ROBY KF, LYLES R, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor alpha and prolactin increase hCG binding in human granulosa cells: Differential interaction with hCG-stimulated progesterone secretion. [w] Gibri G, red. *Signaling Mechanisms and Gene Expression in the Ovary*. New York: Springer-Verlag 1991: 459–466.
- [21] DALTON DK, PITTS-MEEK S, KESHAV S, FIGARI IS, BRADLEY A, STEWART T A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. *Science* 1993; **259**: 1739–1742.
- [22] DARBON JM, OURY F, LAREDO J, BAYARD F. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **163**: 1038–1046.
- [23] DE KOSSODO S, GRAU G, DANEVA T, POINTAIRE P, FOSATI L, ODY C, ZAPF J, PIGUET PF, GALLARD R, VASSALLI P. Tumor necrosis factor  $\alpha$  is involved in mouse growth and lymphoid tissue development. *J Exp Med* 1992; **176**: 1259–1264.
- [24] DOHERTY G, JENSEN J, ALEXANDER H, BURESH C, NORTON J. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 1991; **110**: 192–198.
- [25] EMOTO N, BAIRD A. The effect of tumor necrosis factor/cachectin on follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **153**: 792–798.
- [26] FARRAH T, SMITH CA. Emerging cytokine family. *Nature* 1992; 358:26.
- [27] FERNANDEZ-BOTRAN R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *FASEB J* 1991; **5**: 2567–2574.
- [28] FUKUOKA M, YASUDA K, FUJIWARA H, KAZAKI H, MORI T. Interactions between interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Human Reprod* 1992; **7**: 1361–1364.
- [29] GIROIR P, PEPPEL K, SILVA M, BEUTLER B. The biosynthesis of tumor necrosis factor during pregnancy: Studies with a CAT reporter transgene and TNF inhibitors. *Eur Cytokine Net* 1992; **3**: 533–537.
- [30] HALMEJ, HAMMOND MG, SYROPCH, TALBERT LM. Peritoneal macrophages modulate human granulosa-luteal cell progesterone production. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; **61**: 912–916.
- [31] HIGUCHI M, AGGARWALL BB. TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol* 1994; **152**: 3550–3558.
- [32] HILLENSJO T, MAGNUSSON C, SVENSSON U, THELANDER H. Effect of LH and FSH on steroid synthesis by cultured rat cumulus cells. [w] Schwartz N, Hunzicker-Dunn M, red. *Dynamics of Ovarian Function*. New York: Raven Press 1981: 105–110.

- [33] HUNT JS, ATHERTON RA, PACE JL. Differential responses of rat trophoblast cells and embryonic fibroblasts to cytokines that regulate proliferation and class I MHC antigen expression. *J Immunol* 1990; **145**: 184–189.
- [34] HUNT JS, CHEN H-L, HU X-L, TABIBZADEH S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid and protein in human endometrium. *Biol Reprod* 1992; **47**: 141–147.
- [35] HUNT JS, POLLARD J. Macrophages in the uterus and placenta. [w] Gordon S, Russel S, red. *Current Topics in Microbiology and Immunology: Macrophages and Macrophage Activation*. New York: Springer-Verlag 1992; 39–63.
- [36] HUNT JS. Expression and regulation of the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene in the female reproductive tract. *Reprod Fertil Devel* 1993; **5**: 141–153.
- [37] HUNT JS, CHEN H-L, HU X-L, POLLARD JW. Normal distribution of tumor necrosis factor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid and protein in virgin and pregnant osteopetrotic (op/op) mice lacking colony-stimulating factor-1. *Biol Reprod* 1993; **49**: 441–452.
- [38] JI I, SLAUGHTER RG, ELLIS JA, JI TH, MURDOCH WJ. Analyses of bovine *corpora lutea* for tumor necrosis factor mRNA and bioactivity during prostaglandin-induced luteolysis. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **81**: 77–80.
- [39] KOHCHI C, MIZUNO D-I, SOMA G-I. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$  transcripts in embryonal carcinoma and trophoblast cell lines: Inflammation-like state as possible regulatory mechanism for ontogenesis. *Eur Cytokine Net* 1991; **2**: 245–255.
- [40] KOHCHI C, NOGUCHI K, TANABE Y, MIZUNO D-I, SOMA G-I. Constitutive expression of the TNF- $\alpha$  and - $\beta$  genes in mouse embryo: Roles of cytokines as regulator and effector on development. *Int J Biochem* 1994; **26**: 111–119.
- [41] LI Y, MATSUZAKI N, MASUHIRO K, KAMEDA T, TANIGUCHI T, SAJI F, YONE K, TANIZAWA O. Trophoblast-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  induces release of human chorionic gonadotrophin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor-dependent system in the normal trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992; **74**: 184–191.
- [42] LIN H, MOSMANN TR, GUILBERT L, TUNTIPOPIPAT S, WEGMAN T. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 1993; **151**: 4562–4573.
- [43] LOY R, LOUKIDES J, POLAN M. Ovarian steroids modulate human monocyte tumor necrosis factor alpha messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *Fertil Steril* 1992; **58**: 733–740.
- [44] MARCINKIEWICZ J, KRISHNA A, CHEUNG C, TERRANOVA P. Oocytic tumor necrosis factor alpha: Localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 1994; **50**: 1251–1260.
- [45] MITCHELL M, TRAUTMAN M, DUDLEY D. Cytokine networking in placenta. *Placenta* 1993; **14**: 249–275.
- [46] MUTCH DG, MASSAD LS, KAO MS, COLLINS JL. Proliferative and antiproliferative effects of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on cell lines derived from cervical and ovarian malignancies. *Am J Obstet Gynecol* 1990; **163**: 1920–1924.
- [47] MUTCH DG, POWELL CB, KAO MS, COLLINS JL. Resistance to cytolysis by tumor necrosis factor- $\alpha$  in malignant gynecological cells is associated with the expression of phospholipase A2 by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cancer Res* 1992; **52**: 866–872.
- [48] NISWENDER GD, NETT TM. The corpus luteum and its control. [w] Knobil E, Neill JD, red. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press 1988: 489–525.
- [49] PAMPFER S, WUU YD, VAN DER HEYDEN I, DE HERTOIGH R. Expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) receptors and selective effect of TNF alpha on the inner cell mass in mouse blastocysts. *Endocrinology* 1993; **134**: 206–212.
- [50] PFEFFER K, MATSUYAMA T, KUNDIG TM, WAKEMAN A, KISHIHARA K, SHAHINLAN A, WIEGMANN K, OHASHI PS, KRONKE M, MAK TW. Mice deficient for the 55kD tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 1993; **73**: 457–467.

- [51] PITZEL L, JARRY H, WUTTKE W. Effects and interactions of prostaglandin F2 $\alpha$ , oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells. *Endocrinology* 1993; **132**: 751–756.
- [52] RICHARDS J. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicle cell differentiation. *Physiol Rev* 1980; **60**: 51–89.
- [53] ROBY KF, TERRANOVA PF. Localization of tumor necrosis factor (TNF) in rat and bovine ovary using immunocytochemistry and cell blot: Evidence for granulosa production. [w] Hirshfeld AN, red. *Growth Factors and the Ovary*. New York: Plenum Press 1989: 273–278.
- [54] ROBY KF, TERRANOVA PF. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  *in vivo* on steroidogenesis of healthy and atretic follicles of the rat: theca as a target. *Endocrinology* 1990; **126**: 2711–2718.
- [55] ROBY KF, WEED J, LYLES R, TERRANOVA PF. Immunological evidence for a human tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Clin Endocrinol Metab* 1990; **71**: 1096–1102.
- [56] ROBY KF, HAMLIN GP, SOARES MJ, HUNT JS. Responses of phenotypically distinct rat trophoblast cell lines to MHC class I-inducing cytokines. *Placenta* 1994; **15**: 577–590.
- [57] ROBY KF, HUNT JS. Mouse endometrial tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein: Localization and regulation by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1994; **135**: 2780–2789.
- [58] ROBERTSON S, BRANNSTROM M, SEMARK R. Cytokines in rodent reproduction and the cytokine-endocrine interaction. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 585–590.
- [59] ROMERO R, MANOGUE K, MITCHELL M, WU Y, OYARZUN E, HOBBS J, CERAMI A. Infection and labor. IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; **161**: 336–341.
- [60] RUTHERFORD M, SCHOOK L. Differential immunocompetence of macrophages derived using macrophage or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Leukocyte Biol* 1992; **51**: 69–76.
- [61] SANCHO-TELLO M, CHEN T-Y, CLINTON TK, LYLES R, MORENO RF, TILZER L, IMAKAWA K, TERRANOVA PF. Evidence for lipopolysaccharide binding in human granulosa-luteal cells. *J Endocr* 1992; **135**: 571–578.
- [62] SANCHO-TELLO M, TASH JS, ROBY KF, TERRANOVA PF. Effects of lipopolysaccharide on ovarian function in the pregnant mare serum gonadotrophin-treated immature rat. *Endocrine J* 1993; **1**: 503–512.
- [63] SHAKIL T, WHITEHEAD S. Inhibitory action of peritoneal macrophages on progesterone secretion from co-cultured rat granulosa cell. *Biol Reprod* 1994; **50**: 1183–1189.
- [64] SUDA T, TAKAHASHI T, GOLDSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; **75**: 1169–1178.
- [65] TABIBZADEH S, KONG QF, SUN XZ. Regulatory roles of TNF- $\alpha$  on transepithelial migration of leukocytes and epithelial dyscohesion. *Endocrine J* 1993; **1**: 417–425.
- [66] TARTAGLIA L, WEBER R, FIGARI I, REYNOLDS C, PALLADINO M, GOEDEL D. Two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 9292–9296.
- [67] TARTAGLIA L, GOEDEL D. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; **13**: 151–153.
- [68] TARTAKOVSKY B, BEN-YAIR E. Cytokines modulate preimplantation development and pregnancy. *Devel Biol* 1991; **146**: 345–352.
- [69] TEKPETY F, ENGELHARDT H, ARMSTRONG D. Differential modulation of porcine theca, granulosa, and luteal cell steroidogenesis *in vitro* by tumor necrosis factor. *Biol Reprod* 1993; **48**: 936–943.
- [70] TERLIKOWSKI S, NOWAK HF, POŁUDNIEWSKI G, ARCIUCHE, ŁOTOCKI W. Zmiany morfologiczne w łożyskach królic ciężarnych po zastosowaniu cytokiny HrecTNF- $\alpha$ . [w] Słomko Z, red. *Materiały I Kongresu Polskiego Towarzystwa Medycyny Perinatalnej*. Poznań: PAN 1995: 1010–1013.

- [71] TERRANOVA PF, ROBY KF, SANCHO-TELLO M, WEED J, LYLES R. Tumor necrosis factor alpha: Localization and actions within the preovulatory follicle. [w] Schomberg D, red. Growth Factors in Reproduction. New York: Springer-Verlag 1991: 63–78.
- [72] TERRANOVA PF, ROBY KF, SANCHO-TELLO M, WEED J, LYLES R. Tumor necrosis factor alters thecal and granulosa steroidogenesis. [w] Gibori G, red. Signalling Mechanisms and Gene Expression in the Ovary. New York: Springer-Verlag 1991: 178–189.
- [73] VASSALI P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; **10**: 411–452.
- [74] VELDHUIS JD, GARMY JC, URBAN RJ, DEMERS LM, AGGARWALL BB. Ovarian actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ): Pleiotropic effects of TNF- $\alpha$  on differentiated functions of untransformed swine granulosa cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 641–648.
- [75] VINCE G, SHORTER S, STARKEY P, HUMPHREYS J, CLOVER L, WILKINS T, SARGENT I, REDMAN C. Localization of tumor necrosis factor production in cells at the materno/fetal interface in human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1992; **88**: 174–180.
- [76] VOOGT J, SAR M, MEITES J. Influence of cycling, pregnancy, labor, and suckling on corticosterone and ACTH levels. *Am J Physiol* 1969; **216**: 655–658.
- [77] WANG LJ, BRANNSTROM M, ROBERTSON SA, NORMAN RJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in the human ovary: Presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandin production. *Fertil Steril* 1992; **58**: 934–940.
- [78] WANG HZ, SHENG WX, LU SH, SUN ZD, HAN XJ, GONG YT, ZHOU W. Inhibitory effect of interferon and tumor necrosis factor on human luteal function *in vitro*. *Fertil Steril* 1992; **58**: 941–945.
- [79] WANIDWORANUN C, STROBER W. Predominant role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human monocyte IL-10 synthesis. *J Immunol* 1993; **151**: 6853–6861.
- [80] WU S, BOYER CM, WHITAKER RS, BERCHUCK A, WIENER JR, WEINBERG JB, BAST RC. Tumor necrosis factor- $\alpha$  as autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression. *Cancer Res* 1993; **53**: 1939–1944.
- [81] YAN Z, HUNTER V, WEED J, HUTCHISON S, LYLES R, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells *in vitro*. *Fertil Steril* 1993; **53**: 332–338.
- [82] YANG Y, YELAVARTHI KK, CHEN H-L, PACE JL, TERRANOVA PF, HUNT JS. Molecular, biochemical and functional characteristics of tumor necrosis factor- $\alpha$  produced by human placental cytotrophoblastic cells. *J Immunol* 1993; **150**: 5614–5624.
- [83] YELAVARTHI KK, CHEN H-L, YANG Y, FISHBACK JL, COWLEY B, HUNT JS. Tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein in rat uterine and placental cells. *J Immunol* 1991; **146**: 3840–3848.
- [84] YELAVARTHI KK, HUNT JS. Analysis of p60 and p80 tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and protein in human placentas. *Am J Pathol* 1993; **143**: 1131–1141.
- [85] ZACHOW RJ, TASH JS, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces clustering in ovarian theca-interstitial cells *in vitro*. *Endocrinology* 1992; **131**: 2503–2513.
- [86] ZACHOW RJ, TERRANOVA PF. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase pathways in tumor necrosis factor- $\alpha$  induced clustering of ovarian theca-interstitial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; **97**: 37–49.
- [87] ZACHOW RJ, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  modulates luteinizing hormone-directed cytochrome P45017 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20 lyase in ovarian theca-interstitial cells *in vitro*. *Endocrine J* 1994; **2**: 625–631.
- [88] ZACHOW RJ, TERRANOVA PF. The effects of tumor necrosis factor-alpha on luteinizing hormone (LH) -/insulin-like growth factor-1 (IGF-1)/- regulated androstendione biosynthesis and IGF-1 directed LH receptor number in cultured ovarian theca-interstitial cells. *Endocrine J* 1994; **2**: 1145–1150.

- [89] ZOLTI M, BEN-RAFAEL Z, MEIROM R, SHEMESH M, BIDER D, MASHIACH S, APTE RN. Cytokine involvement in oocytes and early embryos. *Fertil Steril* 1991; **56**: 265–272.
- [90] ZOLTI M, MEIROM R, SHEMESH M, WOLLACH D, MASHIACH S, SHORE L, BEN-RAFAEL Z. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FEBS Lett* 1990; **261**: 253–255.

*Redaktor prowadzący: Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 22.03. 1996 r.*

*Przyjęto: 30.06. 1997 r.*

*Adres autorów: Klinika Ginekologii i Położnictwa Septycznego*

*Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych Akademii Medycznej w Białymstoku*

*15-062 Białystok, ul. Warszawska 15*

## MOLEKULARNA BUDOWA BŁONY TYLAKOIDOWEJ

### MOLECULAR STRUCTURE OF THYLAKOID MEMBRANE

Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* Tylakoidy są miejscem realizacji wszystkich etapów fazy jasnej fotosyntezy, tzn. absorpcji energii świetlnej, transportu energii wzbudzenia elektronowego, rozdziału ładunku, transportu elektronów i syntezy ATP. Błona tylakoidowa jest zbudowana w sposób wysoce asymetryczny – asymetrię tę determinuje zarówno specyficzna topografia składników błonowych kompleksów funkcjonalnych na przekroju poprzecznym błony, jak i nierównomierna dystrybucja lateralna tych kompleksów w obrębie poszczególnych kompartmentów błony (błony zespolone gran, błony brzegów gran, błony końcowe gran, błony tylakoidowe stromy). W niniejszym opracowaniu zebrano dane dotyczące organizacji strukturalnej fotosystemu II (PSII), fotosystemu I (PSI), kompleksu cytochrom *b6/f* (cyt *b6/f*) i syntazy ATP oraz rozmieszczenia tych kompleksów w obrębie poszczególnych kompartmentów błony tylakoidowej. Dyskutowane są również implikacje funkcjonalne architektury błony tylakoidowej.

*Słowa kluczowe:* PSII, PSI, kompleks cytochrom *b6/f*, syntaza ATP, błona tylakoidowa granum, błona tylakoidowa stromy, strukturalna i funkcjonalna heterogeniczność fotosystemów, polipeptyd

*Summary:* All functions of photosynthetic light reactions i.e. the interception of visible light energy, the migration of excitation energy, charge separation, electron transfer, proton translocation and photophosphorylation operate within the thylakoid. The fundamental feature of the organization of thylakoid membrane is its asymmetry determined by the unique topology of components of membrane intrinsic protein complexes as well as a lateral heterogeneity in the distribution of the complexes. The data regarding the structural organization of PSII, PSI, cytochrom *b6/f* and ATP synthase and their distribution among thylakoid membrane compartments (appressed grana membranes, grana margins, grana end membranes, stroma lamellae) is summarized below. The functional aspects of architecture of photosynthetic membrane are also discussed.

*Key words:* PSII, PSI, cytochrom *b6/f*, ATP synthase, grana lamella, stroma lamella, structural and functional heterogeneity of photosystems, polypeptide

## WSTĘP

Zrozumienie molekularnych mechanizmów fotosyntetycznej konwersji energii wymaga dysponowania precyzyjną wiedzą na temat „anatomii cząsteczkowej” błony tylakoidowej. Tajemnica molekularnej logiki absorpcji światła, transportu energii wzbudzenia elektronowego, transportu elektronów i translokacji protonów tkwi bowiem w specyficznej organizacji strukturalnej i dystrybucji w obrębie systemu błon tylakoidowych wieloskładnikowych, supramolekularnych kompleksów białkowych i białkowo-barwnikowych. W latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych zaproponowano kilka modeli organizacji strukturalnej systemu błon tylakoidowych, modele te jednak mają dziś tylko historyczne znaczenie. Punktem zwrotnym w historii kształtowania się nowoczesnych poglądów dotyczących organizacji strukturalnej błony fotosyntetycznej stało się stworzenie modelu płynnej mozaiki struktury błon biologicznych [62], wkrótce po jego opublikowaniu pojawiły się bowiem inspirowane tym modelem próby wyjaśnienia architektury błony tylakoidowej [6]. Współcześnie model ten stanowi nie kwestionowaną przez nikogo podstawę wszelkich rozważań dotyczących struktury błony fotosyntetycznej. Dziś wiadomo, że błona tylakoidowa jest zbudowana w sposób wysoce asymetryczny. Asymetria przejawia się zarówno w rozmieszczeniu cząsteczek białek i lipidów na przekroju poprzecznym błony, jak i w heterogeniczności dystrybucji składników biochemicznych wzdłuż błony. Heterogeniczność rozmieszczenia składników błony tylakoidowej obserwowana na jej przekroju poprzecznym determinuje podstawowe mechanizmy funkcjonowania fazy jasnej fotosyntezy, natomiast heterogeniczność „wzdłużna” ma zasadnicze znaczenie dla zdolności aparatu fotosyntetycznego do adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Ostatnie lata przyniosły lawinowy przyrost danych odnoszących się do organizacji strukturalnej supramolekularnych kompleksów funkcjonalnych błony tylakoidowej oraz ich dystrybucji w obrębie systemu błon pojedynczego chloroplastu. Przedmiotem niniejszej opracowania jest przegląd tych dokonań z uwzględnieniem ich implikacji funkcjonalnych.

## 1. ORGANIZACJA STRUKTURALNA BŁONY TYLAKOIDOWEJ NA PRZEKROJU POPRZECZNYM

### 1.1. Asymetria rozmieszczenia lipidów na przekroju poprzecznym błony tylakoidowej

Lipidy acylowe stanowią 25–35% masy błony tylakoidowej roślin wyższych. Tak niska zawartość tłuszczowców nieco upodabnia błony tylakoidowe do innych wielofunkcyjnych błon biologicznych zaangażowanych w procesy konwersji energii,



np. do wewnętrznej błony mitochondrialnej, jednak skład lipidów błon fotosyntetycznych jest zasadniczo odmienny od tego, który stwierdza się dla innych eukariotycznych systemów błonowych [52]. Odmienność ta polega głównie na wyjątkowo wysokiej zawartości galaktolipidów, nietypowy jest ponadto fakt, że fosfatydyloglicerol zawiera specyficzny dla chloroplastów kwas tłuszczowy, trans- $\Delta^3$ -heksadekenowy. Liczne dane wskazują na asymetrię rozmieszczenia lipidów acylowych na przekroju poprzecznym błony fotosyntetycznej – na ogół uważa się, że fosfatydyloglicerol i monogalaktozyliodiacylloglicerol przeważają w tej jej części, która jest zorientowana w stronę stromy, natomiast digalaktozyliodiacylloglicerol i sulfochinowozylodiacylloglicerol są skupione w błonie od strony światła tylakoidu [62].

## 1.2. Funkcjonalne kompleksy białkowe i białkowo-barwnikowe

Przytłaczająca większość białek błony tylakoidowej wchodzi w skład czterech kompleksów o charakterze transmembranowym – PSI, PSII, cyt $b_6/f$  i syntaza ATP; dwa spośród nich (PSI i PSII) mają charakter barwnikowo-białkowy. Współdziałanie tych kompleksów, uwarunkowane ich rozmieszczeniem w obrębie pojedynczej błony i systemu błon, umożliwia realizację wszystkich etapów fazy jasnej fotosyntezy, tzn. zbierania energii świetlnej, rozdziału ładunku, transportu elektronów, generowania transmembranowego gradientu protonów i syntezy ATP. U organizmów przeprowadzających fotosyntezę oksygeniczną (glony, cyjanobakterie, rośliny wyższe) fotosyntetyczny transport elektronów angażuje trzy kompleksy błony tylakoidowej – PSII, cyt $b_6/f$  i PSI - które kooperatywnie przenoszą elektrony na trasie woda – NADP<sup>+</sup>.

**PSII.** Indywidualnym zadaniem PSII, w ramach „podziału pracy” pomiędzy wspomnianymi kompleksami funkcjonalnymi, jest przeprowadzenie zależnego od światła, liniowego transportu elektronów od wody do plastochinonu, co wiąże się z utlenieniem wody do cząsteczkowego tlenu. W skład PSII roślin wyższych wchodzi ponad 25 polipeptydów [17, 40]. Co najmniej 11 spośród nich, a mianowicie produkty genów *psbA-F*, *psbI*, *psbL* oraz *psbO-Q*, wchodzi w skład kompleksu centrum reakcji (kcr) PSII, fragmentu holokompleksu niezbędnego do utlenienia wody i redukcji plastochinonu [17, 42]. *In vitro* zdolność do utleniania wody i redukcji plastochinonu wykazują, poza kompleksem kcr PSII, także preparaty rdzenia PSII, cząstki powstałej przez oddysocjowanie od kompleksu centrum reakcji polipeptydów *psbP* i *psbQ*. Aktywność *in vitro* cząstek rdzenia można jednak zademonstrować tylko w obecności нефизjologicznie wysokich stężeń Ca<sup>2+</sup> i Cl<sup>-</sup>, co stanowi podstawę do sugestii, że *in vivo* *psbP* i *psbQ* są niezbędne do realizacji podstawowych zadań PSII [60]. Pierwotne procesy fotochemiczne warunkujące utlenienie wody i redukcję plastochinonu zachodzą w obrębie jeszcze mniejszego elementu struktury PSII, jakim jest rdzeniowy zespół 5–6 polipeptydów, tzn. *psbA*, *D,E*, *F*, *I*, *L* (?), z którymi

związane są liczne niebiałkowe ligandy, bezpośrednio uczestniczące w reakcjach oksydoredukcyjnych.

Fotochemicznym donorem PSII jest wyspecjalizowany dimer cząsteczek chlorofilu *a*, określony jako P680, związany pomiędzy dwoma resztami histydynowymi polipeptydów psbA i psbD [49]. Wzbudzona cząsteczka P680 redukuje feofitynę *a*, zasocjowaną także z heterodimerem psbA/psbD, a to prowadzi do transmembranowego rozdziału ładunku, tzn. uformowania się pary  $P680^+/feofityna^-$ . Z kolei elektrony są transportowane przez cząsteczki plastochinonu ( $Q_A$  i  $Q_B$ ) związane z domenami A i B heterodimeru psbA (domena B) i psbD (domena A). Po przejęciu dwóch elektronów i protonacji protonami pochodzącymi ze stromy zredukowany  $Q_B$  dyfunduje do dwuwarstwy lipidowej – dalsze losy tego przenośnika redoks wiąże się już z funkcjonowaniem kompleksu cytb6/f.

Utleniony donor fotochemiczny,  $P680^+$ , jest redukowany elektronami pochodzącymi z wody. Utlenienie wody jest możliwe dzięki wyjątkowo wysokiemu potencjałowi oksydoredukcyjnemu  $P680^+$  (1.17 kV) [10]. Elektrony z wody są przenoszone na  $P680^+$  za pośrednictwem aktywnej reszty Tyr polipeptydu psbA.

Energia niezbędna do realizacji fotosyntetycznego transportu elektronów jest przekazywana do P680 w formie energii wzbudzenia elektronowego przez zespół sąsiadujących z P680 w obrębie struktury PSII anten energetycznych, kompleksów, jakie tworzy chlorofil *a* z białkami psbB (CP47) i psbC (CP43) [14]. Kompleksy te, stanowiące integralny element struktury kompleksu centrum reakcji PSII osiągają stan wzbudzenia elektronowego – transportowany do P680 – przez absorpcję energii promienistej światła słonecznego w zakresie widzialnym, pełnią zatem funkcję anten energetycznych fotosyntezy. Ze względu na lokalizację w bezpośredniej bliskości P680, stanowiącego najbardziej centralny punkt struktury PSII, CP47 i CP43 nazywa się wewnętrznymi antenami energetycznymi PSII. Bardziej peryferycznie ulokowany jest natomiast zespół anten energetycznych, których polipeptydy są związane z obydwojema rodzajami chlorofilu oraz ksantofilami, tzw. kompleksy chlorofil *a/b*-białko. Ich obecność w PSII znacznie zwiększa „przekrój optyczny” fotosystemu i wzbogaca jego widmo czynnościowe [49], jednak aparat fotosyntetyczny pozbawiony tych struktur w rezultacie np. mutacji może funkcjonować absorbując i przenosząc energię tylko z wykorzystaniem anten wewnętrznych [31, 33, 34]. Jak dotąd zidentyfikowano przynajmniej cztery kompleksy chlorofil *a/b*-białko PSII – LHClI, CP29, CP26, CP24 – różniące się składem biochemicznym, organizacją strukturalną a także realizujących nieidentyczne funkcje w procesie zbierania światła [37, 39].

Zdecydowana większość polipeptydów wchodzących w skład PSII to integralne składniki błony tylakoidowej, przenikające błonę kilkoma hydrofobowymi odcinkami przyjmującymi konformację  $\alpha$ -helisy. Pozostałą część struktury tych polipeptydów stanowią odcinki hydrofilne, penetrujące strömę lub światło tylakoidu. Topografia pojedynczych łańcuchów polipeptydowych białek transmembranowych charakteryzuje się silną asymetrią, wyrażającą się niejednakową długością hydrofilnego

odcinka penetrującego stromę i odcinka zanurzonego w świetle tylakoidu, np. w przypadku polipeptydów psbA i psbD na odcinek penetrujący stromę przypada 25%, a na odcinek penetrujący światło tylakoidu 40% wszystkich aminokwasów łańcucha [17]. Jeszcze bardziej asymetrycznie są zorientowane na przekroju błony tylakoidowej łańcuchy polipeptydów psbB i psbC, aż połowa budujących je aminokwasów składa się na fragmenty cząsteczki zanurzone w świetle tylakoidu podczas gdy stromę penetruje nie więcej niż 15% aminokwasów [14].

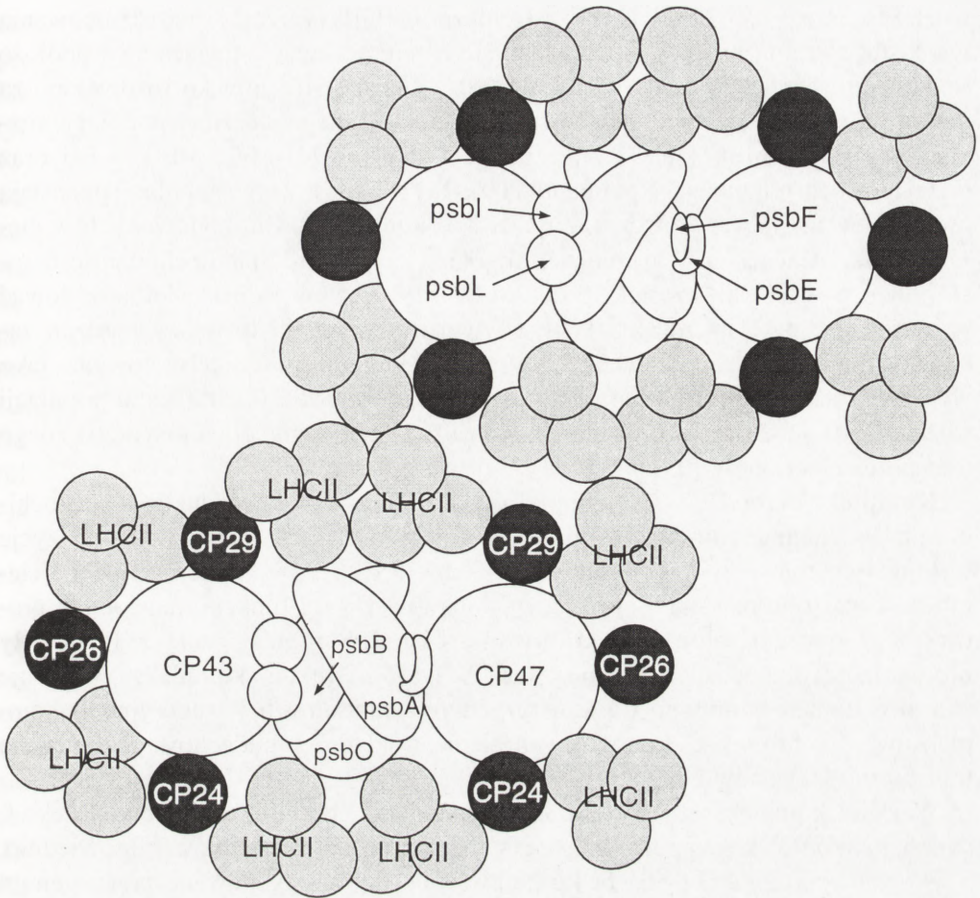
W przypadku LHCP<sub>II</sub>, polipeptydu głównej anteny energetycznej PSII (LHCII) na odcinek zanurzony w stromie przypada 34%, a na fragment zanurzony w świetle tylakoidu 27% całkowitej puli aminokwasów [46, 47], jednak głębokość zanurzenia tego pierwszego odcinka w stromie jest ponad 10 razy większa niż głębokość zanurzenia drugiego odcinka w świetle tylakoidu [48].

Tylko trzy polipeptydy PSII – psbO, psbP i psbQ – nie są integralnymi składnikami błony tylakoidowej. Są to polipeptydy peryferyczne, zlokalizowane w świetle tylakoidu, lecz – jak to udowodniono między innymi w doświadczeniach typu *cross-linking* – związane oddziaływaniami niekowalencyjnymi z transmembranowymi białkami PSII [60].

Przedmiotem bardzo żywego zainteresowania wielu laboratoriów jest kwestia stanu oligomerycznego PSII oraz stosunków stechiometrycznych poszczególnych polipeptydów *in situ*. Uzyskanie tych informacji, w połączeniu z danymi dotyczącymi przestrzennego rozmieszczenia poszczególnych komponentów pozwoliło bowiem na zaproponowanie modelu organizacji strukturalnej holokompleksu PSII. W ciągu ostatnich lat w kilku pracowniach udało się uzyskać kryształy rdzenia PSII; ich analiza przeprowadzona z wykorzystaniem techniki kriomikroskopii elektronowej, pozwoliła na ujawnienie dimerycznej natury badanego fragmentu PSII [50, 58, 65]. Dimeryczny charakter rdzenia PSII potwierdzają także badania prowadzone w pracowni Barbera z użyciem techniki wspomaganą komputerowo analizy elektronomikroskopowych obrazów preparatów rdzenia barwionych negatywowo [12]. Z wynikami tymi polemizuje zespół Forda [35, 53], który uważa, że rdzeń PSII jest *in vivo* monomerem, podczas gdy obserwowane w innych pracowniach formy dimeryczne mogą być rezultatem mającej charakter artefaktu oligomeryzacji PSII, do której dochodzi w trakcie działania detergentów używanych podczas preparatyki rdzenia. Wydaje się, że polemikę tę rozstrzygają ostatecznie na korzyść koncepcji „dimerycznej” opublikowane w ostatnich miesiącach wyniki badań, w trakcie których preparaty rdzenia PSII upłynniano za pomocą n-dodecylo- $\beta$ -D-maltozydu i frakcjonowano na formę mono- i dimeryczną z użyciem ultrawirowania w gradiencie gęstości sacharozy [29]. Forma dimeryczna wykazywała *in vitro* niemal dwukrotnie wyższą aktywność utleniania wody, a ponadto zawierała bardzo niewielkie ilości produktów degradacji białek psbA i psbD, podczas gdy w preparatach formy monomerycznej stwierdzono znaczną akumulację tych produktów. Dane te wskazują dość jednoznacznie na dimer jako natywną formę rdzenia PSII, sugerując zarazem, że

monomer jest częściowo zdenaturowanym artefaktem tego fragmentu struktury PSII. Zdecydowana większość danych biochemicznych wskazuje, że wszystkie polipeptydy rdzenia PSII są reprezentowane przez ilości ekwimolarne – po dwie kopie na dimer [60]. Z dimerycznym rdzeniem PSII są związane także po dwie kopie polipeptydów pspP i pspQ, a to oznacza, że *in vivo* dimeryczny jest cały kompleks centrum reakcji PSII.

Badania dwuwymiarowych kryształów LHCII z zastosowaniem kriomikroskopii elektronowej [46], a także prace prowadzone technikami biochemicznymi [38], jednoznacznie wskazują, że podstawową jednostką organizacji najważniejszego kompleksu chlorofil *a/b*-białko PSII jest trimer, jakkolwiek jest prawdopodobne, że część trimerów tworzy także struktury wyższego rzędu, prawdopodobnie multitrimery [38]. Pozostałe kompleksy chlorofil *a/b*-białko (CP29, CP26, CP24) przyjmują *in vivo* formę monomeryczną, na co wskazuje analiza zachowania się tych struktur w trakcie ich frakcjonowania z użyciem łagodnie denaturujących systemów elektroforetycznych [54], jak i analiza elektronomikroskopowa negatywno wybarwionych preparatów PSII [35]. Wyniki oznaczeń biochemicznych wskazują na to, że dimer kcr PSII jest zasocjowany z ośmioma trimerami LHCII oraz dwoma kopiami każdego z monomerycznych kompleksów chlorofil *a/b*-białko [31, 54]. Ostatnio Hankamer i inni [29] zasugerowali, jakoby dimeryczna forma kcr PSII pozostawała zasocjowana tylko z jednym trimerem LHCII oraz pojedynczymi cząstkami CP29 i CP26 w formie tzw. superkompleksu PSII, jednak pogląd ten jest zupełnie odosobniony. Tak więc, na podstawie bogatego materiału dowodowego uzyskanego z zastosowaniem szerokiej palety technik eksperymentalnych, można uważać za wysoce prawdopodobne, że holokompleks PSII jest cząstką, na którą składa się dimer kcr, osiem trimerycznych subkompleksów LHCII oraz pojedyncze monomery CP29, CP26 i CP24 (rys. 1). Wiadomo jednak, że PSII jest strukturą o znacznym stopniu heterogeniczności strukturalnej i funkcjonalnej – przedstawiony na rysunku 1 schemat dotyczy najobficiej reprezentowanego w systemie błon tylakoidowych wariantu, określanego jako PSII $\alpha$ . Jednym ze źródeł heterogeniczności strukturalnej PSII jest zróżnicowanie wielkości LHCII, tzn. ilości trimerycznych subkompleksów zasocjowanych z kcr. Część populacji cząstek PSII, określana jako PSII $\beta$ , zawiera mniejszą niż osiem liczbę trimerów LHCII, a mianowicie tylko te trimery, które zajmują najbardziej proksymalne położenie w stosunku do kcr, składające się na subpopulację wewnętrzną LHCII (dystalne trimery, w PSII $\alpha$ , składają się na subpopulację peryferyczną LHCII). Nie wiadomo jednak dokładnie, jaka ilość trimerycznych subkompleksów LHCII wchodzi w skład PSII $\beta$ , wydaje się, że może to być cecha gatunkowa. Część cząstek PSII $\beta$ , określaną jako non-Q<sub>B</sub>-PSII, jest niezdolna do redukcji plastochinonu jakkolwiek cząstki takie mogą *in vivo* redukować niektóre halogenowane benzochinony. Istnienie różniących się funkcjonalnie wariantów PSII $\beta$  może odzwierciedlać jakieś zróżnicowanie strukturalne tej populacji PSII, jednak dotąd nie wyjaśniono, z jakim zróżnicowaniem strukturalnym



Rys. 1. Schemat organizacji strukturalnej PSII, na rysunku pominięto szereg słabiej scharakteryzowanych komponentów polipeptydowych PSII

mamy do czynienia [66]. Heterogeniczność PSII pogłębia wewnętrzne zróżnicowanie cząstek PSII $\alpha$ , wynikające z tego, że kompleks ten może pozostawać związany z co najmniej trzema kategoriami LHCII (PSII $\alpha_1$ , PSII $\alpha_2$ , PSII $\alpha_3$ ) o niejednakowej liczbie trimerów składających się na subpopulację peryferyczną [2]. Liczba trimerycznych subkompleksów LHCII zasocjowanych z PSII podlega także modyfikacji w trakcie długoterminowych adaptacji aparatu fotosyntetycznego do warunków środowiskowych, takich jak natężenie światła – im wyższe natężenie światła, na które ekspozycja jest roślina, tym mniejsza liczba trimerów LHCII, co jest równoznaczne ze zmniejszaniem się „przekroju optycznego” PSII. W chloroplastach zielenicy *Dunaliella salina* poddanych działaniu światła o bardzo wysokim natężeniu stwierdzono istnienie jeszcze jednego wariantu PSII (PSII $\gamma$ ), w którym zmniejszenie „przekroju optycznego” nastąpiło przez odłączenie peryferycznej subpopulacji LHCII oraz we-

wewnętrznej anteny CP47 [32]. Na heterogeniczność PSII wynikającą ze zróżnicowania wielkości systemu antenowego nakłada się heterogeniczność mająca swe podłoże w istnieniu różnych wariantów rdzenia PSII. Rdzeń PSII szpinaku rozdzielano za pomocą niedenaturującego ogniskowania izoelektrycznego na cztery populacje różniące się stopniem ufosforylowania polipeptydów psbA, psbC, psbD, psbH oraz bliżej niezidentyfikowanego polipeptydu 9 kDa [25]. Dwie z tych populacji pozostają ufosforylowane nawet wówczas, gdy PSII izoluje się z roślin hodowanych w ciemności, co oznacza, że w warunkach fizjologicznych nigdy nie dochodzi do defosforylacji pewnej puli cząstek PSII [26]. *In vitro* można jednak zdefosforylować wszystkie polipeptydy rdzenia PSII, używając egzogennej fosfatazy – rdzeń zachowuje nawet w takich warunkach wysoką heterogeniczność interpretowaną jako wyraz wiązania różnych ilości psbH [24]. Sugeruje się, że istnienie wielu populacji rdzenia PSII może odzwierciedlać jedną ze strategii regulacji fotosyntetycznego transportu elektronów [25].

**Kompleks cytb6/f.** Funkcjonuje on jako błonowa oksydoreduktaza plastochinol-plastocyjanina, zajmując centralną – w sensie elektrochemicznym – pozycję w liniowym transporcie elektronów pomiędzy PSII i PSI. Funkcji transferu elektronów na trasie plastochinol-plastocyjanina towarzyszy funkcja translokacji protonów w poprzek błony tylakoidowej i współtworzenie, wraz z PSII, siły protonomotorycznej napędzającej syntezę ATP [15]. Struktura kompleksu wykazuje znaczny stopień homologii do struktury mitochondrialnych i bakteryjnych kompleksów cytochrom b-c, stanowiących element składowy oddechowego łańcucha transportu elektronów.

W skład kompleksu cytb6/f wchodzi cztery polipeptydy, a mianowicie cyt f, cyt b6, białko Rieskego i podjednostka IV, będące produktami genów, odpowiednio, *petA*, *petB*, *petC*, *petD* [49]. Tylko białko Rieskego jest kodowane przez genom jądrowy, pozostałe podjednostki są produktami genów chloroplastowych. Preparaty kompleksu cytb6/f izolowane w niektórych laboratoriach zawierają ponadto 1–5 niewielkich (< 5 kDa) polipeptydów [56, 59], spośród których jeden może być kodowany przez chloroplastowy gen *petG* [63]. Plastocyjanina nie jest zaliczana do składników kompleksu jakkolwiek białko to pozostaje związane z kompleksem silnymi oddziaływaniami i może współcyszczać się z nim nawet w trakcie długotrwałych procedur preparatywnych [56]. Z cząsteczkami cytochromów b6 i f związany jest hem, natomiast z białkiem Rieskego centrum żelazowo-siarkowe (2Fe-2S); wymienione grupy prostetyczne odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu kompleksu.

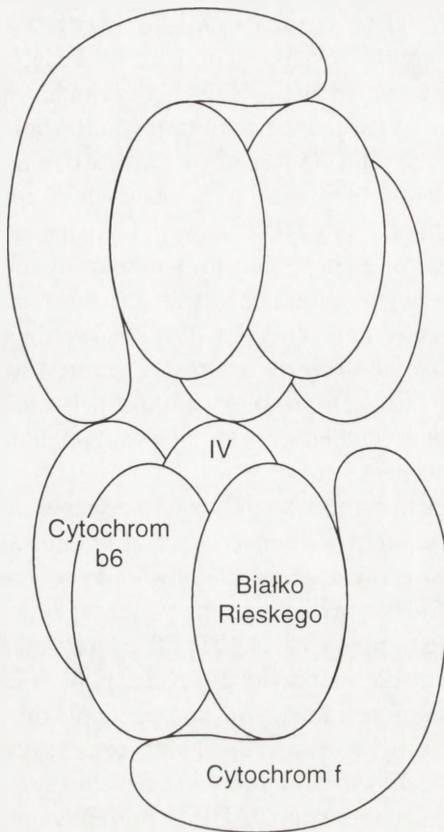
Udział PSII w liniowym transporcie elektronów kończy się wraz z dwuelektronową redukcją oraz pobraniem dwóch protonów przez  $Q_B$  i przejściem – w ten sposób – tego przENOŚNIKA w całkowicie zredukowaną cząsteczkę (plastochinol), dyfundującą swobodnie do dwuwarstwy lipidowej błony tylakoidowej. Dyfundująca cząsteczka plastochinolu ulega utlenieniu w obrębie kompleksu cytb6/f, a pierwszym

etapem tego procesu jest związanie się plastochinolu z domeną  $Q_C$  zlokalizowaną prawdopodobnie w części cząsteczki cytochromu b6 położonej blisko światła tylakoidu [49]. W miejscu  $Q_C$  protony plastochinolu zostają uwolnione do światła tylakoidu, a elektrony są transportowane, kolejno: przez białko Rieskego, cytochrom f i plastocyjaninę. Według tego schematu transportowi jednego elektronu odpowiada zatem uwolnienie jednego protonu do światła tylakoidu. Tymczasem już dość dawno zauważono, że aktowi transportu jednego elektronu przez kompleks cytb6/f towarzyszy translokacja dwóch protonów w poprzek błony tylakoidowej, co oznacza, że opisany powyżej schemat transportu nie wyczerpuje listy procesów katalizowanych przez omawiany kompleks. Przyjmuje się, że zwiększenie liczby translokowanych protonów w stosunku do liczby elektronów przeniesionych między PSII i PSI wynika z funkcjonowania w obrębie cząstki kompleksu cytb6/f cyklu wędrówki elektronów (tzw. cykl Q), generującego translokację dodatkowych protonów [20, 45]. Istotną rolę w mechanizmie cyklu Q odgrywają prawdopodobnie nisko- i wysokopotentjałowe cząsteczki hemu związane z cytochromem b6.

Nie do końca wyjaśniony jest udział kompleksu cytb6/f w cyklicznym transporcie elektronów wokół PSI, zagadnienie to zostanie omówione nieco szerzej w dalszej części artykułu. Ostatnio opublikowano dane sugerujące, że u *Chlamydomonas reinhardtii* kompleks cytb6/f może przekazywać elektrony, zamiast na plastocyjaninę, bezpośrednio na ferredoksynę i  $NADP^+$ , z pominięciem PSI [27]. Transport elektronów takim torem wydaje się termodynamicznie nieprawdopodobny, ponieważ nawet dysponująca najsilniejszymi właściwościami redukującymi komponenta kompleksu cytochrom b6/f, tzn. cytochrom b6 związany z niskopotentjałową cząsteczką hemu ma potencjał oksydoredukcyjny ( $E_m = -170$  mV) wyższy niż ferredoksyna ( $E_m = -430$  mV). Nie jest jednak wykluczone, że redukcja  $NADP^+$  z pominięciem PSI może rzeczywiście mieć miejsce, wskazują bowiem na to również dane pochodzące z innych pracowni [3, 9], ale rola kompleksu cytb6/f w tym torze transportu elektronów pozostaje niejasna.

Wszystkie polipeptydy wchodzące w skład kompleksu cytb6/f stanowią integralny element błony tylakoidowej i przenikają ją jedną lub kilkoma transmembranowymi  $\alpha$ -helisami. Pozostała część struktury tych polipeptydów przypada na odcinki o charakterze hydrofilnym, penetrujące strumień lub światło tylakoidu. Topografia pojedynczych polipeptydów kompleksu cytb6/f w obrębie błony tylakoidowej cechuje się asymetrią, najsilniej wyrażoną w przypadku cytochromu f – na odcinek zanurzony w świetle tylakoidu przypada aż 88% wszystkich aminokwasów cząsteczki tego polipeptydu, podczas gdy odcinek hydrofobowy (tylko jedna  $\alpha$ -helisa transmembranowa) obejmuje zaledwie 6% puli aminokwasów [51].

Trwającą od szeregu lat debatę dotyczącą tego, czy dimer czy monomer jest natywnym stanem kompleksu cytb6/f *in situ*, wydają się ostatecznie rozstrzygać na korzyść dimeru wyniki uzyskane w pracowni Cramera [36]. Udowodniono tam, że dimeryczna forma kompleksu cechuje się *in vitro* taką samą aktywnością



Rys. 2. Schemat organizacji strukturalnej kompleksu cytochrom b6/f

transportu elektronów jak preparat nie frakcjonowany na dimer i monomer, podczas gdy oczyszczony monomer ma aktywność bardzo niewielką. Każdy z monomerów składających się na dimeryczną formę kompleksu zawiera prawdopodobnie po jednej kopii każdego z polipeptydów; wyjątkiem jest cytochrom b6, co do którego oznaczenia stechiometryczne wskazują, że jest reprezentowany przez dwie kopie [56]. Części kompleksu cyt b6/f wykazują pewien stopień heterogeniczności wyrażający się istnieniem dwóch wariantów różniących się względną zawartością produktu *pet G*, a także związanej z kompleksem plastocyjaniny [56]. Rysunek 2 prezentuje najbardziej prawdopodobną – w świetle przedstawionych powyżej danych – organizację strukturalną cząstki kompleksu cyt b6/f.

**PSI** realizuje końcowy odcinek liniowego transportu elektronów jako błonowa oksydoreduktaza plastocyjanina - ferredoksyna. Zredukowana przez PSI ferredoksyna generuje NADPH w reakcji katalizowanej przez reduktazę ferredoksyna – NADP<sup>+</sup>. Tak więc ostatecznym zadaniem liniowego transportu elektronów jest dostarczenie siły redukcyjnej w postaci

NADPH, wykorzystywanej nie tylko w reakcjach cyklu Calvina-Bensona, ale także do redukcji azotynów do amoniaku, desaturacji nasyconych kwasów tłuszczowych, dekarboksylacji pirogronianu i wielu innych, ważnych procesów metabolicznych [16].

W skład PSI wchodzi 17 polipeptydów, spośród których trzy, a mianowicie produkty chloroplastowych genów *psaA*, *psaB*, i *psaC* uczestniczą w liniowym transporcie elektronów wiążąc niebiałkowe ligandy bezpośrednio zaangażowane w reakcje oksydoredukcyjne. Fotochemicznym donorem elektronów PSI jest wyspecjalizowany dimer chlorofilu *a*, określany jako P700, związany pomiędzy dwoma resztami histydynowymi pochodzącymi z cząsteczek polipeptydów *psaA* i *psaB* [21]. Przenośnikiem, który przyjmuje elektrony ze wzbudzonego dimeru P700 jest monomeryczna cząsteczka chlorofilu *a* ( $A_0$ ), a następnie witamina  $K_1$  ( $A_1$ ) i centrum



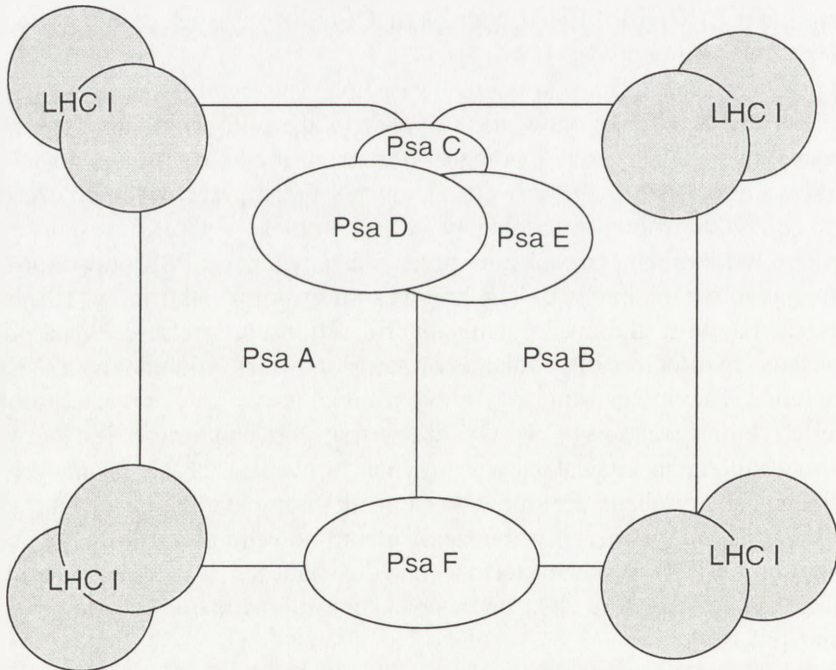
żelazowo-siarkowe (4Fe-4S) określane jako  $F_x$ . Wszystkie te ligandy związane są, podobnie jak P700, z heterodimerem psaA/psaB, przy czym  $A_0$  i  $F_x$  zajmują miejsce blisko miejsca ligacji P700, natomiast położenie  $A_1$  nie zostało dotąd dokładnie ustalone [22]. Elektrony transportowane przez  $F_x$  przyjmują kolejno dwa inne centra żelazowo-siarkowe (4Fe-4S), określane jako  $F_A$  i  $F_B$  związane z niewielkim polipeptydem psaC. Z kolei centrum  $F_B$  redukuje centrum żelazowo-siarkowe (2Fe-2S) ferredoksyny, a ta, z udziałem reduktazy ferredoksyna :  $NADP^+$  (FNR) generuje NADPH. Zarówno ferredoksyna, jak i FNR, operujące w stromie chloroplastowej, nie stanowią już elementu struktury PSI, pozostają jednak w bezpośrednim kontakcie z wchodzącym w skład PSI polipeptydem psaE [5, 57]. Istnienie tego kontaktu udowodniono w doświadczeniach typu *cross-linking*. Utleniony donor fotochemiczny elektronów PSI, P700, jest redukowany elektronami przenoszonymi przez plastocyaninę. Energia niezbędna do transportu elektronów po akceptorowej stronie PSI jest dostarczana do P700, jako energia wzbudzenia elektronowego, przez zespół wewnętrznych anten energetycznych. Na zespół ten składają się kompleksy, jakie tworzy z chlorofilem *a* heterodimer psaA/psaD a także, prawdopodobnie, związany z niewielką ilością chlorofilu *a* polipeptyd psaF [16]. Bardziej peryferycznie pozostaje związany z PSI zespół kompleksów wiążących chlorofil *a*, chlorofil *b* i ksantofile. Jak dotąd zidentyfikowano trzy tego rodzaju kompleksy współpracujące z PSI, określane jako LHCI-730, LHCI-680A i LHCI-680B, a w ich skład wchodzi co najmniej cztery polipeptydy (Lhca1-4) [43].

PSI przeprowadza także, w kooperacji z kompleksem cytb6/f, cykliczny transport elektronów, którego funkcjonowanie współkształtuje się protonomotoryczną napędzającą syntezę ATP. Szlak cyklicznego transportu elektronów nie został dotąd ustalony, wiadomo jednak, że jest on inicjowany przez przechwycenie części elektronów ze zredukowanej ferredoksyny przez kompleks cytb6/f, transportujący je z powrotem w kierunku ferredoksyny przez plastocyaninę i PSI, prawdopodobnie tak samo, jak to ma miejsce w trakcie liniowego transportu elektronów [19]. Istnieją przypuszczenia, że u glonów i cyjanobakterii w transport elektronów na odcinku ferredoksyna - cytb6/f może być zaangażowana błonowa oksydoreduktaza NAD(P)H : plastochinon, enzym uczestniczący w procesie konsumpcji  $O_2$  przez chloroplasty na świetle (chloro-respiracja) [13]. Cykliczny transport elektronów jest prawdopodobnie mechanizmem pozwalającym utrzymać w warunkach zagrażających foto-inhibicją wysoki gradient protonów w poprzek błony tylakoidowej, sprzyjający rozpraszaniu nadmiaru energii wzbudzenia elektronowego przez dezaktywację termiczną w obrębie PSII. Wskazują na to wyniki doświadczeń, w których udowodniono stymulację cyklicznego toru elektronów po ekspozycji rośliny na światło o wysokim natężeniu [34, 64].

Spośród 17 polipeptydów PSI tylko pięć: psaC, psaD, psaE, psaH i psaN nie ma odcinków transmembranowych. Cztery pierwsze to białka peryferyczne, rezydujące na granicy stromy i błony tylakoidowej, natomiast psaN zajmuje położenie

peryferyczne od strony światła tylakoidu [16]. Pozostałe polipeptydy przenikają błonę tylakoidową 1-11  $\alpha$ -helisami, przy czym topografia polipeptydów Lhca1-4 jest prawdopodobnie bardzo zbliżona do ich odpowiedników współdziałających z PSII, tzn. Lhcb1-6.

U cyjanobakterii PSI przyjmuje *in situ* strukturę trimeryczną [44], natomiast w przypadku roślin wyższych istnienie struktury trimerycznej PSI, choć możliwe do zaobserwowania *in vitro* [55], nigdy nie zostało przekonująco udowodnione *in vivo*. Monomeryczna forma PSI zawiera po jednej kopii każdego z polipeptydów psaA-N oraz, prawdopodobnie, cztery dimeryczne subkompleksy LHCI. Ta ostatnia sugestia opiera się na wynikach prac przeprowadzonych w pracowni Mollera [41], w trakcie których udowodniono, że w mieszaninie polipeptydów preparatu LHCI lub oczyszczonego LHCI-730 powstają w obecności *cross-linkerów* liczne produkty dimeryczne, co może odzwierciedlać tendencje polipeptydów Lhca1-4 do formowania *in vivo* struktur dimerycznych. Organizację strukturalną monomerycznej cząstki PSI można sobie zatem wyobrazić tak, jak to pokazano na rysunku 3. Rysunek 3 przedstawia schemat wariantu PSI najobficiej reprezentowanego w obrębie błon tylakoidowych. Wariant ten określany jest jako PSI $\beta$ . Z doniesień pochodzących z pracowni Albertssona wiadomo natomiast, że ok. 35% puli chlorofilu PSI przypada

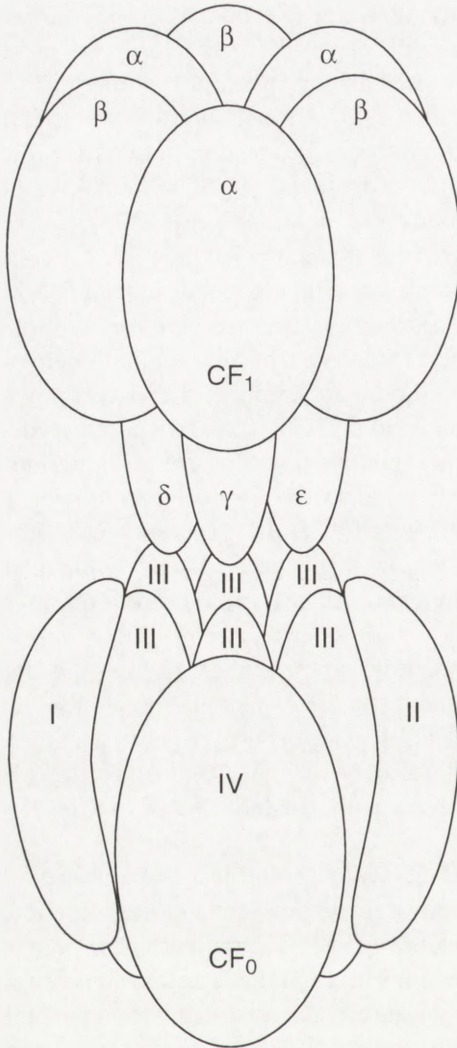


Rys. 3. Schemat organizacji strukturalnej PSI, na rysunku pominięto szereg słabiej scharakteryzowanych komponentów polipeptydowych PSI

na cząstki o większym „przekroju optycznym”, określane jako PSI $\alpha$  [1]. Dzięki zastosowaniu do badań nad heterogenicznością PSI wysokorozdzielczego ogniskowania izoelektrycznego udowodniono, że PSI $\alpha$  zawiera, poza pulą dimerycznych subkompleksów LHCI, także pewną ilość trimerycznych subkompleksów LHCII, zwiększających „przekrój optyczny” holokompleksu [7]. Dane te potwierdzają już wcześniej znany fakt, że LHCII może *in vivo* pozostawać z PSI w kontakcie pozwalającym na przekazywanie energii wzbudzenia elektronowego [30].

**Syntaza ATP** jest błonowym kompleksem funkcjonalnym katalizującym syntezę ATP napędzaną przez siłę protonomotoryczną kształtującą się w rezultacie kooperacji PSII i kompleksu cyt $b_6/f$  oraz cyklicznego transportu elektronów wokół PSI. Chloroplastowa syntaza ATP wykazuje bardzo znaczny stopień podobieństwa strukturalnego do mitochondrialnego i bakteryjnego kompleksu F $_1$ F $_0$  odpowiedzialnego za fosforylację oksydacyjną. W skład syntazy ATP wchodzi 9 polipeptydów zgrupowanych w dwie całkowite odmiennie zbudowane jednostki strukturalne – CF $_0$  i CF $_1$ . Jednostka CF $_0$  jest integralnym składnikiem błony tylakoidowej, na którą składają się pozbawione ligandów polipeptydy CF $_0$  I-IV (przenikające błonę 1-7  $\alpha$ -helisami), reprezentujące produkty genów *atpF*, *atpG*, *atpH* i *atpI*, odpowiednio. Z kolei jednostka CF $_1$  jest strukturą penetrującą strömę chloroplastową, a wchodzące w jej skład polipeptydy (CF $_1$   $\alpha$ - $\epsilon$ ) są produktami genów *atpA-E* [49]. Według powszechnie przyjętych poglądów syntaza ATP cechuje się dość skomplikowaną strukturą oligomeryczną – jednostka CF $_0$  obejmuje po jednej kopii polipeptydów CF $_0$ I, II i IV oraz heksamer CF $_0$ III, podczas gdy penetrująca strömę domena CF $_1$  ma następujący skład podjednostkowy:  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  [18, 49]. Na pojedynczą cząstkę syntazy ATP składa się po jednej jednostce CF $_0$  i CF $_1$  (rys. 4).

Siła protonomotoryczna napędzająca reakcję syntezy ATP jest sumą transmembranowego gradientu pH oraz potencjału błonowego, do powstania którego dochodzi w wyniku rozdziału ładunku w centrach reakcji PSII i PSI. Gradient pH w poprzek błony tylakoidowej kształtujący się w przeciętnych warunkach fotosyntetycznych wynosi ok. 3,5 jednostki, co jest wielkością wystarczającą do uruchomienia syntezy ATP. Synteza pojedynczej cząsteczki ATP wymaga transferu trzech protonów przez syntazę ATP. Rolę kanału protonowego (kanałów protonowych), bezpośrednio zaangażowanych w translokację protonów pełni heksamer polipeptydów CF $_0$ III, podczas gdy pozostałe polipeptydy CF $_0$  uczestniczą, jak się sądzi, w kotwiczeniu CF $_1$  [49]. Właściwą podjednostką katalityczną syntezy ATP jest natomiast heteroheksamer ( $\alpha_3\beta_3$ ) jednostki CF $_1$ . Spośród kilku zaproponowanych w ciągu ostatnich kilku lat modeli mechanizmu syntezy ATP najbardziej prawdopodobny wydaje się model konformacyjny Boyera [13], zakładający, że w obrębie heteroheksameru  $\alpha_3\beta_3$  istnieją trzy miejsca katalityczne nawzajem w sobie przechodzące poprzez zmiany konformacyjne (stąd nazwa modelu). Jedno z tych miejsc wiąże ADP i P $_i$ , aby po modyfikacji konformacji, stał się miejscem silnie wiążącym ATP zsyntetyzowanym



Rys. 4. Schemat organizacji strukturalnej syntazy ATP; *in vivo* jednostki CF<sub>0</sub> i CF<sub>1</sub> są ze sobą ściśle zasocjowane, jednak na rysunku przedstawiono je jako nieco rozsunięte dla zaprezentowania ich pełnego składu podjednostkowego

z ADP i P<sub>i</sub>. Translokacja protonów przez kanał CF<sub>0</sub> prowadzi do kolejnej zmiany konformacyjnej i przejścia miejsca silnie wiążącego ATP w miejsce słabo wiążące ATP – gotowy ATP opuszcza jednostkę CF<sub>1</sub> i trafia do stromy. Jedną z możliwości wytłumaczenia sposobu, w jaki translokacja protonów generuje zmiany konformacyjne miejsc katalitycznych α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>, jest przyjęcie, że ruch protonów wymusza ruch obrotowy heteroheksamerem. W trakcie tego ruchu zmieniają się oddziaływania między miejscami katalitycznymi, prowadzące do rearanzacji konformacyjnych [67].

W odróżnieniu od PSII, PSI oraz kompleksu cyt<sub>b</sub>6/f syntaza ATP jest homogeną populacją cząstek, w obrębie których nie stwierdzono żadnego zróżnicowania strukturalnego czy funkcjonalnego.

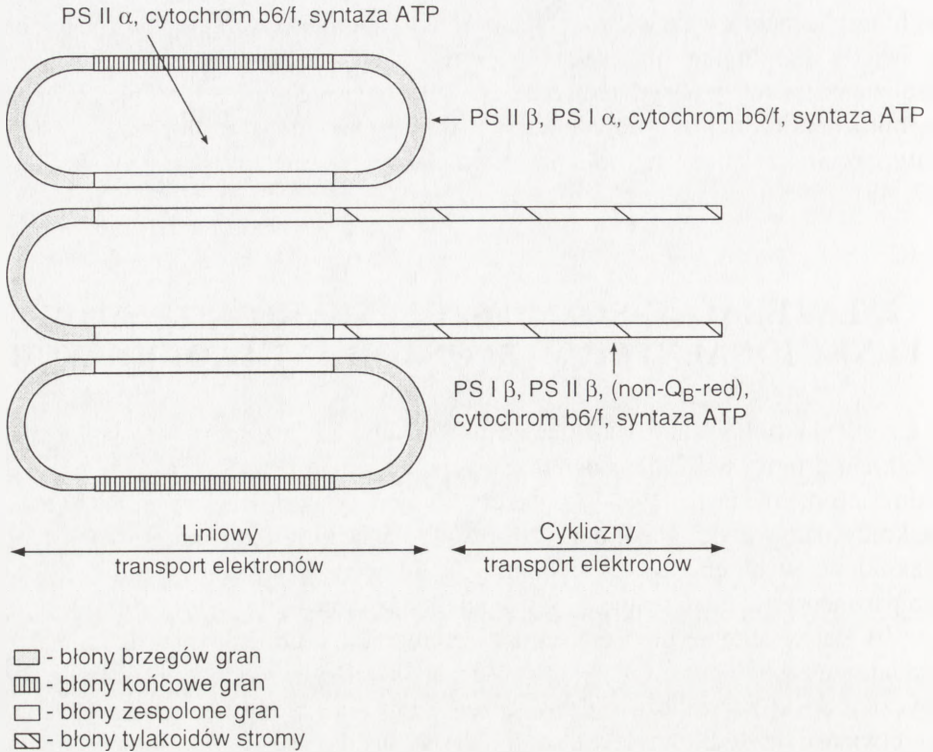
**Inne kompleksy.** Genom chloroplastowy szeregu gatunków roślinnych zawiera ponad 30 otwartych ramek odczytu, z których każda wystarcza do zakodowania niewielkich polipeptydów o masie cząsteczkowej kilku kDa [63]. Ewentualne produkty białkowe tych sekwencji pozostają nieznanne, nie jest jednak wykluczone, że – ze względu na niską masę cząsteczkową – białka te (być może pełniące ważne funkcje fotosyntetyczne) zostały przeoczone w dotychczasowych analizach biochemicznych błon tylakoidowych [49]. Z kolei analiza genomu chloroplastowego kilku

gatunków roślinnych (w tym tytoniu i wątrobowca *Marchantia*) pozwoliła na wykrycie rodziny genów *ndhA-H*, których struktura pierwszorzędowa jest bardzo podobna do struktury pierwszorzędowej genów podjednostek mitochondrialnej oksydoreduktazy NADH : ubichinon. Jednak nawet najbardziej precyzyjne analizy biochemiczne nie pozwoliły, na razie, na stwierdzenie obecności takich podjednostek

w chloroplastach. Zważywszy, że w chloroplastach niektórych glonów funkcjonuje na świetle wspomniany już proces chlororespiracji, można podejrzewać że w jego katalizie uczestniczy oksydoreduktaza NADPH : plastochinon (chloroplastowa wersja mitochondrialnej oksydoreduktazy NADH : ubiquinon), stanowiąca być może piąty, wciąż czekający na odkrycie, kompleks funkcjonalny błony tylakoidowej [19, 49].

## 2. LATERALNE ROZMIESZCZENIE KOMPLEKSÓW FUNKCJONALNYCH W BŁONACH TYLAKOIDOWYCH

Część tylakoidów chloroplastu pozostaje ze sobą ściśle zasocjowana w położeniu jeden nad drugim w formie stosu granowego (= granum), część zaś przenika swobodnie stromę nie pozostając w kontakcie z innymi tylakoidami – te niezasocjowane tylakoidy nazywa się tylakoidami stromy. W związku z istnieniem dwóch typów tylakoidów, w obrębie systemu błon tylakoidowych wyróżnia się dwa główne kompartmenty, a mianowicie błony tylakoidów gran i błony tylakoidów stromy [1]. Z kolei w obrębie błon gran można wyróżnić ich domenę centralną, na którą składają się zespolone ze sobą błony poszczególnych tylakoidów oraz domenę peryferyczną, do której zalicza się tzw. brzegi gran oraz błony końcowe (rys. 5). W przeciwieństwie do błon tylakoidowych zespolonych, brzegi gran i błony końcowe a także błony tylakoidów stromy są błonami niezespolonymi, tzn. na całej swojej powierzchni kontaktują się tylko ze stromą lub światłem tylakoidu, a nie inną błoną tylakoidową. Albertsson [1] traktuje tzw. ścieżki, tj. przewężone strefy łączące grana i tylakoidy stromy, jako jeszcze jedną, odrębną domenę strukturalną błony tylakoidowej. Średnica stosów granowych oglądanych z góry wynosi zwykle 0,4–0,5  $\mu\text{m}$ , a przeciętna granum obejmuje 5–20 zespolonych błon tylakoidowych. Względna reprezentacja błon gran i stromy w obrębie pojedynczego chloroplastu jest dość podobna u wszystkich zbadanych dotąd gatunków roślinnych, pod warunkiem wszakże, że badania przeprowadza się na roślinach, do których dociera średnia ilość światła ( $150\text{--}300 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), wtedy na błony stromy przypada ok. 20%, a na błony gran ok. 80% całkowitego systemu [1, 28]. Błony tylakoidowe gran i stromy można rozdzielać i oczyszczać metodami biochemicznymi, a następnie poddawać w stanie oczyszczonym analizom zmierzającym do ustalenia rozmieszczenia kompleksów funkcjonalnych. Istnieje kilka sposobów rozdzielania błon tylakoidowych gran i stromy; najprostsza z nich polega na dezintegracji całkowitych błon z użyciem pras wysokociśnieniowych lub detergentu (digitonina) w połączeniu z wirowaniem preparatu otrzymanego po dezintegracji. W rezultacie wirowania błony tylakoidów gran (cięższe) tworzą osad, podczas gdy błony tylakoidów stromy pozostają w nadsączu [23]. Znacznie wyższy stopień oczyszczenia obydwu kom-



Rys. 5. Lateralna dystrybucja kompleksów błony tylakoidowej; liniowy transport elektronów odbywa się wyłącznie w błonach tylakoidów gran, a cykliczny transport wyłącznie w błonach tylakoidów stromy (wg [1], zmienione)

partmentów błonowych można osiągnąć poddając preparat zdeintegrowanych błon procedurze rozdzielania fazowego wodno-polimerowego; w przypadku takiego podejścia eksperymentalnego błony stromy i gran są rozdzielone do dwóch faz systemu w związku z różnicami właściwości powierzchniowych i stopnia hydrofobowości [8]. Oczyszczone błony gran można dalej frakcjonować (za pomocą sekwencji sonikacji i rozdzielania fazowego) na strefę centralną (błony zespolone gran) oraz błony brzegów gran [68], natomiast błony końcowe stanowią zwykle wspólny preparat z błonami tylakoidów stromy. Dzięki badaniom prowadzonym na oczyszczonych preparatach ustalono, że błony tylakoidów gran mają niski stosunek ilościowy chlorofil *a* / chlorofil *b* (ok. 2.4 : 1) w porównaniu do błon tylakoidów stromy (ok. 4.6 : 1), co wyraźnie sugeruje, iż błony tylakoidów gran są wzbogacone w PSII, a błony tylakoidów stromy w PSI. Wniosek ten znajduje potwierdzenie w wynikach badania aktywności obydwu fotosystemów we wspomnianych kompartmentach [8]. Dokładne oznaczenia dowodzą, że ok. 85% cząstek PSII znajduje się w błonach zespolonych gran a pozostałe 15% w obrębie błon stromy i w błonach

końcowych gran. Te dwie ostatnie pule PSII składają się na populację PSII $\beta$ , charakteryzującą się niemal dwukrotnie mniejszym „przekrojem optycznym” od PSII błon zespolonych gran (PSII $\alpha$ ). Subpopulacja PSII $\beta$  niezdolna do redukcji plastochinonu (non-Q<sub>B</sub>-PSII) okazuje się być identyczna z pulą PSII $\beta$  obecną w błonach stromy, podczas gdy PSII $\beta$  rezydujący w błonach końcowych gran jest zdolny do redukcji plastochinonu i – poza mniejszym „przekrojem optycznym” – nie różni się funkcjonalnie od PSII $\alpha$  [1]. Populacje PSII $\alpha$  różniące się liczbą zasocjowanych trimerów LHCII [2] są rozmieszczone w błonach zespolonych gran w taki sposób, że te cząstki, które mają największy „przekrój optyczny” (PSII $\alpha_1$ ) ,rezydują w centrum gran, a te o najmniejszym przekroju (PSII $\alpha_3$ ) zajmują w granum pozycję peryferyczną [1].

Z oznaczeń biochemicznych wynika, że ok. 65% cząstek PSI znajduje się w błonach tylakoidów stromy pozostałe zaś 35% w brzegach gran, przy czym pula PSI błon stromy jest tożsama z PSI $\beta$ , a granowa pula PSI reprezentuje PSI $\alpha$  [1, 7]. Nierównomierność lateralnej dystrybucji w obrębie systemu błon tylakoidowych dotyczy także kompleksu cyt $b_6/f$ , a mianowicie większość jego cząstek znajduje się w błonach zespolonych gran. Błony stromy są względnie zubożone w cząstki tego kompleksu. Pula cząstek kompleksu znajdujących się w błonach gran zawiera niezidentyfikowany polipeptyd 15 kDa, nieobecny w błonach stromy [56]. Cząstki syntazy ATP są rozmieszczone równomiernie we wszystkich kompartmentach błon tylakoidowych.

Jakie są funkcjonalne implikacje istnienia nierównomierności w lateralnej dystrybucji oraz heterogeniczności strukturalnej PSII, PSI i kompleksu cyt $b_6/f$  ? Otóż sądzi się, że ważną właściwością systemu błon tylakoidowych jest przestrzenna izolacja liniowego i cyklicznego transportu elektronów, wyrażająca się funkcjonowaniem transportu liniowego wyłącznie w obrębie gran (PSII $\alpha$  + cyt $b_6/f$  + PSI $\alpha$ ), a transportu cyklicznego wyłącznie w obrębie błon tylakoidów stromy (PSI $\beta$  + cyt $b_6/f$ ) (rys. 5). Do niedawna przeważał pogląd, według którego PSII gran i PSI błon stromy pozostają w kontakcie funkcjonalnym dzięki wykorzystaniu zredukowanej plastocyaniny jako dalekozasięgowego łącznika, dyfundującego poprzez światło tylakoidu pomiędzy granum i błonami stromy. Taka możliwość wydaje się jednak mało prawdopodobna wobec obserwacji, iż w trakcie intensywnej fotosyntezy przestrzeń światła tylakoidu znacznie zmniejsza się w rezultacie zbliżania się błon ograniczających światło tylakoidu [1]. Znacznie zmniejszoną przestrzeń światła tylakoidu szczerlnie wypełniają hydrofilne pętle licznych białek transmembranowych oraz całe cząsteczki białek peryferycznych, co stwarza warunki „makromolekularnego tłoku”, praktycznie uniemożliwiające plastocyaninie odpowiednio szybką migrację na dalekie odległości. Również wykorzystanie jako łącznika lipofilnego plastochinolu, który teoretycznie mógłby migrować na trasie między granum a błoną stromy wewnątrz dwuwarstwy lipidowej, jest nieprawdopodobne, ponieważ zmierzony *in situ* współczynnik dyfuzji plastochinolu jest za niski w

zestawieniu z szybkością liniowej wędrówki elektronów [11]. Zredukowana plastocyanina pełni natomiast z pewnością rolę łącznika PSII/PSI na bardzo niewielkich dystansach, takich jakie dzielą PSII $\alpha$  i PSI $\alpha$  w obrębie pojedynczego granum. W niektórych sytuacjach, determinowanych przez zmiany składu jakościowego światła docierającego do rośliny lub temperatury otoczenia, część puli LHCII związanej z PSII $\alpha$  może oddysocjowywać od holokompleksu, dyfundować lateralnie w kierunku PSI $\alpha$  i przekazywać mu, po asocjacji, część energii wzbudzenia elektronowego. Taka redystrybucja podjednostek kompleksów funkcjonalnych błony tylakoidowej, prowadząca do sprzężenia funkcjonalnego LHCII i PSI $\beta$ , stanowi mechanizm krótkoterminowych adaptacji błony tylakoidowej do zmieniających się warunków środowiskowych [4].

Jak współpracują PSII $\beta$  (non-Q<sub>B</sub>-PSII) i PSI $\beta$  rozmieszczone w błonach stromy? Z pewnością nie kooperują w transporcie elektronów, ponieważ PSII $\beta$  nie jest zdolny do kierowania elektronów w kierunku PSI $\beta$ . Można więc sugerować, że PSI $\beta$  transportuje elektrony samodzielnie, w sposób cykliczny, a sugestie te znajdują pełne potwierdzenie w obserwacji, iż PSI $\beta$  może *in vitro* redukować ferredoksynę wykorzystując askorbinian i dichlorofenolindofenol (DCPIP) jako donory elektronów, bez konieczności uzupełniania mieszaniny reakcyjnej o NADP<sup>+</sup> i FNR [69]. Co więcej, udowodniono, że dojrzewające chloroplasty, jeszcze nie zawierające uformowanych stosów granowych, a zawierające tylko niezespolone tylakoidy stromy, wykazują *in vitro* wyłącznie aktywność PSI i fosforylacji cyklicznej [1]. Funkcja PSII $\beta$  pozostaje niejasna, sugeruje się jednak, że ta subpopulacja PSII jest prekursorową formą PSII. Wyniki niektórych badań wydają się także wskazywać na PSII $\beta$  jako stadium przejściowe w stale funkcjonującym cyklu naprawczym PSII, wiążącym się z intensywnym obrotem metabolicznym psbA [70].

## LITERATURA

- [1] ALBERSSTON PA. The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – a model for the domain organization. *Photosynth Res* 1995; **46**: 141–149.
- [2] ALBERSSTON PA, YU SC, LARSSON UK. Heterogeneity in photosystem II. Evidence from fluorescence and gel electrophoresis experiments. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1016**: 137–140.
- [3] ALLAKHVERDIEV SI, KLIMOV W. Photoreduction of NADP<sup>+</sup> in photosystem II of higher plants: requirement for manganese. *Z Naturforsch* 1992; **47c**: 57–62.
- [4] ALLEN JF. Thylakoid protein phosphorylation, state 1~ state 2 transition, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol Plant* 1995; **93**: 196–205.
- [5] ANDERSEN B, SCHELLER HV, MOLLER BL. The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin: NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase. *FEBS Lett* 1992; **311**: 169–174.
- [6] ANDERSON JM. Molecular organization of thylakoid membranes. [w] Neuberger A, van Deenen LLM [red.] Photosynthesis. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier 1987: 273–279.



- [7] ANDREASSON E, ALBERTSSON PA. Heterogeneity in photosystem I - the larger antenna of photosystem I $\alpha$  is due to functional connection to a special pool of LHCII. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1141**: 175–182.
- [8] ANDREASSON E, SVENSSON P, WEIBULL C, ALBERTSSON PA. Separation and characterization of stroma and grana membranes – evidence for heterogeneity in antenna size of both photosystem I and photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1988; **936**: 339–350.
- [9] ARNON DI. Divergent pathway of photosynthetic electron transfer: the autonomous oxygenic and anoxygenic photosystems. *Photosynth Res* 1995; **46**: 47–71.
- [10] BARBER J. Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Aust J Plant Physiol* 1994; **22**: 201–208.
- [11] BLACKWELL M., GIBAS C, GYGAX S, ROMAN D, WAGNER B. The plastoquinone diffusion coefficient in chloroplasts and its mechanistic implications. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1183**: 533–543.
- [12] BOEKEMA EJ, HANKAMER B, BALD D, KRUIP J, NIELD J, BOONSTRA AF, BARBER J, ROGNER M. Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 175–179.
- [13] BOYER PD. The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities *Biochim Biophys Acta* 1993; **1140**: 215–250.
- [14] BRICKER TM. The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II. *Photosynth Res* 1990; **24**: 1–13.
- [15] CHAIN RK, MALKIN R. Functional analysis of monomeric and dimeric forms of the chloroplast cytochrom *b6/f* complex. *Photosynth Res* 1995; **46**: 419–426.
- [16] CHITNIS PR. Photosystem I. *Plant Physiol* 1996; **111**: 661–669.
- [17] DEBUS RJ. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1102**: 269–352
- [18] FILLINGANE RH. H<sup>+</sup> transport and coupling by the F<sub>0</sub> sector of the ATP synthase: insights into the molecular mechanism of function. *J Bioenerg Biomemb* 1992; **24**: 485–491.
- [19] FORK DC, HERBERT SK. Electron transport and phosphorylation by photosystem I in vivo in plants and cyanobacteria. *Photosynth Res* 1993; **36**: 149–168.
- [20] FRANK K, TREBST A. Quinone binding sites on cytochrome *b/c* complexes. *Photochem Physiol* 1995; **61**: 2–9.
- [21] FROMME P, SCHUBERT WD, KRAUS N. Structure of photosystem I: suggestions on the docking sites for plastocyanin, ferredoxin and the coordination of P700. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1187**: 99–105.
- [22] FROMME P, WITT HT, SCHUBERT WD, KLUKAS O, SAENGER W, KRAUS N. Structure of photosystem I at 4.5 Å resolution: a short review including evolutionary aspects. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1295**: 76–83.
- [23] GIARDI MT. Phosphorylation and disassembly of the photosystem II core as an early stage of photoinhibition. *Planta* 1993; **190**: 107–113.
- [24] GIARDI MT. Significance of photosystem II core phosphorylation heterogeneity for the herbicide binding domain. *Z Naturforsch* 1993; **48c**: 241–245.
- [25] GIARDI MT, CONA A, GEIKEN B. Photosystem II core phosphorylation heterogeneity and the regulation of electron transfer in higher plants: a review. *Bioelectrochem Bioenerg* 1995; **38**: 67–75.
- [26] GIARDI MT, RIGONI F, BARBATO R. Photosystem II core phosphorylation heterogeneity, differential herbicide binding and regulation of electron transfer in photosystem II preparations from spinach. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1948–1954
- [27] GREENBAUM E, LEE J.W., TEVAULT CV, BLANKINSHIP SL, METS LJ. New photosynthesis or old? *Nature* 1995; 379.
- [28] GREENWOOD AD. Molecular, physiological and environmental processes. [w] Lawlor DW [red]. Photosynthesis, Longman Group 1993: 100–121.

- [29] HANKAMER B, NIELD J, ZHELEVA D, BOEKEMA E, JANSSON S, BARBER J. Isolation and biochemical characterization of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo*. *Eur J Biochem* 1997; **243**: 422–429.
- [30] HARRISON MA, ALLEN JF. Protein phosphorylation and  $Mg^{2+}$  influence light harvesting and electron transport in chloroplast thylakoid membrane material containing only the chlorophyll-*a/b*-binding light-harvesting complex of photosystem II and photosystem I. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 1107–1114.
- [31] HARRISON MA, MELIS A. Organization and stability of polypeptides associated with chlorophyll *a-b* light harvesting complex of photosystem II. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 627–637.
- [32] HARRISON MA, NEMSON JA, MELIS A. Assembly and composition of the chlorophyll *a-b* light harvesting of barley (*Hordeum vulgare* L.): Immunochemical analysis of chlorophyll *b*-less and chlorophyll *b*-deficient mutants. *Photosynth Res* 1993; **38**: 141–151.
- [33] HARRISON MA, MELIS A, ALLEN JF. Restoration of irradiance-stressed *Dunaliella salina* (green alga) to physiological growth conditions: changes in antenna size and composition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1100**: 83–91.
- [34] HAVAUX M. Photoacoustic measurement of cyclic electron flow around photosystem I in leaves adapted to light - state 1 and 2. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 799–803.
- [35] HOLZENBURG A, BEWLEY MC, WILSON FH, NICHOLSON WV, FORD RC. Three dimensional structure of photosystem II. *Nature* 1993; **363**: 470–472.
- [36] HUANG D, EVERLY RM, CHENG RH, HEYMANN JB, SCHAGGER H, SLED V, OHNISHI T, BAKER TS, CRAMER WA. Characterization of the chloroplast cytochrome *b6f* complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* 1994; **33**: 4401–4409.
- [37] JACKOWSKI G. Kompleksy chlorofil *a/b*-białko fotosystemu II. Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM 1996.
- [38] JACKOWSKI G, KLUCK E. The oligomeric arrangement of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II. *Z Naturforsch* 1994; **49c**: 337–342.
- [39] JACKOWSKI G, PRZYMUSIŃSKI R. The resolution and biochemical characterization of subcomplexes of the main light harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Photosynth Res* 1995; **43**: 41–48.
- [40] JANSSON S. The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1184**: 1|19.
- [41] JANSSON S, ANDERSEN B, SCHELLER HV. Nearest-neighbor analysis of higher plants photosystem I holocomplex. *Plant Physiol* 1996; **112**: 409–420.
- [42] KITAMURA K, OZAWA S, SHIINA T, TOYOSHIMA T. L protein, encoded by *psbL*, restores normal functioning of the primary quinone acceptor,  $Q_A$ , in isolated D1/D2/CP47/cyt *b*-559/I photosystem II reaction center core complexes. *FEBS Lett* 1994; **354**: 113–116.
- [43] KNOETZEL J, SVENDSEN I, SIMPSON DJ. Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. *Eur J Biochem* 1992; **206**: 209–215.
- [44] KRUIP J, BALD D, BOEKEMA E, ROGNER M. Evidence for the existence of trimeric and monomeric photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria. *Photosynth Res* 1994; **40**: 279–286.
- [45] KRUK J, STRZAŁKA K. Funkcja i mechanizm działania plastochinonu w błonach fotosyntetycznych. *Post Biol Kom* 1995; **22**(supl.5): 89–98.
- [46] KUHLEBRANDT W. Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHCII. *Curr Opin in Str Biol* 1994; **4**: 519–528.
- [47] KUHLEBRANDT W, WANG DN, FUJIYOSHI Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 1994; **367**: 614–621.
- [48] LI J. Light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein: three dimensional structure of a reconstituted membrane lattice in negative stain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 386–350.

- [49] MARDER JB, BARBER J. The molecular anatomy and function of thylakoid proteins. *Plant Cell Environment* 1989; **12**: 596–614.
- [50] MARR KM, MASTRONARDE PN, LYON MK. Two-dimensional crystals of photosystem II: biochemical characterization, cryoelectron microscopy and localization of the D1 and cytochrom b559 polypeptides. *J Cell Biol* 1996; **132**: 823–833.
- [51] MARTNEZ SE, SMITH JL, HUANG D, SZCZEPANIAK A, CRAMER WA. Crystallographic studies of the lumen-side domain of turnip cytochrome f. [w] Murata W [red.] Research in Photosynthesis. Vol. II. Kluwer Academic Publishers 1992: 495–498.
- [52] MURPHY DJ. The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim Biophys Acta* 1986; **864**: 33–94.
- [53] NICHOLSON WV, SHEPHERD FH, ROSENBERG MF, FORD RC, HOLZENBURG A. Structure of photosystem II in spinach thylakoid membranes: comparison of detergent-solubilized and native complexes by electron microscopy. *Biochem J* 1996; **315**: 543–547.
- [54] PETER GF, THORNBER JP. Biochemical characterization and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 16745–16754.
- [55] PREISS S, PETER GF, ANANDAN S, THORNBER JP. The multiple pigment-proteins of photosystem I antenna. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 152–157.
- [56] ROMANOWSKA E, ALBERTSSON PA. Isolation and characterization of the cytochrome *bf* complex from whole thylakoids, grana, and stroma lamellae vesicles from spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 1994; **35**: 357–368.
- [57] ROUSSEAU F, SETIF P., LAGOUTTE B. Evidence for the involvement of PSI-E subunit in the reduction of ferredoxin by photosystem I. *EMBO J* 1993; **12**: 1755–1765.
- [58] SANTINI C, TIDU V, TOGNON G, MAGALDI AG, BASSI R. Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization *in vivo*. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 307–315.
- [59] SCHMIDT GL, MALKIN R. Low molecular weight subunits associated with the cytochrome *bf* complexes from spinach and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* 1993; **38**: 73–81.
- [60] SEIDLER A. The extrinsic polypeptides of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1277**: 35–60.
- [61] SIEGENTHALER PA, RAWYLER A, SMUTNY J. The phospholipid population which sustains the uncoupled non-cyclic electron flow activity is localized in the inner monolayer of the thylakoid membrane. *Biochim Biophys Acta* 1989; **975**: 104–111.
- [62] SINGER SJ, NICHOLSON GC. The fluid mosaic model of cell membranes. *Science* 1972; **175**: 720–731.
- [63] SUGIURA M. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 149–168.
- [64] TOPF J, GONG H, TIMBERG R, METS L, OHAD I. Thylakoid membrane energization and swelling in photoinhibited *Chlamydomonas* cell is prevented in mutants unable to perform cyclic electron flow. *Photosynth Res* 1992; **32**: 59–69.
- [65] TSIOTSIS G, WALZ T, SPYRIDAKI A, LUSTIG A, ENGEL A, GHANOTAKIS D. Tubular crystals of a photosystem II core complex. *J Mol Biol* 1996; **259**: 241–248.
- [66] TYYSTJARVI E. Photoinhibition – struggle between damage and repair of photosystem II. Turku: Department of Biology, University of Turku 1993.
- [67] WHITMARSH J, GOVINDJEE. Photosynthesis. [w] Encyclopedia of Applied Physics, vol. 13. VCH Publishers 1995: 513–532.
- [68] WOLLENBERGER L, STEFANSSON H, YU SG, ALBERTSSON PA. Isolation and characterization of vesicles originating from the chloroplast grana margins. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1184**: 93–102.
- [69] WOLLENBERGER L, WEIBULL C, ALBERTSSON PA. Further characterization of the chloroplast grana margins: the non-detergent preparation of granal photosystem I cannot reduce ferredoxin in the absence of NADP<sup>+</sup> reduction. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1230**: 10–22.

[70] VASILIKIOTIS C, MELIS A. Photosystem II reaction center damage and repair cycle-chloroplast acclimation strategy to irradiance stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 7222–7226.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 23.04. 1997 r.*

*Przyjęto: 06.06.1997 r.*

*Adres autora: Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań*

## BIAŁKA ZAANGAŻOWANE W PROCES OBRÓBKII pre-rRNA

### PROTEINS ENGAGED IN pre-RNA PROCESSING

Piotr SZYMCZYK, Zofia KILIAŃSKA

Zakład Biochemii Medycznej Katedry Cytobiochemii, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w poznaniu etapów obróbki pre-rRNA. Niniejszy artykuł stanowi przegląd dotyczący głównie białek uczestniczących w tym złożonym procesie. Przedstawiono w nim również zaproponowany przez Tollerveya [106] model obróbki pre-rRNA *Saccharomyces cerevisiae*, uwzględniający fundamentalne znaczenie dla jego przebiegu wykrytych ostatnio polipeptydów, w tym białka RRP5 oraz niektórych cząsteczek U snoRNA.

*Słowa kluczowe:* obróbka pre-rRNA, U snoRNP, białka jąderkowe, procesosom.

*Summary:* The last years brought significant progress in understanding of pre-rRNA processing. This article summarizes the data on protein participation in this highly organized process. It presents also the model of pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae* described by Tollervey [106], in which fundamental role of recently discovered polypeptides, especially protein RRP5 and some molecules of U snoRNA is discussed.

*Key words:* pre-rRNA processing, U snoRNP, nucleolar proteins, procesosome.

*Wykaz skrótów:* **AA** – aminokwas; **A** (Ala) – alanina; **D** (Asp) – kwas asparaginowy; **E** (Glu) – kwas glutaminowy; **ETS** (ang. *External Transcribed Spacers*) – transkrybowane sekwencje zewnętrzne; **F** (Phe) – fenyloalanina; **G** (Gly) – glicyna; **I** (Ile) – izoleucyna; **ITS** (ang. *Internal Transcribed Spacers*) – transkrybowane sekwencje wewnętrzne; **K** (Lys) – lizyna; **L** (Leu) – leucyna; **N** (Asn) – asparagina; **NLS** (ang. *Nuclear Localization Sequence*) – sekwencje lokalizacji jądrowej; **nt** – nukleotydy; **P** (Pro) – prolina; **R** (Arg) – arginina; **r.a.** – reszta aminokwasowa; **RNaza MRP** (ang. *Mitochondrial RNA Processing*) – RNaza związana ze składaniem mitochondrialnego RNA; **S** (Ser) – seryna; **T** (Thr) – treonina; **U snoRNA** – bogatourydylowy, niskocząsteczkowy, jąderkowy RNA; **U snoRNPs** – bogatourydylowe, niskocząsteczkowe, jąderkowe rybonukleoproteiny; **V** (Val) – walina; **W** (Trp) – tryptofan; **Y** (Tyr) – tyrozyna.

## 1. WSTĘP

Wciąż słabo poznane mechanizmy obróbki pre-rRNA zakładają istotny w nim udział wielu białek, które oznakowano następującymi symbolami: NOP1/fibrylaryna, NOP3, NOP4, GAR1, GAR2, NSR1, SSB1, SNM1, POP1, POP2, POP3, RRP-5 i C23 [43-45, 51, 62, 63, 66, 68, 70, 80, 88, 93, 97, 101, 106, 110]. Eksperymenty wykorzystujące klonowanie genów kodujących wymienione białka, głównie *Saccharomyces cerevisiae* i analiza ich sekwencji aminokwasowej wskazują na występowanie w nich domen wykrytych wcześniej w cząsteczce nukleoliny, opisywanej również symbolem C23 [50, 54-56, 66, 80].

Wspólne elementy strukturalne obejmują:

1<sup>o</sup> domeny wzbogacone w glicynę (G) i argininę (R) (głównie dimetyloargininę), tzw. domeny GAR (ang. *Glycine-Arginine Rich Domains*);

2<sup>o</sup> motywy wiążące RNA (RRM – ang. *RNA Recognition Motif*) o długości około 80 reszt aminokwasowych wraz z sekwencjami zgodności białek wiążących RNA (ang. *RNP consensus sequence*) w postaci oktameru RNPI: EFEDPRDA oraz heksameru RNP2: VYVGNL;

3<sup>o</sup> odcinki wzbogacone w aminokwasy kwaśne, które zawierają sekwencje zgodności charakterystyczne dla kinazy kazeinowej II, tj. DEGMS(P)EDED i p34<sup>cdk2</sup>-SPKK (rys. 1) [13, 24, 35, 41, 68, 80, 97, 112].

Klasyczną domenę GAR zidentyfikowano najpierw w fibrylarynie i białku C23. Okazało się, że szereg białek jąderkowych wykrytych później dzieli ze wspomnianymi fosfoproteinami jąderkowymi zbliżony układ sekwencji, tj. Arg-Gly-Gly-Phe-Arg-Gly-Gly lub Arg-Gly-Gly-Phe-Gly-Gly-Arg (z możliwością podstawienia fenyloalaniny przez Ser, Tyr czy Ala), których funkcję kojarzy się z niespecyficznym wiązaniem jednoniciowych kwasów nukleinowych [97]. W domenach GAR białek jąderkowych arginina może stanowić około 25% wszystkich aminokwasów [7, 38, 97]. Struktura drugo- lub trzyczłonowa tych domen jest silnie zachowawcza. Analizy fragmentu peptydowego (tzw. peptyd p10), obejmującego domenę GAR białka C23, przy zastosowaniu dichroizmu kołowego i transformacji Fouriera widm w podczerwieni sugerują, że przyjmuje on powtarzającą się strukturę  $\beta$ , która umożliwia wiązanie i destabilizację heliksu RNA [36]. Motywy GAR są zlokalizowane w różnych regionach białek jąderkowych i przyjmują właściwą im strukturę drugorzędową, dzięki rozdzielaniu od pozostałej części cząsteczki przez reszty proliny [38, 43, 45, 58, 80, 97].

Rola biologiczna domeny GAR wiąże się z destabilizacją heliksu RNA, który jest następnie kooperatywnie wiązany przez motywy RRM. Inne postulowane funkcje

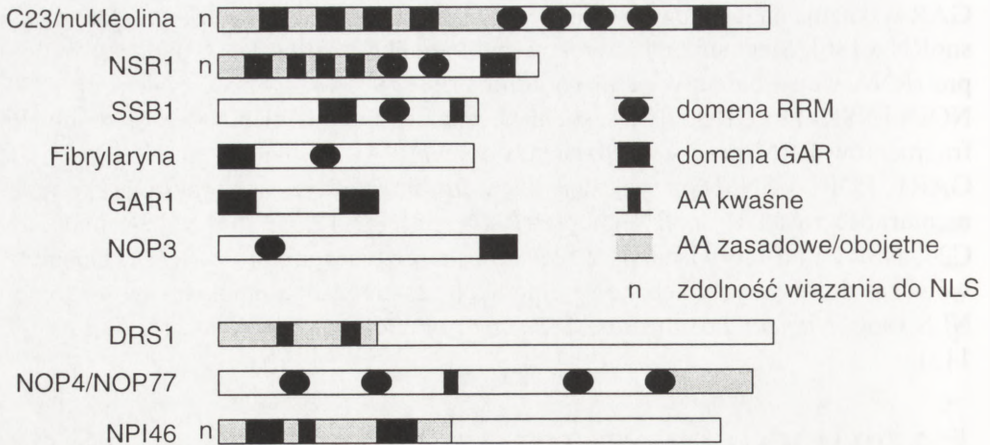
GAR wskazują na jej oddziaływania typu białko-białko lub w jąderkowej lokalizacji snoRNA [36]. Mechanizmy interakcji białko-białko i białko-RNA podczas obróbki pre-rRNA wciąż nie są w pełni wyjaśnione [38, 97, 112]. Część białek, np. C23, NOP4 i NSR1 [13, 51, 80, 101], asocjuje bezpośrednio z pre-rRNA za pośrednictwem fragmentów RRM przy współdziałaniu domen GAR, zaś inne, np. NOP1, SOF1, GAR1, POP1 i SNM1 przyłączają się w formie snoRNP wykorzystując komplementarność zasad U snoRNA i pre-rRNA [38, 43, 44, 62, 63, 93]. Polipeptydy C23, NSR1 i NPI46 wiążą się z białkami już przyłączonymi do rRNA. Dochodzi wówczas do międzycząsteczkowej interakcji zasadowych aminokwasów sekwencji NLS (ang. *Nuclear Localization Sequence*) oraz domen kwaśnych [5, 51, 96, 97, 112].

## 2. BIAŁKA UCZESTNICZĄCE W OBRÓBCE pre-rRNA

Jak dotąd, najlepiej scharakteryzowano składniki rybonukleoproteinowego kompleksu – U3 snoRNP komórek HeLa, który zawiera polipeptydy o m.cz. 12,5, 13, 30, 36 kDa (fibrylaryna), 55 kDa oraz dwa ufosforylowane białka o m.cz. 59 i 74 kDa [81]. Polipeptydy o m.cz. 15, 50 i 55 kDa komórek CHO stanowią elementy rdzeniowe cząstek U3 snoRNP, z kolei fibrylaryna reprezentuje składnik luźno związany z tym kompleksem, łatwo oddysocjujący podczas izolowania. Podczas odbudowy *in vitro* cząstek U3 snoRNP ustalono, że białko p55 łączy się bezpośrednio z snoRNA tego kompleksu, prawdopodobnie w obrębie domen B i C [47, 60]. W laboratorium Lührmanna [61] wydzielono i oczyszczono cząstki snoR30 RNP *S. cerevisiae*. Ich składniki białkowe o m. cz. 10, 23, 25 kDa (GAR1), 38 kDa (NOP1), 46, 48 i 65 kDa sedymentują wspólnie podczas ultrawierwienia w gradiencie gęstości siarczanu cezu. Polipeptyd GAR1 jest silnie i zapewne bezpośrednio związany z snR30, gdyż kompleks ten jest stabilny nawet w 600 mM roztworze KCl.

Dzięki mikroskopii elektronowej oszacowano, że cząstki snR30 RNP o rozmiarach 14x20 nm budują dwie przylegające do siebie domeny. Badania sedymentacyjne ekstraktów komórek HeLa wykazały, że cząsteczki U8 i U13 snoRNA występują w obrębie dwóch rodzajów agregatów o odmiennej stałej sedymentacji, tj. około 10S i 80S. Cząstki 10S reprezentują monomery U snoRNP, zaś 80S stanowią cząstki prerybosomalnych rybonukleoprotein [109].

Stwierdzono, że w obrębie agregatów o stałej sedymentacji około 15-20S i 80S występuje ważny dla obróbki pre-rRNA enzym – RNaza MRP (ang. *Mitochondrial RNA Processing*). W skład wymienionych cząstek wchodzi około 10 indywidualnych białek, wśród których znajdują się SNM1 i POP1 [58, 62, 94].



Rysunek 1. Organizacja domenowa niektórych białek jądrowych uczestniczących w obróbce prekursorowych cząsteczek rRNA (wg [97] zmodyfikowany). Na rysunku uwzględniono: domeny RRM i GAR, odcinki wzbogacone w aminokwasy kwaśne, zasadowe/obojętne oraz eksperymentalnie potwierdzoną zdolność wiązania do sekwencji typu NLS. Rysunek nie uwzględnia przypuszczalnych właściwości wiązania tych białek do NLS, których można oczekiwać na podstawie podobieństwa do układów sekwencji, które taką zdolność okazują

## 2.1. Fibrylaryna (NOP1)

Fibrylaryna (ang. *Nucleolar Protein 1*), wykryta przez Christensena i wsp. [19] u śluzowca *Physarum polycephalum*, zyskała swoją nazwę w laboratorium Buscha [77] ze względu na jej wybiórczą lokalizację w fibrylarnych regionach jąderka ssaków (gęsty składnik fibrylarny i centra fibrylarne).

W 1991 r. Ochs i Smetana [78] dzięki immunomikroskopii elektronowej wykryli to białko w szkielecie jąderka komórek *Xenopus laevis*, kury i człowieka. Odpowiada ono opisywanemu przez innych badaczy zasadowemu białku p34 [59, 98].

Znacząca zawartość tego białka w nieaktywnych transkrypcyjnie erytrocytach kury wskazuje na istnienie przynajmniej dwóch populacji fibrylaryny:

- 1<sup>o</sup> zaangażowanej w proces skracania produktów transkrypcji pre-rRNA oraz
- 2<sup>o</sup> o funkcji związanej z upakowaniem rRNA [78].

Analiza sekwencji cDNA fibrylaryny komórek HeLa potwierdziła, że białko to o m. cz./pI – 38/10,98 buduje 321 reszt aminokwasowych (r.a.) [2]. Opisywany polipeptyd wydzielony z komórek ludzkich wykazuje odpowiednio 67 i 81% homologii z białkiem drożdży i *X. laevis* [1, 2, 43]. W fibrylarynie komórek HeLa wyróżnia się trzy domeny istotne dla jej funkcji [2]. W N-końcu cząsteczki zlokalizowany jest około 70-aminokwasowy segment, bogaty w glicynę i dimetylo-argininę, w centrum około 90-aminokwasowy odcinek, przypuszczalnie odpowiedzialny za wiązanie z RNA oraz w C-końcu – fragment  $\alpha$ -helikalny (ok. 33 aminokwasy). Eksperymenty genetyczne wykazały, że fibrylaryna kręgowców



powoduje supresję mutacji genu *NOP1* u drożdży. Poziomą syntezę 18S i 25S rRNA wraca do wartości obserwowanej w komórkach prawidłowych [43]. Badania temperaturowrażliwych mutantów drożdży uzyskanych po traktowaniu kwaśnym siarczynem (bisulfit) cDNA, kodującego polipeptyd *NOP1* udowodniły, że w temperaturze niepermissyjnej zachodzą zakłócenia syntezy 18S i 25S rRNA [97, 105]. Zbliżone efekty fenotypowe obserwowano po zahamowaniu ekspresji genu *NOP1*, pozostającego pod kontrolą promotora *GAL1* w obecności glukozy. Doświadczenia autoradiograficzne z zastosowaniem [<sup>3</sup>H]-uracylu ujawniły brak intermedatów szlaku obróbki pierwotnego transkrypty 35S rRNA do 18S rRNA, tj. 32S, 27SA i 20S. Na tej podstawie wywnioskowano, że hamowane są reakcje przemian łańcucha pre-rRNA w miejscach obróbki A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub> [por. 47, 93, 96, 105, 106]. Zapewne dochodzi też do utraty stabilności form prekursorowych 18S rRNA, czego wyrazem jest pojawianie się niewielkich ilości 18S rRNA po przedłużeniu czasu inkubacji do 60 minut. Dodatkowym efektem braku ekspresji *NOP1* jest zmniejszona ilość cząsteczek U14 snoRNA i snR190, co osłabia lub eliminuje oddziaływania pre-rRNA – snoRNA [35, 97, 104]. Inne mutanty punktowe genu *NOP1* uzyskane za pomocą bisulfitu wykazują zakłócenia procesu metylacji pre-rRNA. Nie udało się określić, czy efekt ten powoduje nieobecność natywnego białka *NOP1* czy spadek poziomu zasocjowanych z nim cząsteczek U14 snoRNA i snR190. Hamowanie metylacji pierwotnych transkryptów rRNA zaobserwowano dokonując włączenia znakowanej na grupie metylowej [<sup>3</sup>H]-metioniny. Wydaje się jednak, że proces ten nie wywiera bezpośredniego wpływu na dojrzewanie pre-rRNA; reakcji nie blokuje bowiem obecność etioniny [105]. Mutacje genu *NOP1* zakłócają ponadto montaż cząstek prerybosomalnych. W toku analiz sedymentacyjnych zaobserwowano, że 18S i 25S rRNA występują w obrębie prekursorów podjednostek rybosomalnych o stałej sedymentacji niższej niż 40S i 60S. Z kolei wyniki elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE) ujawniły, że nieprawidłowe podjednostki są pozbawione szeregu białek. Następnie podlegają one agregacji i formują struktury o stałej sedymentacji powyżej 80S. Wydaje się, że brak interakcji *NOP1* – pre-rRNA utrudnia bądź uniemożliwia osiągnięcie niezbędnej do przebiegu dojrzewania struktury drugo- i trzeciorzędowej pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I.

## 2.2. Białko *SOF1*

Gen *SOF1* (ang. *suppressor of fibrillar in 1*) zidentyfikowano w toku poszukiwań supresorów obróbki pre-rRNA, wywołanych mutacjami genu *NOP1* [44, 97]. Na podstawie analizy sekwencji cDNA ustalono, że *SOF1* drożdży reprezentuje polipeptyd o m.c. 56,8 kDa, zbudowany z 489 r.a. [44, 105]. Analiza N- (1-82 r.a.) i C- (380-489 r.a.) końców jego łańcucha nie wykazuje homologii z poznanymi dotąd białkami. Segment C-końcowy cząsteczki jest wzbogacony w aminokwasy

obdarzone ładunkami. Okazuje się, że dwa aminokwasy, tj. lizyna i arginina, stanowią aż 34%, natomiast suma aminokwasów kwaśnych (Asp+Glu) – aż 21% składu aminokwasowego opisywanego polipeptydu. W części centralnej łańcucha SOF1 stwierdzono obecność domeny GAR oraz 7 powtórzeń struktury oznakowanej jako  $G_{\beta}$ , stanowiącej łańcuch o długości od 40 do 60 r.a. [68, 97]. Typowe dla tej struktury są dipeptydy: tryptofan-kwas asparaginowy lub tryptofan-asparagina, po których następuje odcinek hydrofobowy i reszta kwasu asparaginowego lub asparaginy w pozycji 6. względem reszty tryptofanu. Analizy porównawcze sekwencji aminokwasowej domeny  $G_{\beta}$  wskazują, że polipeptyd SOF1 zawiera 23% aminokwasów identycznych, a 45% podobnych do białka PRP4, które uczestniczy w organizacji spliceosomów, składaniu pre-mRNA u drożdży i asocjuje z U4/U6 snRNA [44, 68].

Polipeptyd SOF1 jest kolejnym, wykrytym po fibrylarynie supresorem mutacji genu *NOPI* [44, 68]. Okazało się, że w obecności fibrylaryny człowieka wydajnej supresji ulega tylko synteza cząsteczki 25S rRNA, zaś 18S rRNA jest syntetyzowany wolniej, co ustalono pośrednio na podstawie szybkości włączania [ $^{35}\text{S}$ ]-metioniny do podjednostek rybosomów 40S i 60S. Z kolei SOF1 zapewnia prawidłowy poziom syntezy łańcuchów 18S i 25S rRNA oraz podjednostek rybosomów 40S i 60S. Wyniki uzyskane techniką hybrydyzacyjną Northern oraz przez znakowanie pulsowe [ $^3\text{H}$ ]-urydyną wskazują, że blok ekspresji genu *SOF1* powoduje wzrost poziomu formy prekursorowej 35S pre-rRNA i utratę intermediatów jego obróbki, tj. 32S, 27SA i 20S rRNA. Synteza 18S rRNA spada, zaś ilość 25S rRNA nie ulega zmianie [44].

### 2.3. Białko SSB1

W 1986 roku opisano polipeptyd SSB1 (ang. *Single Strand Binding 1*) [15, 45], który nagromadza się w jąderkach oraz ciałach włóknistych (ang. *coiled body*) *S. cerevisiae*. Białko to jest zbudowane z 293 r.a.; jego m. cz. wynosi 32 853 Da, a pI 6,0 [45]. Z analizy składu aminokwasowego wynika, że N-końcowy odcinek cząsteczki SSB1 (39. – 54. r.a.) wykazuje homologię z białkami UPI i UP2 grasicy cielęcia oraz hnRNP człowieka. W centralnej części łańcucha między 125.–162. r.a. występuje domena GAR, w której wykryto pięć powtórzeń heksapeptydu: RGGFRG. Z kolei w C-końcowym segmencie, między 233.–245. aminokwasem, znajduje się odcinek homologiczny do sekwencji zgodności białek wiążących RNA. Na uwagę zasługuje obserwacja, że wśród 18 aminokwasów C-końca polipeptydu SSB1 aż 10 stanowią aminokwasy kwaśne; cecha charakterystyczna dla prokariotycznych białek wiążących jednoniciowy DNA, a także białek eukariotycznych wiążących jednoniciowe RNA i DNA. Wielodomenowa budowa SSB1 sugeruje, że białko to może uczestniczyć nie tylko w obróbce pre-rRNA, ale również w metabolizmie jądrowego/jąderkowego DNA [35, 45, 68, 97].

## 2.4. Białko GAR1

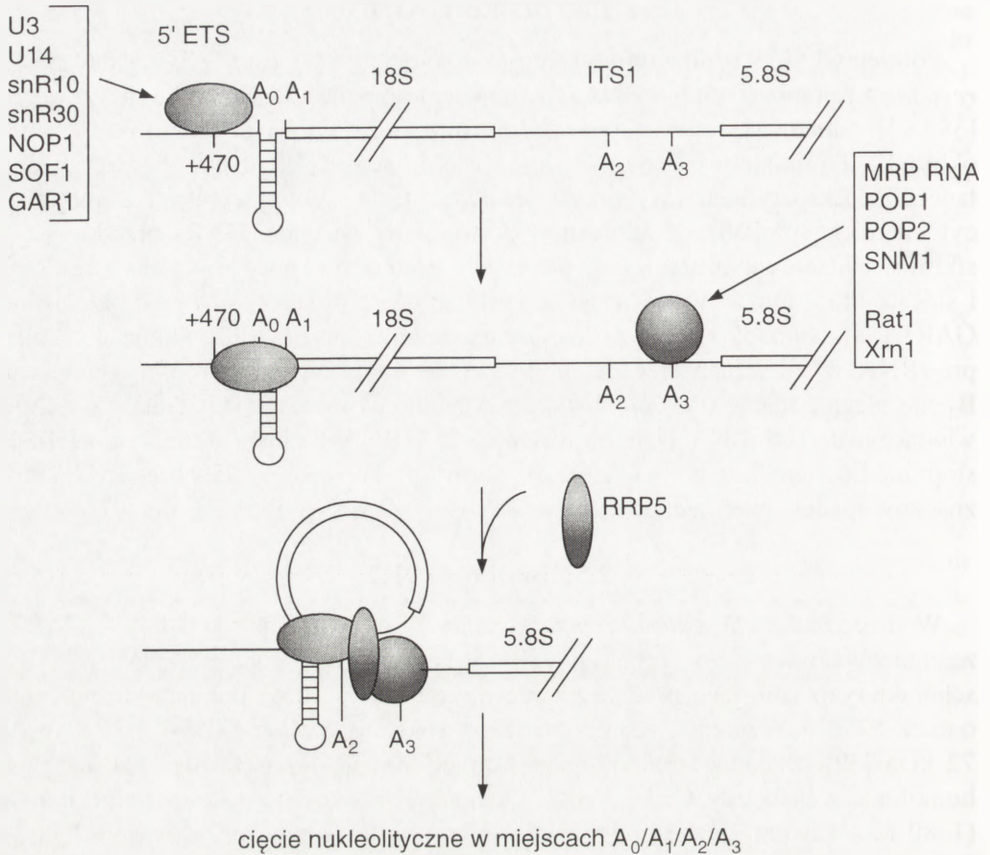
Polipeptyd GAR1 zidentyfikowano jako kolejne po NOP1 i SSB1 białko *S.cerevisiae* za pomocą sondy cDNA, zawierającej domenę GAR fibrylaryny *X.laevis* [38, 97]. Składa się ono z 205 r.a., ma m. cz. 21,5 kDa i silnie zasadowe pI około 12. To unikatowe białko zawiera dwie domeny GAR w N-końcowej części łańcucha. Eksperymenty wykorzystujące metodę immunoprecypitacji i immunocytochemicznej lokalizacji antygenów potwierdziły obecność GAR1 przede wszystkim w ciałach włóknistych oraz jąderkach. Białko to tworzy kompleksy z snR10 i snR30, które można wytrącić wykorzystując przeciwciała skierowane przeciwko GAR1 [38]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że eliminacja GAR1 hamuje składanie pre-rRNA w miejscach cięć nukleolitycznych A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>, zaś obróbka w miejscu B<sub>1</sub> nie ulega zmianie (rys. 2). Dochodzi więc do zatrzymania składania pre-rRNA wiodącego do 18S rRNA. Natomiast synteza 25S rRNA jest hamowana w niewielkim stopniu. Efektem jest gromadzenie się formy prekursorowej 35S pre-rRNA oraz znaczny spadek intermediatów: 32S, 27SA i 20S rRNA [35, 38, 68, 97].

## 2.5. Białko GAR2

W drożdżach *Schizosaccharomyces pombe* opisano kolejny składnik – GAR2, zaangażowany w proces obróbki pre-rRNA. Na podstawie sekwencji cDNA GAR2 scharakteryzowano jego produkt ekspresji, którym jest długi polipeptyd (500 r.a.) o m.cz. 52 kDa. Względna masa cząsteczkowa określona w toku SDS-PAGE wynosi 72 kDa [39]. Badania struktury pierwszorzędowej GAR2 ujawniły znaczną jego homologię z białkami: C23 i NSR1. Odcinek N-końcowy nowoodkrytego białka (1–80 r.a.) zawiera liczne powtórzenia lizyny w otoczeniu aminokwasów hydrofobowych oraz potencjalne miejsca fosforylacji kinazy p34<sup>cdc2</sup>.S<sub>50</sub>PKK. Druga ważna funkcjonalnie domena GAR2 zawiera długie ciągi aminokwasów kwaśnych i seryny, prawdopodobne miejsca fosforylacji przez kinazę kazeinową II. W obrębie kolejnej istotnej domeny GAR2 występują dwa fragmenty wiążące RNA o długości około 80 r.a. wraz z dwoma zespołami sekwencji zgodności białek wiążących RNA. Efektami fenotypowymi eliminacji polipeptydu GAR2 w układzie składania pre-rRNA *in vitro* są spadek poziomu syntezy 18S rRNA i formowania podjednostek rybosomalnych 40S. Natomiast powstawanie formy 25S rRNA nie ulega zakłóceniu [39, 68, 97].

## 2.6. Białko NSR1

Badania immunofluorescencyjne ujawniły, że polipeptyd NSR1 występuje w obrębie jąderka i porów jądrowych *S.cerevisiae* [51, 52, 58]. Interesującą właściwością, wskazującą na jego udział w transporcie jądrowo-cytoplazmatycznym, jest wiązanie sekwencji NLS dużego antygeny T wirusa SV40 i histonu H2B, co potwierdzono w toku chromatografii powinowactwa [51, 52, 70]. Białko NSR1 wspomnianych



Rysunek 2. Model interakcji pierwotnego transkryptu polimerazy RNA I *S.cerevisiae* z wieloskładnikowymi kompleksami rybonukleoproteinowymi podczas jego obróbki (wg Tollerveya [106]; za zgodą Autora). Wieloskładnikowy kompleks zawierający: U3, U14 snoRNA, snR10 i snR30 oraz białka zasocjowane z nimi, tj. NOP1, SOF1 i GAR1 wiąże się z 5'ETS pierwotnego transkryptu wokół regionu rozpoznawanego przez U3 snoRNA (+470 nt). Wtedy jest przenoszony do miejsc: A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>. Miejsca A<sub>0</sub> i A<sub>1</sub> pozostają w bliskim sąsiedztwie w pre-rRNA dzięki utworzonej w nim stabilnej strukturze typu pień-pętla, zaznaczonej na rysunku. Podczas obróbki do pierwotnego transkryptu przyłącza się kompleks RNazy MRP w miejscu A<sub>3</sub>, zlokalizowanym w jego ITS1, pozostając przypuszczalnie w asocjacji z egzonukleazami Rat1 i Xrn1. Wysokocząsteczkowe białko RRP5 stanowi prawdopodobnie czynnik wiążący obydwie opisywane kompleksy w czasie procesu obróbki pre-rRNA

drożdży stanowi łańcuch 414 r.a. o m.c.z. 44 535 Da. Natomiast jego masa cząsteczkowa określona techniką SDS-PAGE wynosi 67 kDa [58, 97]. W cząsteczce NSR1 wykryto trzy domeny funkcjonalne. Analiza sekwencyjna potwierdziła występowanie w N-końcu jego cząsteczki pięciu peptydów, z których każdy składa się z 7 reszt seryny w otoczeniu aminokwasów kwaśnych. Grupy hydroksylowe seryny w tym regionie reprezentują potencjalne miejsca modyfikacji przez kinazę

kazeinową II. W opisywanym fragmencie NSR1 wykryto ugrupowanie aminokwasów: KKRKS, prawdopodobnie odpowiadające sekwencji NLS. Część centralna cząsteczki, w której zlokalizowano dwa motywy RRM (169.–238. r.a. i 268.–347. r.a.) o długości około 80 aminokwasów może być rozpatrywana jako region uczestniczący w dojrzewaniu pre-rRNA. Pozostaje jednak sprawą otwartą, czy bezpośrednio oddziałuje on z RNA. W C-końcu łańcucha zlokalizowano domenę GAR (351.–391. r.a.). Obecnie uważa się, że NSR1 jest homologiem nukleoliny kręgowców. Okazało się, że region centralny i C-końcowy cząsteczki NSR1 drożdży zawiera 37% identycznych i aż 51% podobnych reszt aminokwasowych z analogicznym segmentem wspomnianej fosfoproteiny jądrowej organizmów wyższych [58].

Delecja genu *NSR1* w doświadczeniach genetycznych prowadzi do zahamowania syntezy 18S rRNA, zaś stosunek 18S/25S rRNA zmniejsza się trzykrotnie, tj. z około 0,45 do 0,15. Wzrasta poziom pierwotnego transkryptu 35S rRNA, natomiast zmniejsza się ilość intermediatów obróbki 27SB, 20S i 7S rRNA. Dochodzi do hamowania przemian pre-rRNA w miejscach cięć nukleolitycznych A<sub>1</sub> i A<sub>2</sub>. Z kolei cięcie w miejscu B<sub>1</sub> odbywa się bez zakłóceń. Defekty obróbki pre-rRNA można usunąć przywracając prawidłową ekspresję genu *NSR1* [51, 52, 97]. Stwierdzono, że NSR1 odgrywa istotną rolę w obróbce pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I podczas szoku termicznego, indukowanego niską temperaturą [52]. Spadek temperatury z 30°C do 10°C przyczynia się do około 4-krotnie wyższej ekspresji genu *NSR1* i około 3-krotnego podwyższenia poziomu białka NSR1 u *S.cerevisiae* [35, 52, 97]. Polipeptyd ten wiąże się zarówno z pre-rRNA, jak i z białkami rybosomalnymi, zapewne ułatwiając ich interakcje [112].

## 2.7. Białko NOP3

Gen *NOP3 S.cerevisiae* koduje białko (415 r.a.) o m.cz. 45 kDa [88, 97]. W C-końcu jego cząsteczki zidentyfikowano domenę GAR, liczącą około 100 r.a. Okazało się, że ten fragment białka NOP3 zawiera aż 72% podobnych, a 62% identycznych aminokwasów z analogicznym regionem GAR fibrylaryny. Wyniki badań hybrydacyjnych udowodniły, że zahamowanie ekspresji genu *NOP3* pozostającego pod kontrolą promotora GAL : *nop3* w obecności glukozy powoduje nagromadzenie pierwotnych transkryptów 35S oraz intermediatów 27SB i 20S rRNA, a także spadek poziomu dojrzałych form 18S i 25S rRNA. Taki stan przyczynia się do ograniczenia formowania dojrzałych cząstek rybosomów, co potwierdzono nasileniem włączania [<sup>32</sup>S]-metioniny do podjednostek rybosomalnych 40S i 60S [35, 68, 88, 97].

## 2.8. Białko NOP4/NOP77

Ekspresja cDNA *NOP4* prowadzi do utworzenia łańcucha polipeptydowego o długości 685 r.a. Jego m.cz. wynosi 77 824 Da, a pI 9,8 [97, 101]. Silnie zasadowy punkt izoelektryczny powoduje, że m. cz. białka oznaczona w toku SDS-PAGE jest znacznie wyższa od tej wynikającej z ilości r.a. i wynosi około 100 kDa. W N-końcu cząsteczki opisywanego polipeptydu, między 28. a 358. aminokwasem występują trzy tandemowe powtórzenia motywów RRM, natomiast w segmencie między 250. a 267. r.a. przeważają aminokwasy kwaśne (na 18 aż 14 to kwas asparaginowy i glutaminowy). Motywy RRM 1. i 3. zawierają prototypy sekwencji zgodności białek wiążących RNA, tj. RNP1: RGFGFVSF i KGTAFAVF oraz RNP2: LFVRSI i VFVRNV. Ugrupowania RNP1 i RNP2 w RRM 2. i 4. są mniej konserwatywne i mogą w nich mieć miejsce podstawienia reszt aminokwasowych, np. Phe/Tyr 2, Gly/Lys 4 czy Leu/Ile 6 w RNP2. Motyw RRM 4. występuje w C-końcu cząsteczki NOP4 między 533.–574. r.a.; ta część łańcucha jest wzbogacona w aminokwasy obdarzone ładunkiem elektrycznym. Wśród 68 C-końcowych aminokwasów aż 24 stanowią arginina i lizyna, zaś 13 – kwas asparaginowy i glutaminowy. Zespoły sekwencji: KRTR, KRRR, KKPCK i KRKRK obecne w tym regionie rozpatruje się jako potencjalne sekwencje NLS. Obecność kilku motywów RRM w białku NOP4 stwarza dlań możliwość oddziaływania z więcej niż jedną cząsteczką RNA. Wydaje się, że nie asocjuje ono z żadnym uczestniczącym w obróbce pre-rRNA snoRNA, gdyż przeciwciała skierowane przeciwko temu białku nie precypitują ani U3, U14 snoRNA, ani snR10. Asocjacja NOP4 z snR190 występuje dopiero po indukcji wiązań krzyżowych RNA-białko za pomocą psoralenu i naswietleniu promieniami UV.

Blokowanie ekspresji genu *NOP4* pozostającego pod kontrolą promotora GAL-1–NOP4 w środowisku zawierającym glukozę hamuje pojawianie się intermediatów obróbki 25S rRNA, tj. 32S, 27SA i 27SB. Ponadto nie dochodzi do tworzenia podjednostek rybosomalnych o stałej sedymentacji 60S [101]. Poziom syntezy 25S rRNA w jądrze komórkowym jest około 15-krotnie niższy od 18S rRNA, którego dojrzewanie nie ulega zakłóceniu. Przebieg metylacji pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I również nie wykazuje zmian [68, 97, 101, 112].

## 2.9. Białko C23/nukleolina

Klonowanie i sekwencjonowanie cDNA dla C23 wskazuje na złożoną i wielodomenową budowę tego białka [50, 54-56, 66, 80, 97]. Część N-końcowa (1-283 r.a.) opisywanego polipeptydu zawiera naprzemienne ciągi aminokwasów zasadowych i kwaśnych wraz z sekwencjami zgodności kinazy kazeinowej II. Natomiast w jego regionie centralnym (284-649 r.a.) występują cztery motywy RRM, zaś w C-końcowym (650-713 r.a.) – domena GAR [50, 54, 80, 97]. Białko to wiąże *in vitro* jednoniciowe odcinki DNA z wyjątkiem poli(dA) oraz dwuniciowe – d(G, C).

Ten jąderekowy polipeptyd uczestniczy również w reasocjacji komplementarnych sekwencji DNA. Zapewne *in vivo* fosfoproteina C23 wiąże się z sekwencjami ITS rDNA, które są wzbogacone w pary AT [80, 90, 91]. Tę właściwość wykazują odcinki DNA zasocjowane z matryks jądrową [75, 102], tzw. MAR (ang. *Matrix Attached Regions*). Pozostają one częściowo niesparowane [8, 9, 79], zaś C23 cechuje zdolność preferencyjnego wiązania z jednoniciowymi odcinkami MAR [22]. Z kolei motywy RRM, uwolnione w czasie traktowania bromocyjanem (CNBr) centralnej części łańcucha C23, asocjują z 18S i 28S rRNA [13]. Segment N-końcowy C23 nie wiąże kwasów nukleinowych, natomiast uczestniczy w elektrostatycznej interakcji z zasadowymi domenami histonów chromatyny jąderekowej, ułatwiając jej destabilizację i przebieg transkrypcji rDNA [50, 80, 91, 97].

Nagromadzenie polipeptydu C23 na granicy: centrum fibrylarne/gęsty składnik fibrylarny jąderek, uznawanej za miejsce transkrypcji rDNA, sugeruje jego udział w tym procesie [42, 67, 82, 83, 92]. Ponadto, ta ważna fosfoproteina jąderekowa wydaje się odpowiadać za regulację poziomu syntezy pre-rRNA, szybkość jego obróbki i organizację podjednostek rybosomalnych [10, 11, 80, 97]. Eliminacja tego kluczowego w aktywności jąderek białka za pomocą przeciwciał monoklonalnych powoduje wzrost syntezy 38S pre-rRNA u *Chironomus tentans* [25].

## 2.10. Białko RRP5

W ubiegłym roku w laboratorium Tollerveya [110] zidentyfikowano unikatowy gen *RRP5*, kodujący białko wysokocząsteczkowe o naturze kwasowej (1729 r.a., m.c. 193 kDa), nieodzowne dla żywotności *S.cerevisiae* [106, 110]. Okazało się, że homologiczne polipeptydy występują również w organizmach tak odległych jak człowiek i *Caenorhabditis elegans*. Analiza struktury pierwszorzędowej cząsteczki RRP5 z tych trzech organizmów wykazuje 29% identyczności oraz rozległe, aż 52% podobieństwo wśród budujących je aminokwasów. Najbardziej konserwatywny okazał się C-końcowy region, w którym odnotowano 47% identyczności, a 66% podobieństwa w obszarze 280 r.a. między opisywanym polipeptydem drożdży i człowieka. Ta konserwatywność ewolucyjna znajduje zapewne funkcjonalne potwierdzenie na poziomie komórkowym. Badania z zastosowaniem techniki Northern wykazują, że hamowanie ekspresji *RRP5* powoduje silny spadek syntezy 18S RNA i nieco mniejszy 25S rRNA oraz 5,8S rRNA. Miejsca zakłóconej obróbki zidentyfikowano na podstawie analiz intermedatów dojrzewania 35S pre-rRNA. Prekursorowe cząsteczki 35S pre-rRNA ulegają nagromadzeniu wskutek braku obróbki w miejscu cięcia  $A_0$ . Mogą one jednak podlegać cięciu w obrębie ITS2, przy braku towarzyszących reakcji obróbki w miejscach  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  i  $A_3$ , co prowadzi do powstania nieprawidłowych form 24S rRNA [106, 110]. Z kolei bardzo silny spadek poziomu 32S i 20S świadczy o bloku przemian pre-rRNA w miejscach cięcia  $A_1$

i A<sub>2</sub>. Hamowana jest reakcja dojrzewania pierwotnego transkryptu w miejscach obróbki A<sub>3</sub>, co prowadzi do obniżonej syntezy formy 27SB rRNA [47, 106].

Białko RRP5 jest zatem wyjątkowym składnikiem, który uczestniczy w reakcjach cięć nukleolitycznych A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub> prekursorowej cząsteczki rRNA drożdży. Ich równoczesne hamowanie wskazuje, że białko RRP5 pełni rolę molekularnego łącznika (ang. *bridging factor*) między dwoma wieloskładnikowymi kompleksami, zbudowanymi z snoRNP i białek o funkcji enzymatycznej oraz nie asocjujących z snoRNA, tworzonymi w strategicznych miejscach obróbki pre-rRNA (rys. 2) [106, 110], dla których Fournier i Maxwell zaproponowali nazwę wynikającą przede wszystkim z pełnionej funkcji – procesosom [33, 35].

### 3. ENZYMY UCZESTNICZĄCE W OBRÓBCE pre-rRNA

W przemianach prekursorowych cząsteczek rRNA uczestniczy wiele enzymów, wśród których wymienia się metylotransferazy, egzo- i endorybonukleazy, helikazy RNA zależne od ATP, izomerazy *cis-trans* wiązania peptydylo-proliłowego oraz wieloskładnikowy kompleks RNazy MRP [5, 21, 26-34, 53, 71, 80, 86, 87, 97, 99].

#### 3.1. Metylotransferazy

W komórkach guza wysiękowego Ehrlicha myszy wykryto i częściowo scharakteryzowano jądrową 2'-*O*-metylotransferazę o m.c. 145 kDa, która przenosi grupy metylowe z *S*-adenozylometioniny na grupę 2'-hydroksylową rybozy [29, 30, 32, 53, 80]. Enzym ten modyfikuje syntetyczne homorybopolimery, oraz 18S i 28S rRNA, wykazując przy tym najwyższą aktywność wobec fragmentów poli(C). Wnikliwe badania przebiegu metylacji 28S rRNA, zsyntetyzowanego *in vitro* ujawniły, że opisywany enzym wybiórczo metyluje trinukleotydy AGC w obrębie jednoniciowego łańcucha RNA, który łączy dwie domeny 28S rRNA o silnie konserwatywnej strukturze drugorzędowej. Centrum aktywne tego enzymu wiąże *S*-adenozylhomocysteinę (SAH; K<sub>α</sub> = 0,17 μM) w podobnym stopniu jak *S*-adenozylometioninę (SAM; K<sub>α</sub> = 0,24 μM). Spadek wartości ilorazu SAM/SAH w komórkach nowotworu myszy hamuje enzym, który wydaje się być zaangażowany w regulację tempa ich wzrostu i poziomu syntezy rybosomów [32, 80].

Z kolei metylotransferaza o m.c. 30 kDa, wydzielona z wątroby szczura modyfikuje zarówno 2'-hydroksylowe grupy rybozy, jak i zasady purynowe i pirymidynowe rRNA oraz tRNA. Aktywność tego enzymu jest wiązana z jądrowym antygenem komórek proliferujących człowieka – p120, zidentyfikowanym w komórkach HeLa [53].



Wydaje się, że dla prawidłowego przebiegu obróbki łańcucha pre-rRNA wymagana jest jedynie obecność metylotransferaz w obrębie makromolekularnych kompleksów – procesosomów, a nie ich aktywność enzymatyczna. Wskazują na to wyniki badań nad dimetylazą DIM1 z *S.cerevisiae*, która modyfikuje w pozycjach 2. i 6. pierścienia purynowego dwa nukleotydy adenylowe, tj. w pozycjach 1779. i 1780. 3' końca łańcucha 18S rRNA. Zablockowanie ekspresji genu DIM1 hamuje obróbkę pre-rRNA, jednak wznowienie jego aktywności i ekspresja białka DIM1 umożliwia prawidłowy przebieg dojrzewania pierwotnych transkryptów rRNA, pomimo mutacji przez podstawienie adeniny guaniną, która blokuje przebieg metylacji. Interakcje białka DIM1 z pre-rRNA lub białkami procesosomu są zatem istotne dla zachowania prawidłowej struktury i funkcji tego wieloskładnikowego kompleksu (cyt. wg [70]).

### 3.2. Nukleazy

W dojrzewaniu cząsteczki pre-rRNA uczestniczy bezpośrednio zespół jąderkowych egzo- i endorybonukleaz [31, 34, 71, 99]. Dotychczas nie poznano w pełni mechanizmu ich interakcji ze składnikami procesosomu. Na wyjaśnienie czeka również sposób precyzyjnego wyboru miejsc „cięcia” pre-rRNA wobec braku aktywności endonukleazowej większości poznanych U snoRNA [3, 4, 34, 35]. Część wymienionych problemów znalazła swoje rozwiązanie w toku doświadczeń nad RNazą II i III. Enzymy te zidentyfikowano w komórkach guza Ehrlicha myszy i *S.cerevisiae* [27, 28, 31, 34, 80, 99]. RNaza II (m.cz. 50–52 kDa) wykazuje aktywność endorybonukleazy, która degraduje z jednakową szybkością fragmenty jednoniciowego RNA: poli(C), poli(A) i poli(U), ale nie ma zdolności degradacji dupleksów poli(C)-poli(I) lub poli(A)-poli(U), co ujawniło trawienie fragmentów 5,8S rRNA *S.cerevisiae* [27, 80]. Wspomniana endorybonukleaza tworzy *in vitro* kompleksy z odcinkiem 5' ETS pre-rRNA myszy, w którym miejsca obróbki zlokalizowano w pozycji +650 wraz z otaczającymi odcinkami RNA [31]. Delecja fragmentu 5' ETS zapobiega powstawaniu kompleksów. Interakcje 5' ETS pre-rRNA – białko potwierdzono za pomocą:

1<sup>o</sup> wirowania w gradiencie sacharozy,

2<sup>o</sup> tworzenia wiązań krzyżowych RNA-białko po działaniu psoralenem i promieniami UV oraz

3<sup>o</sup> spowolnienia ich migracji w żelu poliakrylamidowym (ang. *gel shift assay*).

Analiza składu białkowego tych kompleksów wykazała obecność trzech komponentów o m.cz. 50, 48 i 45 kDa, z których pierwszy cechuje aktywność endorybonukleazy, zaś pozostałe to produkty jej degradacji. Należy zaznaczyć, że wykryty enzym jest zdolny do cięcia pierwotnego transkryptu rRNA, nawet po usunięciu U snoRNA [31]. Endorybonukleaza – RNaza II uczestniczy w dojrzewaniu 3' końca pre-rRNA zsyntetyzowanego *in vitro* (zawierającego 3' końcowy region 18S rRNA

i odcinek ITS1). Enzym dokonuje cięcia w trzech pozycjach, tj. 3' końca cząsteczki 18S rRNA oraz w odległości 35 i 55 nt od tego miejsca w obrębie ITS1 [99].

Brak katalitycznej roli U3 snoRNA i udział RNazy III w dojrzewaniu pre-rRNA stwierdzono u *S. cerevisiae*. W badaniach wykorzystano temperaturowrażliwy allel genu *RNT1*, kodujący RNazę III. Analiza porównawcza poziomu intermediatów obróbki 35S pre-rRNA w linii „dzikiej” oraz zmutowanej przeprowadzona metodą Northern sugeruje, że RNaza III inicjuje *in vivo* obróbkę w miejscu A<sub>0</sub> 5'ETS oraz 3'ETS w odległości 21 nt od końca łańcucha 28S rRNA. Klonowanie i zsekwencjonowanie cDNA kodującego RNazę III doprowadziło do poznania jej struktury pierwszorzędowej (473 r.a.) [34]. Udało się stwierdzić homologię tego białka u *E. coli* i *Schizosaccharomyces pombe*. Segment C-końcowy RNazy III *S. cerevisiae* (230 r.a.) wykazuje 20 i 23% r.a. identycznych z analogicznym enzymem odpowiednio *E. coli* i *S. pombe*. Enzym tych organizmów zawiera domeny wiążące dwuniciowy RNA oraz motyw sekwencyjny: HNERLEFLGDS. Należy podkreślić, że RNaza III uzyskana drogą inżynierii genetycznej jest zdolna *in vitro* dokonywać cięć w obrębie syntetycznych 5'ETS i 3'ETS, nawet w nieobecności U3 snoRNA, bezwzględnie wymaganego dla obróbki miejsca A<sub>0</sub> w obrębie 5'ETS *in vivo*. Takie rezultaty przemawiają za tym, że U3 snoRNA nie pełni *in vivo* funkcji katalitycznych, lecz jedynie strukturalne. Można oczekiwać, że interakcje U3 snoRNA z pre-rRNA *in vivo* zabezpieczają pierwotne transkrypty przed przyjęciem konformacji, która nie jest efektywnie rozszczepiana przez RNazę III, tj. ekspozuje miejsce obróbki A<sub>0</sub> dla enzymu w procesosomach. Alternatywny model zakłada, że U3 snoRNA nie pełni roli „molekularnej opiekunki” (ang. *chaperone*), lecz jest raczej bezpośrednio zasocjowany z RNazą III i w ten sposób oddziałuje z pre-rRNA *in vivo* [34].

W degradacji odcinków ITS i ETS, wycinanych podczas obróbki pre-rRNA, uczestniczą także egzorybonukleazy jąderkowe [28, 71, 80]. W komórkach guza Ehrlicha zidentyfikowano enzym o m.cz. 76 kDa, który atakuje 5' zakończenie jednoniciowego RNA [57, 80]. Z komórek tego nowotworu wydzielono ponadto egzorybonukleazę o m.cz. 100 kDa, charakteryzującą się zdolnością degradacji liniowych dupleksów lub fragmentów jednoniciowego RNA w kierunku 3'→5' [28, 80]. Aktualnie znany jest mechanizm dojrzewania 3' końca łańcucha 5,8S<sub>S</sub> i 5,8S<sub>L</sub> rRNA (por. [47]). Proces ten obejmuje egzonukleolityczną degradację odcinka o długości około 140 nt przy 3' końcu jego form prekursorowych, tj. 7S<sub>S</sub> i 7S<sub>L</sub> rRNA przez produkt genu *RRP4* o m.cz. 39 kDa [71]. Białko to wykazuje *in vitro* aktywność 3'→5' egzorybonukleazy. Zapewne ten mechanizm obróbki 3' końca 5,8S rRNA jest konserwatywny ewolucyjnie. Porównanie sekwencji aminokwasowej białka *RRP4* *S. cerevisiae* oraz *S. pombe* i człowieka wskazuje na występowanie odpowiednio 52 i 43% identycznych aminokwasów.

Z kolei w dojrzewaniu 5' końca 5,8S rRNA uczestniczą słabo poznane egzorybonukleazy, opisywane symbolami Xrn1 i Rat1 (rys. 2) [40, 106].

### 3.3. Izomerazy

W przemianach prekursorowego łańcucha rRNA i organizacji podjednostek rybosomów wydają się uczestniczyć jąderkowe enzymy o aktywności izomeraz, katalizujących odwracalną konwersję wiązania peptydylo-prolinowego *cis-trans*. Ta aktywność wydaje się być istotna we właściwym zwijaniu łańcuchów polipeptydowych [5, 21, 96, 97, 112], w procesach montażu cząstek pre-rRNP, obróbki pre-rRNA i w organizacji procesosomów [5, 96, 112].

Izomerazy wiązania peptydylo-prolinowego wiążą leki immunosupresyjne – cyklosporynę A i rapamycynę (FK506), które są ich inhibitorami. Na tej podstawie określa się je jako białka FKBP (ang. *FK506 binding protein*) lub cyklofiliny [12, 21]. Immunosupresja wywołana tymi związkami nie wynika z hamowania aktywności wymienionych izomeraz, lecz z blokowania zależnej od  $Ca^{2+}$ /kalmoduliny fosfatazy serynowo-treoninowej – kalcyneuryny [12]. W następstwie dochodzi do zatrzymania dojadrowego importu podjednostki cytoplazmatycznej czynnika transkrypcyjnego NF-AT, wymaganego do ekspresji genów związanych z aktywacją limfocytów T [12, 21].

Białko FPR3 (ang. *FK506 Binding Protein Rotamase 3*), opisywane również symbolem NPI46 (ang. *Nucleolar Proline Isomerase 46 kDa*), wykryto w jąderkach *S. cerevisiae* [5, 21, 96]; buduje go 413 r.a. (m. cz. 46 kDa). Enzym FPR3/NPI46 asocjuje z sekwencją NLS histonu H2b. Ta właściwość została wykorzystana w jego izolowaniu z ekstraktów drożdży w toku chromatografii powinowactwa [96]. W N-końcowym segmencie FPR3/NPI46 zidentyfikowano trzy regiony wzbogacone w aminokwasy kwaśne i dwa odcinki zasadowe. W obrębie domen kwaśnych występuje również duża ilość seryny i treoniny, które podlegają *in vitro* fosforylacji przez kinazę kazeinową II [5, 96]. W jednym z odcinków zasadowych występuje dwuczęściowa sekwencja NLS: KKRK i KKAKK. C-końcowy fragment łańcucha opisywanego białka o długości 106 r.a. jest w ponad 40% identyczny z analogicznymi regionami białek rodziny FKBP, wydzielonymi z komórek człowieka, drożdży i *Neurospora crassa* [5]. Z C-końcowym odcinkiem polipeptydu FPR3 (o długości 134 r.a.) wiąże się stwierdzona *in vitro* jego aktywność izomerazy *cis-trans* wiązania peptydylo-prolinowego. Zahamowanie ekspresji genu *FPR3/NPI46* nie wywiera znaczącego wpływu na poziom syntezy 18S i 25S rRNA, wywołuje jednak nieznaczne nagromadzenie formy prekursorowej 35S pre-rRNA. Reakcja izomeryzacji wiązania peptydylo-prolinowego zachodzi z niewielką szybkością *in vivo*, nawet w nieobecności FPR3/NPI46. Zapewne enzym odgrywa istotną rolę w zmianach konformacyjnych białek, podczas zakłóceń metabolizmu komórkowego, np. szoku indukowanego niską lub podwyższoną temperaturą. Izomeraza FPR3/NPI46 umożliwia wówczas prawidłowe ułożenie białek jąderkowych uczestniczących w obróbce pre-rRNA, tworzenie procesosomów lub eksport rRNP do cytoplazmy. Istnieje

duże prawdopodobieństwo, że enzym asocjuje wtedy z sekwencjami NLS białek jąderkowych [5, 96, 112].

### 3.4. Helikazy RNA

Równie istotny wpływ na przebieg biogenezy rybosomów wywierają zależne od ATP helikazy RNA przez wpływ na rozmieszczenie odcinków jednoniciowego RNA w obrębie pierwotnych transkryptów i cząsteczek różnych sno-RNA. Ich aktywność jest niezbędna w destabilizacji kompleksów snoRNA–snoRNA i snoRNA–pre-rRNA, po zakończeniu serii wydarzeń związanych z dojrzewaniem pierwotnych transkryptów rRNA [86, 87, 89, 97].

#### Białko DRS1

Białko DRS1 należy do rodziny, która jak dotąd liczy 7 członków (DRS 1 – 7), niezbędnych w powstawaniu rybosomów u *S.cerevisiae* [86, 87, 97]. Jest ono zbudowane z 722 r.a. (m.cz. oznaczona techniką SDS-PAGE wynosi 116 kDa). Polipeptyd ten charakteryzuje wysoka zawartość aminokwasów kwaśnych w N-końcu cząsteczki (1-172 r.a.), osiągająca aż 34% [86]. Z kolei w regionie zawartym między 238. a 582. r.a. znajdują się domeny homologiczne z poznanymi dotąd helikazami RNA, w tym motyw DEAD [86, 97]. Mutacje genu *DRS1* powodują spadek poziomu syntezy 25S rRNA, nie okazują wpływu na tworzenie cząsteczek 18S rRNA z formy prekursorowej 20S rRNA. Towarzyszące temu zmniejszenie ilości podjednostek rybosomalnych 60S w porównaniu z 40S potwierdzono podczas wirowania w gradiencie sacharozy [86].

#### Białko DRS2

Inne białko tej rodziny – DRS2 hamuje przemianę 20S do 18S rRNA i przyczynia się do zmniejszenia ilości podjednostek rybosomalnych 40S. Dzięki otrzymaniu klonu cDNA *DRS2* i jego zsekwencjonowaniu ustalono, że kodowane przezeń białko wykazuje właściwości zbliżone do transmembranowej ATPazy zależnej od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [87].

#### Białko SPB4

Z kolei inne białko o aktywności helikazy – SPB4 (m.cz. 69,4 kDa, pI 9,9) zawiera 606 r.a. [89, 97]. Jego homologia z pozostałymi polipeptydami rodziny SPB w obrębie konserwatywnej domeny o długości 370 r.a. osiąga około 25%. Enzym SPB4 zawiera aż 38 z 48 konserwatywnych aminokwasów. Mutacje w genie *SPB4* powodują około 2,5-krotny spadek syntezy cząsteczek 25S rRNA, nie

okazując wpływu na ilość tworzonego 18S rRNA. Jego rolę wiąże się ze sprawowaniem kontroli szybkości formowania podjednostek 60S z 25S rRNA i białek. Blokowanie ekspresji kodującego je genu powoduje zakłócenia rozmieszczenia fragmentów jednoniciowych w obrębie 25S rRNA, co przyczynia się do zmiany składu i wielkości podjednostek rybosomalnych o stałej sedymentacji 60S [89].

### 3.5. Kompleks RNazy MRP

Bardzo istotnym wydarzeniem, które zaważyło na stworzeniu podstaw modelu obróbki pierwotnego transkryptu polimerazy RNA I było wykrycie RNazy MRP [17, 18]. Aktywność tego enzymu początkowo kojarzono z atakiem na RNA komplementarny do mitochondrialnych miejsc inicjacji replikacji DNA w komórkach kręgowców [18, 72, 84]. Szacuje się, że aż około 90% RNazy MRP występuje w jąderkach [49, 85, 113]. W skład tego niezwykłego enzymu obok RNA, którego łańcuch zawiera od 260 do 340 nt [84], wchodzi białka SNM1 i POP1, opisane niemal równocześnie przez Lygerou i wsp. [62] oraz Schmitta i Claytona [93]. Ponadto w ostatnich publikacjach z laboratorium Tollerveya [23, 106] przedstawiono sygnałne informacje o dodatkowych polipeptydach warunkujących aktywność RNazy MRP, tj. białkach opisanych symbolami POP2 i POP3. W drożdżach *S.cerevisiae*, w których jak dotąd najlepiej poznano szczegóły przebiegu dojrzewania pre-rRNA, RNaza MRP dokonuje cięcia w obrębie ITS1 transkryptu, tj. w miejscu A<sub>3</sub> (rys. 2). Jej aktywność jest bezwzględnie potrzebna do właściwej obróbki 5' końca 5,8S rRNA [20, 62, 72, 94, 95].

#### Białko SNM1

Białko SNM1 (ang. *Suppressor of Nuclear Mitochondrial endoribonuclease 1*) okazało się pierwszym zidentyfikowanym składnikiem, zasocjowanym z RNazą MRP *in vivo* [93]. Badania ultrastrukturalne przyczyniły się do wykrycia na prawym ramieniu chromosomu IV *S. cerevisiae* genu *SNM1*. Klon cDNA dla SNM1 koduje niskocząsteczkowe (m.c. 22,5 kDa) białko o długości 198 r.a. [93]. W N-końcu (1-35 r.a.) jego cząsteczki występują serie powtórzeń leucyny (6-8), które mogą tworzyć strukturę zamka leucynowego i w ten sposób uczestniczyć w dimeryzacji białka SNM1. W części centralnej łańcucha (61-109 r.a.) zidentyfikowano dwa ugrupowania cysteiny, zdolne do wiązania jonów Zn<sup>2+</sup> *in vitro*. W C-końcu łańcucha polipeptydowego (136-198) obserwuje się zwiększoną zawartość seryny i arginy (odpowiednio 15 i 16 r.a.). Wysoka reprezentacja tych aminokwasów została wykryta w tzw. domenie SR, typowej dla białek spliceosomów, związanych ze składaniem pre-mRNA [48, 64, 65, 68, 93, 103, 114].

Okazało się, że SNM1 powoduje supresję mutacji genu *NME-1*, który koduje RNA RNazy MRP *S.cerevisiae* i przywraca wyjściowy poziom syntezy 5,8S rRNA

[68, 93]. Aktualnie uważa się, że SNM1 należy obok TFIIIA do białek, które wiążą rRNA za pomocą motywu „palca cynkowego” (cyt. wg [24]).

### Białko POP1

Na lewym ramieniu chromosomu XIV *S. cerevisiae* zidentyfikowano, a następnie sklonowano gen *POP1*, którego ekspresja dostarcza polipeptydu zbudowanego z 876 r.a. (m.cz./pI 100,5/9,8). Na uwagę zasługuje, że homologi białka POP1 u ludzi i *Caenorhabditis elegans* cechują inne parametry długości łańcucha i m.cz./pI, odpowiednio: 1024 r.a., 114/9,86 i 746 r.a., 86,2/10,42. Okazało się, że POP1 człowieka (hPOP1) jest autoantygenem, który zawiera determinanty wspólne z antygenem Th [62, 63, 68]. Analiza struktury pierwszorzędowej trzech opisanych białek POP1 wskazuje na ich ograniczoną konserwatywność ewolucyjną. Dla pełnienia funkcji hPOP1 okazały się istotne trzy krótkie, konserwatywne fragmenty:

1<sup>o</sup> – odcinek bogaty w argininę w N-końcu łańcucha między 133. a 159. r.a.; dodatni ładunek elektryczny umożliwił jego asocjację z RNA. Region ten łącznie z motywami NLS w pozycjach 182.-192. i 382.-387. może uczestniczyć w wiązaniu pre-rRNA, RNA RNazy MRP lub RNazy P;

2<sup>o</sup> – tzw. „W-skrzynka” (ang. *W-box*) zlokalizowana między 200.-222. r.a.: wśród 22 aminokwasów aż 11 jest identycznych, zaś 8 stanowią konserwatywne podstawienia. Spośród identycznych reszt aminokwasowych aż trzy stanowi tryptofan (W), który może uczestniczyć w bezpośredniej asocjacji z RNA;

3<sup>o</sup> – w części C-końcowej cząsteczki hPOP1 (pozycje 963.-985.) peptyd o strukturze „G-skrzynki” (ang. *G-box*). W obrębie ugrupowania 22 aminokwasów wykryto 5 konserwatywnych cząsteczek glicyny i 7 reszt aminokwasów hydrofobowych [63]. Mutacje genu *hPOP1* ograniczają obróbkę łańcucha pre-rRNA w miejscu cięcia A<sub>3</sub> (rys. 2). Stosunek powstałych form 5,8S<sub>S</sub> rRNA do 5,8S<sub>L</sub> rRNA zmienia się wtedy z około 1:8 do 1:1. Ostatnie doniesienia sugerują, że brak prawidłowej cząsteczki hPOP1 przyczynia się do błędnego umieszczenia snoRNP w miejscu obróbki pierwotnego transkrypty lub uniemożliwia bezpośrednią jego interakcję z RNazą MRP [62, 63, 68].

### Białko POP2

Stosunkowo słabo scharakteryzowane białko POP2, koduje gen zlokalizowany na lewym ramieniu chromosomu VII *S. cerevisiae*, a zidentyfikowany w toku poszukiwań supresorów mutacji *rrp2-1* RNazy MRP [20]. Jego zsekwencjonowanie wskazuje na istnienie homologii z serynowo-treoninowymi kinazami białkowymi oraz białkami regulatorowymi: YGL023 z *S. cerevisiae* oraz Pumilio z *Drosophila melanogaster* [16].

### Białko POP3

Ostatnio ukazały się doniesienia o wykryciu kolejnego białka związanego z RNazą MRP. W jego składzie stwierdzono 196 r.a. o łącznej m.cz./pI 22,6/9,64 [23]. Polipeptyd ten asocjuje zarówno z RNazą MRP, jak i RNazą P. Okazało się, że przeciwciała skierowane przeciwko POP3 *in vitro* precypitują około 50% i aż 90% odpowiednio RNazy MRP i RNazy P. Zahamowanie ekspresji genu *POP3* blokuje obróbkę pre-rRNA w miejscu cięcia A<sub>3</sub> oraz 3' i 5' zakończeń pre-tRNA. Ten ostatni proces wymaga RNazy P. Wydaje się, że POP3 nie wpływa na stabilność RNazy MRP i RNazy P, gdyż poziom obydwu enzymów nie zmienia się po usunięciu tego polipeptydu. Natomiast prawdopodobnie umożliwia on prawidłową lokalizację komórkową tych kluczowych dla dojrzewania pre-rRNA i tRNA enzymów [23]. Efekty fenotypowe braku ekspresji *POP3* przyczyniają się do spadku poziomu syntezy 5,8S<sub>5</sub> rRNA i pojawienia się nieprawidłowej formy prekursorowej 5,8S rRNA z zestawem nukleotydów przy 5' końcu, sięgającym aż do miejsca cięcia A<sub>2</sub> pierwotnego transkryptu. Przy jego braku nie obserwuje się zakłóceń dojrzewania pre-rRNA w pozycji A<sub>0</sub>. Ilość 35S rRNA oraz intermediatów jego obróbki, tj. 27SA, 20S oraz 18S i 25S nie ulega zmianie.

## 4. MAKROMOLEKULARNA ORGANIZACJA PROCESU OBRÓBKII pre-rRNA

Na podstawie intensywnych badań ostatnich lat zarysowuje się pogląd, zgodnie z którym w złożonym procesie obróbki pre-rRNA uczestniczą makromolekularne kompleksy rybonukleoproteinowe – procesosomy, złożone z U3 snoRNA oraz szeregu innych U snoRNA i białek [33, 35, 46, 73, 74].

Analizy w mikroskopie elektronowym wskazują, że kompleksy o stałej sedymentacji 20S, zawierające U3 snoRNA są identyczne z „terminalnymi kulkami” (ang. *terminal balls, knobs*), jakie obserwowano na zakończeniach 5' pierwotnych transkryptów polimerazy RNA klasy I [73, 100, 107].

Formowanie kompleksów *in vitro* zachodzi na odcinkach pre-rRNA o długości zaledwie około 400 nt, zaś przemiany w obrębie 5'ETS zachodzą jeszcze przed zakończeniem transkrypcji w 90% cząsteczek pre-rRNA [73, 111]. Okazało się, że tworzenie kompleksów o stałej sedymentacji około 20S i dojrzewanie cząsteczki pre-rRNA w obrębie 5'ETS nie wymagają hydrolizy ATP, co różni ów szlak metaboliczny od reakcji powstawania spliceosomów podczas składania pre-mRNA [46, 48, 70, 76].

Aktualnie przyjmuje się, że tworzenie procesosomu jest zainicjowane przez przyłączenie fosfoproteiny C23 do regionu 5'ETS pierwotnego transkryptu przepisane go przez polimerazę RNA I [37, 97]. Eksperymenty selekcyjne ujawniły konserwatywny ewolucyjnie motyw strukturalny pre-rRNA, z którym specyficznie oddziałuje białko

C23. Stanowi on 18-nukleotydowy odcinek rRNA, który przyjmuje strukturę pnia (5 pz.) i pętli (8 nukleotydów), w której znajduje się konserwatywny motyw: UC-CCGA. Mutacja nukleotydu cytydylowego lub guanylowego w jego obrębie powoduje hamowanie interakcji z fosfoproteiną C23. Analiza immunocytochemiczna dostarczyła wyników wskazujących, że C23 w najwyższym stopniu asocjuje z 47S pre-rRNA. Następnie stopniowo odłącza się od pierwotnego transkryptu w czasie jego dojrzewania [11, 80]. Okazało się, że tylko niewielka pula polipeptydu C23 występuje w obrębie podjednostek prerybosomalnych o stałej sedymentacji 40S i 60S. Brak go natomiast w dojrzałych rybosomach 80S. Uważa się, że ta fosfoproteina umożliwia przyłączanie do pre-rRNA szeregu białek związanych z jego obróbką. Kompleksy C-23 ze wspomnianymi białkami albo powstają w jąderku, albo w cytoplazmie, skąd są transportowane do jąderka [37].

Polipeptyd ten jest również zaangażowany w usuwanie dupleksów utworzonych między U snoRNA–rRNA po zakończeniu obróbki pierwotnych transkryptów polimerazy RNA I. W warunkach *in vitro* C23 rozpoznaje dupleksy RNA–RNA o długości do 41 nt, co znacznie przekracza długość opisywanych oddziaływań U snoRNA–rRNA (do 21 nt) [3, 108].

Ostatnie doświadczenia Mediny [14, 69] i Bevena [6] sugerują, że procesosomy nie ulegają pełnemu rozpadowi wraz z dezorganizacją jąderka podczas mitozy. Analizy hybrydazyjne i immunocytochemiczne potwierdziły współwystępowanie fibrylaryny i fosfoproteiny C23 oraz pre-rRNA, zsyntetyzowanego w fazie G<sub>2</sub> cyklu komórkowego. Rozmieszczenie wymienionych składników procesosomu zależy od fazy mitozy i typu badanych komórek. Okazało się, że na granicy: metafaza – anafaza tworzą one sieć otaczającą chromosomy. Z kolei przy przejściu z anafazy do telofazy stwierdza się je w obrębie prekursorów ciał jąderkowych (ang. *pre-nucleolar bodies*), z których powstają jąderka po zakończeniu mitozy [69]. W prawidłowych komórkach merystemów korzeniowych cebuli są wykorzystywane w porównywalnym stopniu trzy wymienione wyżej miejsca „przechowywania” składników procesosomu. Natomiast w komórkach HeLa dominuje lokalizacja okołochromosomowa, zaś w komórkach jajnika chomika CHO – elementy matriks jąderkowej. Ostatni sposób dotyczy głównie komórek o zakłóconym metabolizmie, np. zablokowanych w fazie G<sub>2</sub> cyklu komórkowego za pomocą kofeiny.

Model zaproponowany ostatnio przez Tollerveya [106] usiłuje wyjaśnić interakcje pomiędzy złożonymi kompleksami uczestniczącymi w obróbce pierwotnego transkryptu rRNA (rys. 2).

Aktualny stan wiedzy zakłada, że w tym procesie biorą udział współpracujące wieloskładnikowe kompleksy rybonukleoproteinowe:

1<sup>o</sup> – zawierający U3, U14 snoRNA, snR10, snR30 oraz białka NOP1, SOF1, GAR1; prowadzący przemianę transkryptu pre-rRNA przy 5'ETS i ITS1 oraz

2<sup>o</sup> – zbudowany z RNazy MRP zasocjowanej z białkami POP1, POP2, SNM1 oraz egzonukleazami Rat1 i Xrn1, dokonujący obróbki w miejscu A<sub>3</sub> i zapewniający



uwolnienie dojrzałej formy 5,8S rRNA i właściwego zakończenia 5' 27SB<sub>S</sub>. O występowaniu 5'→3' egzonukleaz świadczy bardzo krótki „okres życia” 27SA<sub>3</sub>, utworzonego przez nukleolityczne cięcie w pozycji A<sub>3</sub>. W ciągu około 2 sekund ulega on przemianom w formę 27SB<sub>S</sub>. Opisane przez Tollerveya [106] kompleksy działają w sposób skoordynowany. Wskazuje na to występowanie sprzężenia między przemianami w miejscach A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub>, które znajdują się zaledwie w odległości 72 nt. Mutacje pre-rRNA, które zakłócają dojrzewanie w jednym z wymienionych miejsc, blokują reakcję obróbki w pozycji drugiej. Jednoczesne mutacje miejsc A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub> prowadzą do utworzenia nieprawidłowej formy pre-rRNA, której 5' koniec znajduje się w obrębie 18S rRNA. Heterogenność zakończenia 5' transkryptu wskazuje, że jest on produktem działania egzonukleaz.

Zapewne funkcję molekularnego łącznika w przedstawionym modelu pełni wykryte ostatnio białko RRP5 [106, 110]. Okazało się, że hamowanie ekspresji kodującego go genu blokuje asocjację obu kompleksów i ich współdziałanie w procesie obróbki pre-rRNA. W następstwie dochodzi do jednoczesnego hamowania dojrzewania pierwotnych transkryptów w czterech pozycjach, tj. A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> i A<sub>3</sub> (rys. 2) [106].

## 5. PODSUMOWANIE

Liczne badania dotyczące niskocząsteczkowych jąderkowych RNA, białek oddziałujących zarówno z tą podklasą RNA, jak i z prekursorowymi transkryptami polimerazy RNA I zaowocowały opracowaniem schematu obróbki pre-rRNA u prostych organizmów eukariotycznych – *S.cerevisiae*. Model Tollerveya [106] przybliża nam przemiany towarzyszące dojrzewaniu pre-rRNA drożdży, które u wyższych *Eukaryota* są zapewne bardziej złożone. Wydaje się, że w najbliższej przyszłości można oczekiwać wyjaśnienia czy u kręgowców, w tym u człowieka, funkcjonują w sposób zbliżony kompleks RNazy MRP oraz homologiczne do tych w drożdżach, białka wchodzące w interakcje z pre-rRNA i z różnymi cząsteczkami snoRNA. Liczba tych ostatnich zapewne nie została jeszcze zamknięta.

### Podziękowanie

Autorzy pragną podziękować Panu mgr Janowi Gierakowi za przygotowanie wydruku komputerowego pracy.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ARIS JP, BLOBEL G. Identification and characterization of a yeast nucleolar protein that is similar to a rat liver nucleolar protein. *J Cell Biol* 1988; **107**: 17–31.
- [2] ARIS JP, BLOBEL G. cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 931–935.

- [3] BACHELLERIE JP, NICOLOSO M, QU LH, MICHOT B, CAIZERQUES-FERRER M, CAVAILLÉ J, RENALIER MH. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs with long sequence complementarities to mature rRNAs involved in ribosome biogenesis. *Bioch Cell Biol* 1995; **73**: 835–843.
- [4] BALAKIN AG, SMITH L, FOURNIER MJ. The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 1996; **86**: 823–834.
- [5] BENTON BM, ZANG JH, THORNER J. Novel FK506-binding and rapamycin-binding protein (*FPR3* gene product) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a proline rotamase localized in the nucleolus. *J Cell Biol* 1994; **127**: 623–639.
- [6] BEVEN AF, LEE R, RAZAZ M, LEADER DJ, BROWN JWS, SHAW PJ. The organization of ribosomal RNA processing correlates with the distribution of nucleolar snRNAs. *J Cell Sci* 1996; **109**: 1241–1251.
- [7] BIRNEY E, KUMAR S, KRAINER AR. Analysis of the RNA recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucl Acids Res* 1993; **21**: 5803–5816.
- [8] BODE J, KOHWI Y, DICKINSON L, JOHT, KLEHR D, MIELKE C, KOHWI--SHIGEMATSU T. Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science* 1992; **255**: 195–197.
- [9] BODE J, SCHLAKE T, RIOS-RAMIREZ M, MIELKE C, STENGERT M, KAY V, KLEHR-WIRTH D. Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci. *Int Rev Cytol* 1995; **162A**: 389–454.
- [10] BOUCHE G, CAIZERGUES-FERRER M, BUGLER B, AMALRIC F. Interactions between the maturation of a 100 kDa nucleolar protein and pre-rRNA synthesis in CHO cells. *Nucl Acids Res* 1984; **12**: 3025–3035.
- [11] BOURBON H, BUGLER B, CAIZERGUES-FERRER M, AMALRIC F. Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein. *FEBS Lett* 1983; **155**: 218–222.
- [12] BREUDER T, HEMENWAY CS, MORVA NR, CARDENAS ME, HEITMAN J. Calcineurin is essential in cyclosporin A- and FK506-sensitive yeast strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 5372–5376.
- [13] BUGLER B, BOURBON H, LAPEYRE B, WALLACE MO, CHANG J-H, AMALRIC F, OLSON MOJ. RNA binding fragments from nucleolin contain the ribonucleoprotein consensus sequence. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10922–10925.
- [14] CERDIDO A, MEDINA FJ. Subnucleolar location of fibrillarin and variation in its levels during the cell cycle and during differentiation of plants cells. *Chromosoma* 1995; **103**: 625–634.
- [15] CLARK MW, YIP MLR, CAMPBELL J, ABELSON J. SSB-1 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a nucleolar-specific, silver-binding protein that is associated with the snR10 and snR11 small nuclear RNAs. *J Cell Biol* 1990; **111**: 1741–1751.
- [16] COGLIEVINA M, BERTANI I, KLIMA R, ZACCARIA P., BRUSCHI CV. The DNA sequence of a 794 bp fragment of the left arm of chromosome VII of *Saccharomyces cerevisiae* contains four open readings frames including the serine/threonine protein kinase gene. *Yeast* 1995; **11**: 767–774.
- [17] CHANG DD, CLAYTON DA. A novel endoribonuclease cleaves at a primary site of mouse mitochondrial DNA replication. *EMBO J* 1987; **6**: 409–417.
- [18] CHANG DD, CLAYTON DA. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* 1987; **235**: 1178–1184.
- [19] CHRISTENSEN ME, SCHELLING ME. Localization of a major nucleolar protein B36, in *Physarum polycephalum* using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 1984; **99**: 11a.
- [20] CHU S, ARCHER RH, ZENGEL JM, LINDAHL L. The RNA of RNase MRP is required for normal processing of ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 659–663.

- [21] DHILLON N, THORNER J. Immunophilins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a different spin on proline rotamases. *Methods* 1996; **9**: 165–176.
- [22] DICKINSON L, KOHWI-SHIGEMATSU T. Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base unpairing potential. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 456–465.
- [23] DICHTL B, TOLLERVEY D. Pop3p is essential for the activity of the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins *in vivo*. *EMBO J* 1997; **16**: 417–429.
- [24] DRAPER DE. Protein-RNA recognition. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 593–620.
- [25] EGYHAZI E, PIGON A, CHANG JH, GHAFFARI SH, DREESEN TD, WELLMAN SE, CASE ST, OLSON MOJ. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus* salivary gland cells. *Exp Cell Res* 1988; **178**: 264–272.
- [26] EICHLER DC, TATAR TF. Properties of a purified nucleolar ribonuclease from Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochemistry* 1980; **19**: 3016–3022.
- [27] EICHLER DC, EALES SJ. Isolation and characterization of a single-stranded specific endoribonuclease from Ehrlich cell nucleoli. *J Biol Chem* 1982; **257**: 14384–14389.
- [28] EICHLER DC, EALES SJ. Purification and properties of a novel nucleolar exoribonuclease capable of degrading both single-stranded and double-stranded RNA. *Biochemistry* 1985; **24**: 686–691.
- [29] EICHLER DC, RABER NK, SHUMARD CM, EALES SJ. Isolation and characterization of a nucleolar 2'-*O*-methyltransferase from Ehrlich ascites tumor cells. *Biochemistry* 1987; **26**: 1639–1644.
- [30] EICHLER DC, EALES SJ. Specificity of a nucleolar 2'-*O*-methyltransferase for RNA substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **155**: 530–537.
- [31] EICHLER DC, LIBERATORE JA, SHUMARD CM. Selection of a preribosomal RNA processing site by a nucleolar endoribonuclease involves formation of a stable complex. *Nucl Acids Res* 1993; **11**: 3775–3781.
- [32] EICHLER DC. Characterization of a nucleolar 2'-*O*-methyltransferase and its involvement in the methylation of mouse precursor ribosomal RNA. *Biochimie* 1994; **76**: 1115–1122.
- [33] EICHLER DC, CRAIG N. Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Progr Nucl Acids Res Mol Biol* 1994; **49**: 197–239.
- [34] ELELA SA, IGEL H, AVES M. RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 1996; **85**: 115–124.
- [35] FOURNIER MJ, MAXWELL SE. The nucleolar snRNAs: catching up with the spliceosomal snRNAs. *TIBS* 1993; **18**: 131–135.
- [36] GHISOLFI L, JOSEPH G, AMALRIC F, ERARD M. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J Biol Chem* 1992; **267**: 2955–2959.
- [37] GHISOLFI-NIETO L, JOSEPH G, PUVION-DUTILLEUL F, AMALRIC F, BOUVET P. Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA. *J Mol Biol* 1996; **260**: 34–53.
- [38] GIRARD J-P, LEHTONEN H, CAIZERGUES-FERRER M, AMALRIC F, TOLLERVEY D, LAPEYRE B. GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J* 1992; **11**: 673–682.
- [39] GULIJ M-P., GIRARD J-P., ZABETAKIS D, LAPEYRE B, MELESE T, CAIZERGUES-FERRER M. GAR2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation. *Nucl Acids Res* 1995; **23**: 1912–1918.
- [40] HENRY Y, WOOD H, MORRISSEY JP, PETFALSKI E, KEARSEY S, TOLLERVEY D. The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J* 1994; **13**: 2452–2463.
- [41] HOFFMAN DW, QUERY ChC, GOLDEN BL, WHITE SW, KEENE JD. RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR

- spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2495–2499.
- [42] HOZAK P., COOK PR, SCHOFFER C, MOSGOLLER W, WACHTLER F. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J Cell Sci* 1994; **107**: 639–648.
- [43] JANSEN RP, HURT EC, KERN H, LEHTONEN H, CARMO-FONSECA M, LAPEYRE B, TOLLERVEY D. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol* 1991; **113**: 715–729.
- [44] JANSEN R, TOLLERVEY D, HURT ET. A U3 snoRNP protein with homology to splicing factor PRP4 and G domains is required for ribosomal RNA processing. *EMBO J* 1993; **12**: 2549–2558.
- [45] JONG AYS, CAMPBELL JL. Isolation of the gene encoding yeast single-stranded nucleic acid-binding protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 877–881.
- [46] KASS S, TYC K, STEITZ JA, SOLLNER-WEBB B. The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 1990; **60**: 897–908.
- [47] KILIAŃSKA Z, SZYMCZYK P. Niskocząsteczkowe jąderkowe RNA (snoRNA): właściwości i funkcje. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 227–258.
- [48] KISELEVA E, WURTZ T, VISA N, DANEHOLT B. Assembly and disassembly of spliceosomes along a specific pre-messenger RNP fiber. *EMBO J* 1994; **13**: 6052–6061.
- [49] KISS T, MARSHALLSAY C, FILIPOWICZ W. 7-2/MRP RNA in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J* 1992; **11**: 3737–3746.
- [50] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Jąderko [w]: *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*. PWN, Warszawa 1995: 401–426
- [51] KONDO K, INOUE M. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16252–16258.
- [52] KONDO K, KOWALSKI LRZ, INOUE M. Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing. *J Biol Chem* 1992; **267**: 16259–6265.
- [53] KOONIN EV. Prediction of an rRNA methyltransferase domain in human tumor-specific nucleolar protein p120. *Nucl Acids Res* 1994; **22**: 2476–2478.
- [54] LAPEYRE B, CAIZERGUES-FERRER M, BOUCHE G, AMALRIC F. Cloning of cDNA encoding a 100 kDa nucleolar protein (nucleolin) of chinese hamster ovary cells. *Nucl Acids Res* 1985; **13**: 5805–5816.
- [55] LAPEYRE B, AMALRIC F, GHAFARI SH, RAO SVV, DUMBAR TS, OLSON MOJ. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J Biol Chem* 1986; **261**: 9167–9173.
- [56] LAPEYRE B, BOURBON H, AMALRIC F. Nucleolin the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: An unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 1472–1476.
- [57] LASATER LS, EICHLER DC. Isolation and properties of a single-strand 5'→3' exoribonuclease from Ehrlich ascites tumor cell nucleoli. *Biochemistry* 1984; **23**: 4367–4373.
- [58] LEE WCh, XUE Z, MELESE T. The NSR1 gene encodes a protein that specifically binds nuclear localization sequences and has two RNA recognition motifs. *J Cell Biol* 1991; **113**: 1–12.
- [59] LISCHWE MA, SMETANA K, OLSON MOJ, BUSCH H. Proteins C23 and B23 are the major nucleolar proteins. *Life Sci* 1979; **25**, 701–708.
- [60] LÜBBEN B, MARSHALLSAY Ch, ROTTMANN N, LÜHRMANN R. Isolation of U3 snoRNP from CHO cells: a novel 55 kDa protein binds to the central part of U3 snoRNA. *Nucl Acid Res* 1993; **21**: 5377–5385.
- [61] LÜBBEN B, FABRIZIO P, KASTNER B, LÜHRMANN R. Isolation and characterization of the small nucleolar ribonucleoprotein particle snR30 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1995; **270**: 11549–11554.

- [62] LYGEROU Z, MITCHELL P., PETFALSKI E, SERAPHIN B, TOLLERVEY D. The *POP1* gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleo-proteins. *Genes Develop* 1994; **8**: 1423–1433.
- [63] LYGEROU Z, PLUK H, VAN VERNONIJ WJ, SERAPHIN B. hPOP1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J* 1996; **15**: 5936–5948.
- [64] LYNCH KW, MANIATIS T. Assembly of specific SR protein complex on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev* 1996; **10**: 2089–2101.
- [65] MANLEY JL, TACKE R. SR protein and splicing control. *Genes Dev* 1996; **10**: 1569–1579.
- [66] MARRIDOR G, NIGG EA. cDNA sequences of chicken nucleolin C23 and NO38/B23, two major nucleolar proteins. *Nucl Acids Res* 1990; **18**: 1286.
- [67] MARTIN M, GARCIA-FERNANDEZ LF, MORENO DIAZ DeLa ESPINA S, NOAILLAC-DEPEYRE J, GAS N, MEDINA FJ. Identification and localization of a nucleolin homologue in onion nucleoli. *Exp Cell Res* 1992; **199**: 74–84.
- [68] MAXWELL ES, FOURNIER MJ. The small nucleolar RNAs. *Ann Rev Biochem* 1995; **35**: 897–934.
- [69] MEDINA FX, CERDIDO A, FERNANDEZ-GOMEZ ME. Components of the nucleolar processing complex (pre-rRNA, fibrillarin, and nucleolin) colocalize during mitosis and are incorporated to daughter cell nucleoli. *Exp Cell Res* 1995; **221**: 111–125.
- [70] MELESE T, XUE Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 319–324.
- [71] MITCHELL P., PETFALSKI E, TOLLERVEY D. The 3' end of yeast 5.8S rRNA is generated by an exonuclease processing mechanism. *Genes Dev* 1996; **10**: 502–513.
- [72] MORRISSEY JP, TOLLERVEY D. Birth of the snoRNPs – the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA processing system. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 78–82.
- [73] MOUGEY EB, O'RELLY M, OSHEIM Y, MILLER OL, BEYER A, SOLLNER-WEBB B. The terminal balls characteristic of eukaryotic rRNA transcription units in chromatin spreads are rRNA processing complex. *Genes Develop* 1993; **7**: 1609–1619.
- [74] MOUGEY EB, SOLLNER-WEBB B. A U3 snRNP-requiring processing event in the 5' external transcribed spacer of *Xenopus* precursor rRNA. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5990–5998.
- [75] NELSON HCM, FINCH JT, LUISI BF, KLUG A. The structure of an oligo(dA) • oligo(dT) tract and its biological implications. *Nature* 1987; **330**: 221–226.
- [76] NILSEN TW. RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell* 1994; **78**: 1–4.
- [77] OCHS RL, LISCHWE MA, SPOHN WH, BUSCH H. Fibrillarin a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera. *Biol Cell* 1985; **54**: 123–134.
- [78] OCHS RL, SMETANA K. Detection of fibrillarin in nucleolar remnants and the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 1991; **197**: 183–190.
- [79] OLSON MOJ, RIVERS ZM, THOMPSON BM, KAO W-Y, CASE ST. Interaction of nucleolar phosphoprotein C-23 with cloned segments of rat ribosomal DNA. *Biochemistry* 1983; **22**: 3345–3351.
- [80] OLSON MOJ. The role of proteins in nucleolar structure and function. In: *The Eukaryotic Nucleus. Molecular biochemistry and macromolecular assemblies* (PR Strauss, SII Wilson, eds.), vol 2, 1989: 520–559.
- [81] PARKER KA, STEITZ JA. Structural analyses of the human U3 ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 1899–1913.
- [82] RAŠKA I. Does the synthesis of ribosomal RNA take place within nucleolar fibrillar centers or dense fibrillar components? A critical appraisal. *J Struct Biol* 1995; **114**: 1–22.
- [83] RAŠKA I. Nuclear ultrastructures associated with the RNA synthesis and processing. *J Cell Biochem* 1995; **59**: 11–26.

- [84] REDDY R, SHIMBA S. Structural and functional similarities between MRP and RNaseP. *Mol Biol Rep* 1996; **22**: 81–85.
- [85] REIMER G, RAŠKA I, TAN EM, SCHEER U. Human autoantibodies: probes for nucleolus structure and function. *Virchows Arch Abt B* 1987; **54**: 131–143.
- [86] RIPMASTER TL, VAUGHN GP, WOOLFORD JL. A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11131–11135.
- [87] RIPMASTER TL, VAUGHN GP, WOOLFORD JL. *DRS1* to *DRS7*, novel genes required for ribosome assembly and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 7901–7912.
- [88] RUSSEL ID, TOLLERVEY D. NOP3 is an essential yeast protein which is required for pre-rRNA processing. *J Cell Biol* 1992; **119**: 737–747.
- [89] SACHS AB, DANIS RW. Translation initiation and ribosomal biogenesis-involvement of a putative ribosomal RNA helicase and RPL46. *Science* 1990; **247**: 1077–1079.
- [90] SAKAI K, OHTA T, MINOSHIMA S, KUDOH J, WANG Y, de JONG PJ, SHIMIZU N. Human ribosomal RNA gene cluster: identification of the proximal end containing a novel tandem repeat sequence. *Genomics* 1995; **26**: 521–526.
- [91] SAPP M, KNIPPERS R, RICHTER A. DNA binding properties of a 110 kDa nucleolar protein. *Nucl Acids Res* 1986; **14**: 6803–6820.
- [92] SCHEER U, ROSE KM. Localization of RNA polymerase I in interphase cells and mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 1431–1435.
- [93] SCHMITT ME, CLAYTON DA. Characterization of a unique protein component of yeast RNase MRP: an RNA-binding protein with a zinc-cluster domain. *Genes Develop* 1994; **8**: 2617–2628.
- [94] SCHMITT ME, BENNETT JL, DAIRAGHI DJ, CLAYTON DA. Secondary structure of RNase MRP RNA as predicted by phylogenetic comparison. *FASEB J* 1993; **7**: 208–213.
- [95] SCHMITT ME, CLAYTON DA. Yeast site-specific ribonucleoprotein endoribonuclease MRP contains an RNA component homologous to mammalian RNase MRP RNA and essential for cell viability. *Genes Dev* 1992; **6**: 1975–1985.
- [96] SHAN XY, XUE ZX, MELESE T. Yeast NPI46 encodes a novel prolyl *cis-trans* isomerase that is located in the nucleolus. *J Cell Biol* 1994; **126**: 853–862.
- [97] SHAW PJ, JORDAN EG. The nucleolus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 93–121.
- [98] SHIOMI Y, POWERS J, BOLLA RJ, Van NGUYEN T, SCHLESSINGER D. Proteins and RNA in mouse L cell core nucleoli and nuclear matrix. *Biochemistry* 1986; **25**: 5745–5751.
- [99] SHUMARD CM, TORRES C, EICHLER DC. *In vitro* processing at the 3'-terminal region of pre-18S rRNA by a nucleolar endoribonuclease. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 3868–3872.
- [100] STEITZ JA, TYCOWSKI KT. Small RNA chaperones for ribosome biogenesis. *Science* 1995; **270**: 1626–1627.
- [101] SUN Ch, WOOLFORD JL. The yeast *NOP4* gene product is an essential nucleolar protein required for pre-rRNA processing and accumulation of 60S ribosomal subunits. *EMBO J* 1994; **13**: 3127–3135.
- [102] SZABO G, BOLDOG F, WIKONKAL N. Disassembly of chromatin into  $\approx$  50 kb units by detergent. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **169**: 706–712.
- [103] TARN WY, STEITZ JA. SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions *in vitro*. *Genes Dev* 1994; **8**: 2704–2717.
- [104] TOLLERVEY D, LEHTONEN H, CARMO-FONSECA M, HURT EC. The small nucleolar RNP NOP1 (fibrillarlin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J* 1991; **10**: 573–583.

- [105] TOLLERVEY D, LEHTONEN H, JANSEN R, KERN H, HURT EC. Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarlin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 1993; **72**: 443–457.
- [106] TOLLERVEY D. Genetic and biochemic analyses of yeast RNase MRP. *Mol Biol Rep* 1996; **22**: 75–79.
- [107] TRENDELENBURG MF, ZATSEPIN A, WASCHKE T, SCHLEGEL W, TRÖSTER H, RUDOLPH D, SCHMAHL G, SPRING H. Multiparameter microscopic analysis of nucleolar structure and ribosomal gene transcription. *Histochem Cell Biol* 1996; **106**: 167–192.
- [108] TUTEJA N, HUANG NW, SKOPAC D, TUTEJA R, HRVATIC S, ZHANG J, PONGOR S, JOSEPH G, FAUCHER C, AMALRIC F, FALASHIA A. Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. *Gene* 1995; **160**: 143–148.
- [109] TYC K, STEITZ JA. U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J* 1989; **8**: 3113–3118.
- [110] VENEMA J, TOLLERVEY D. RRP5 is required for formation of both 18S and 5.8S rRNA in yeast. *EMBO J* 1996; **15**: 5701–5714.
- [111] VENOIT-DREBOT LM, SINGER RA, JOHNSTON GC. Rapid initial cleavage of nascent pre-rRNA transcripts in yeast. *J Mol Biol* 1988; **199**: 107–113.
- [112] XUE Z, MELESE T. Nucleolar proteins that bind NLS: a role in nuclear import or ribosome biogenesis? *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 414–417.
- [113] YUAN Y, SINGH R, REDDY R. Rat nucleolar 7-2/rRNA is homologous to mouse mitochondrial RNase mitochondrial RNA-processing RNA. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14835–14839.
- [114] ZAHLER AM, LANE WS, STOLK JA, ROTH MB. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* 1992; **6**: 837–847.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.06.1997 r.

Przyjęto: 27.06.1997 r.

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





## ENDOGENNE PEPTYDY OPIOIDOWE: NOWE CYTOKINY? \*

### ENDOGENOUS OPIOID PEPTIDES: NEW CYTOKINES?

Jarosław PAŚNIK

Zakład Patofizjologii Katedry Nauk Patofizjologicznych WAM, Łódź

*Streszczenie:* Układ immunologiczny przez długi czas uważany był za autonomiczny. W ciągu ostatniej dekady zebrano wiele informacji o powiązaniach pomiędzy obydwoma układami: odpornościowym i neuroendokrynnym. Endogenne peptydy opioidowe znane były jako neuromediatory przeciwbólowe. Opiszano także ich rolę w stresie fizjologicznym, uczeniu się, pamięci i innych. Wykazano ponadto, że zmieniają wiele funkcji układu odpornościowego. Praca ta podsumowuje wpływ endogennych peptydów opioidowych na komórki układu odpornościowego. Szczegółowo omówiono udział peptydów opioidowych w regulacji funkcji komórek układu odpornościowego: limfocytów T i B, makrofagów, monocytów i granulocytów. W dalszej części opisano wpływ peptydaz na biodegradację peptydów opioidowych w osoczu krwi obwodowej.

*Słowa kluczowe:* peptydy opioidowe, receptory opioidowe,  $\beta$ -endorfina, enkefalina, limfocyty, komórki NK, komórki T, komórki B, granulocyty, cytokiny

*Summary:* The immune system has long been thought to function autonomously. During the last decade information has been collected from studies about communications between the immune and neuroendocrine systems. Endogenous opioid peptides was originally known for its analgetic influence, but was later shown to play role in physical stress, learning, memory, and other. Furthermore, they have been shown to change a variety of functional activities of the immune system. This review summarizes the effects of endogenous opioid peptides on the immune cells. Involvement of those peptides in regulation of functions of immune cells: lymphocytes T and B, macrophages, monocytes, and granulocytes has been discussed in detail. Moreover, the informations about influence of peptidases on the biodegradation of opioid peptides in serum are given.

*Key words:* opioid peptides, opioid receptors,  $\beta$ -endorphin, enkephalin, lymphocytes, natural killer cells, T cells, B cells, granulocytes, cytokines

\* Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 4 PO5A 024 11

## WSTĘP

Układ odpornościowy do niedawna uważany był za system działający autonomicznie. Jednak coraz więcej danych przemawia za istnieniem wzajemnych powiązań z układem neuroendokrynnym. Nieznane są jeszcze szczegółowo mechanizmy przenoszenia informacji pomiędzy tymi układami. Przymuszcza się jedną z możliwych dróg komunikacji jest działanie endogennych peptydów opioidowych, zwanych opioidami. W warunkach doświadczalnych stwierdzano, że wpływają one na szereg procesów odpornościowych tak typu humoralnego, jak i komórkowego. Zmieniają dystrybucję narządową komórek odpornościowych, mobilizują populacje komórek w poszczególnych przedziałach organizmu, wpływają na ich mobilizację w miejscu gromadzenia się patogenów. Zmieniają także ekspresję cząstek receptorowych na powierzchni komórek odpornościowych, zmieniają ich zdolność do podziałów, wpływają na aktywację genów dla cytokin i przeciwciał.

### Rys historyczny

Obecność endogennych substancji o działaniu przeciwbólowym podejrzewano od wielu lat. W 1973 roku przedstawiono dowody na istnienie stereospecyficznych miejsc wiązania znakowanych radioaktywnie opiatów z grupy morfiny w tkance nerwowej [76]. Przyjęta wtedy hipoteza zakładała istnienie naturalnych wewnątrzustrojowych agonistów receptorów opioidowych. Dwa lata później z mózgów świńek morskich wyizolowano i scharakteryzowano pierwsze endogenne ligandy o właściwościach opiatopodobnych [39]. Odpowiadały one sekwencji aminokwasów: Tyr-Gly-Gly-Phe- zakończonej leucyną lub metioniną. Dwa najwcześniej odkryte opioidy nazwano: leu- i met-enkefaliną. Obecnie znanych jest około trzydziestu endogennych peptydów opioidowych [98].

### Podział, budowa, biosynteza i uwalnianie

Endogenne peptydy opioidowe nazywane opioidami dzieli się na trzy podstawowe grupy: enkefaliny, endorfiny i dynorfiny [98]. Spośród nich najmniejszą cząstkę ma enkefalina; składa się ona z 5 aminokwasów, największą zaś  $\beta$ -endorfina zbudowana z 31 aminokwasów. Cechą wspólną wszystkich peptydów opioidowych jest znajdująca się na N-końcu każdego peptydu sekwencja 5 aminokwasów Tyr-Gly-Gly-Phe-Met lub Leu, która decyduje o ich aktywności biologicznej [13]. Peptydy opioidowe, uwalniane przez różne typy komórek organizmu, mają zwykle wspólny gen dla pre-hormonu [48]. Zlokalizowano i scharakteryzowano do tej pory trzy geny odpowiedzialne za wytwarzanie trzech prekursorów peptydów opioidowych: proenkefaliny, proopiomelanokortyny i prodynorfiny [13, 48]. Po translacji z form

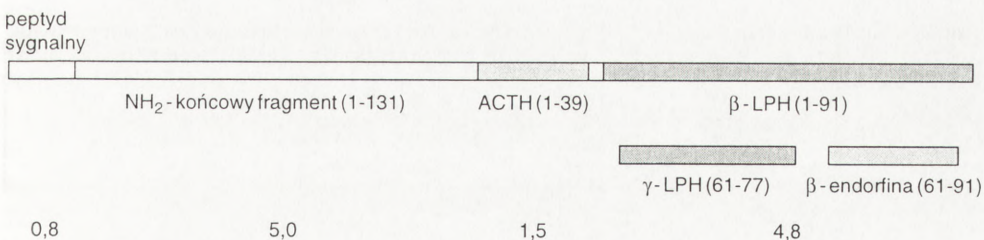
prekursorowych enzymatycznie odcinany jest peptyd sygnałny, a następnie powstają peptydy o różnej długości łańcucha [48].

Wstrząs o różnej etiologii, endotoksemia indukują uwalnianie poszczególnych peptydów opioidowych z prekursorów. Wydzielanie endogennych peptydów opioidowych wybitnie zwiększa się podczas stresu [2, 75, 84]. Poziom  $\beta$ -endorfina i met-enkefalina w osoczu krwi obwodowej (stężenia odpowiednio  $10^{-11}$ – $10^{-12}$  M/l i  $10^{-10}$ – $10^{-11}$  M/l) zwiększa się kilkukrotnie pod wpływem bodźca stresowego [3]. Uwalnianie tych peptydów regulowane jest przez czynniki genetyczne, a także przez specyficzne dla poszczególnych tkanek układy enzymatyczne [48, 75, 109].

Prekursorem najwcześniej odkrytych opioidów jest proenkefalina; składająca się z 263 aminokwasów. Oprócz met-enkefaliny powstają z niej także inne dłuższe peptydy opioidowe: metorfamid, amidorfina, peptydy E, F, BAM-12P, BAM-20P, BAM-22P, heptapeptyd i oktapeptyd [48, 98]. Synteza proenkefaliny odbywa się w neuronach pośredniczących, krótkoaksonowych; występujących we wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego – szczególnie w prążkowie, ciele migdałowatym, hipokampie, podwzgórzcu, w istocie szarej środkowej mózgowia, w jądrach szwu mostu i rdzenia przedłużonego oraz w rdzeniu kręgowym – w rogach tylnych istoty szarej [98, 113].

Komórki zasadochłonne przedniego płata i części pośredniej przysadki syntetyzują prohormon o masie cząsteczkowej 31 000 kDa zawierający 131 aminokwasów zwany proopiomelanokortyną – POMC [108]. Ekspresja genu dla tego prekursora wzrasta w komórkach przysadki pod wpływem IL-1 i IL-2 [18, 51]. Po usunięciu N-końcowego peptydu sygnałnego w przedniej części przysadki prekursor rozcinany jest na ACTH i  $\beta$ -LPH (rys. 1) [18, 51].

$\beta$ -endorfina powstaje przede wszystkim w neuronach jądra łukowatego podwzgórzca, w komórkach korykotropowych i melanotropowych przysadki mózgowej w wyniku degradacji 91-aminokwasowego łańcucha beta-lipokortyny ( $\beta$ -LPH) [98]. W niektórych doniesieniach sugerowany jest udział IL-1 w regulacji uwalniania tego peptydu. Wykazano indukujący wpływ tej cytokiny na sekrecję  $\beta$ -endorfiny

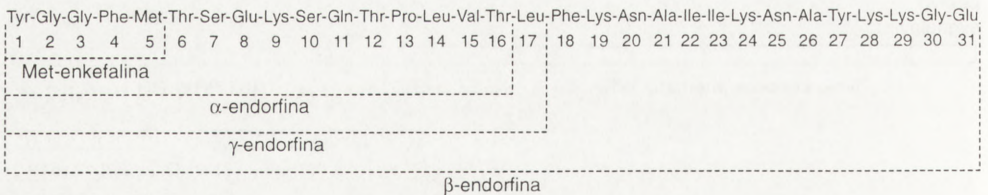


Rys. 1. Proopiomelanokortyna (POMC) i jej fragmenty (wg [12] zmodyfikowany)

z preparatów przysadek zwierzęcych *in vitro* [18, 71]. Synteza tego peptydu zachodzi także w komórkach oskrzeli i pęcherzyków płucnych, przewodu pokarmowego, łożyska, a także w komórkach układu odpornościowego [72].  $\beta$ -endorfina składa się z 31 aminokwasów i stanowi fragment łańcucha  $\beta$ -LPH (rys. 2). Jest najsilniej działającym analgetykiem spośród wszystkich endogennych opioidów [34, 46]. Ma pięcio-aminokwasową sekwencję: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met identyczną jak w met-enkefalinie, a decydującą o aktywności biologicznej [13]. W obrębie ośrodkowego układu nerwowego wyodrębniono obustronnie przebiegający układ neuronów bogatych w  $\beta$ -endorfina. Rozpoczyna się on w okolicach jądra łukowatego i kończy w istocie szarej okołowodociągowej. Stymulacja elektryczna tego układu neuronów u zwierząt wywołuje analgezję [70].

Prekursorem trzeciej grupy peptydów opioidowych jest prodynorfina zbudowana z 256 reszt aminokwasów. W wyniku enzymatycznego rozpadu powstają z niej dynorfiny: A i B, 32, 1-8, leu-enkefalina,  $\alpha$ - i  $\beta$ -neoendorfiny, rimorfina i leumorfina [97]. Najwięcej mRNA dla prodynorfiny stwierdzono w podwzgórzu (jądro łukowate, nadwzrokowe i przykomorowe), jądrze ogoniastym, ciele migdałowatym, hipokampie, komórkach gonadotropowych przysadki i w rdzeniu kręgowym [97, 113]. Synteza i sekrecja endogennych peptydów opioidowych regulowana jest przez podwzgórzowy czynnik uwalniający kortykotropinę (CRF – od ang. *corticotropin releasing factor*) [46]. Aktywność tego czynnika zwiększa się pod wpływem wazopresyny [98].

Jak już wspomniano, peptydy opioidowe syntetyzowane są także przez komórki układu odpornościowego. W 1981 roku Smith i Blalock odkryli, że  $\beta$ -endorfina wytwarzana jest przez jednojądrzaste leukocyty człowieka [93]. W następnych latach potwierdzono, że synteza opioidów odbywa się także w innych komórkach układu odpornościowego [5]. Wyniki tych badań, prowadzonych przy pomocy metod immunocytochemicznych i radioimmunologicznych potwierdzono w latach następnych wykorzystując techniki biologii molekularnej (*hybrydyzacji in situ*). Wykazano obecność mRNA dla prekursorów peptydów opioidowych w limfocytach, makrofagach i granulocytach [48]. Czynniki pobudzającymi syntezę i uwalnianie pep-



Rys. 2.  $\beta$ -endorfina i jej fragmenty aktywne, dokładny opis w tekście (wg [12,40] zmodyfikowany)

tydów w komórkach układu odpornościowego są katecholaminy, CRF, IL-1, LPS i wirusy: NCDV (*Newcastle Disease Virus*) i EBV [71, 85, 87].

### Niektóre własności biologiczne

Peptydy opioidowe łączą się ze specyficznymi receptorami postsynaptycznymi [48]. Wpływają w ten sposób na większość procesów biochemicznych i neurofizjologicznych, mających miejsce w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [98]. Wiele obserwacji potwierdza udział peptydów opioidowych w regulacji odbioru bodźców bólowych [24, 46, 77]. Prawdopodobnie analgetyczne działanie tych peptydów polega na presynaptycznym hamowaniu uwalniania substancji P przez neurony i hamowaniu przez to natężenia bodźca bólowego [46]. Peptydy opioidowe wykazują zróżnicowane działanie analgetyczne [1, 46, 37]. Jest ono zależne od długości łańcucha peptydowego. Im większa bowiem liczba aminokwasów w łańcuchu, tym później jest on rozkładany i tym dłużej utrzymuje się jego działanie przeciwbólne [103]. Najsilniejsze działanie przeciwbólne wykazuje  $\beta$ -endorfina [46]. Endogenne peptydy opioidowe mają działanie przeciwdrgawkowe, wykazano ich rolę w procesie uczenia się i pamięci [63]. Sugerowany jest udział opioidów w patogenezie niektórych chorób psychicznych: schizofrenii, depresji endogennej i anoreksji czy też w zespole autyzmu dziecięcego, a także schorzeń neurologicznych, takich jak: niektóre postaci padaczki, migrena [8, 9, 10, 37]. Zmiany aktywności endogennych peptydów opioidowych (met-enkefaliny i  $\beta$ -endorfiny) w osoczu i w płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano u noworodków z mózgowym porażeniem dziecięcym, w zespole nagłej śmierci noworodka, a także u osób z chorobą Alzheimera [65, 92]. Według niektórych autorów peptydy opioidowe wpływają także na ośrodki pragnienia i łaknienia w podwzgórzu [46, 63]. Podkreślana jest rola tych peptydów w modulowaniu przekazywania noradrenergicznego, serotoninoergicznego, dopaminergicznego, GABA-ergicznego i w regulacji funkcji płytki ruchowej [24]. Sprzeczne są doniesienia dotyczące wpływu peptydów opioidowych na obwodowe ciśnienie tętnicze. Wykazano, że peptydy o dłuższych łańcuchach aminokwasowych silnie hamują aktywność współczulną układu autonomicznego, zmniejszają ciśnienie tętnicze, zmniejszają zaopatrzenie mózgu w krew i tlen. Z drugiej strony u osób z nadciśnieniem tętniczym stwierdzano zwiększoną aktywność endorfin w ośrodkowym układzie nerwowym [1, 4, 19]. Zarówno  $\beta$ -endorfina, jak i met-enkefalina działają kurecząco na mięśniówkę gładką oskrzeli [19]. Peptydy te przez udział w regulacji wydzielania wody, sodu i potasu wpływają na czynność nerek. Obserwowano wzrost stężenia peptydów opioidowych we krwi osób z upośledzeniem czynności nerek [16]. Szczególnie ważną rolę odgrywa  $\beta$ -endorfina, która przez niektórych uważana jest za hormon tropowy dla nerki. Może ona także przyczyniać się do rozwoju kłębuszkowego zapalenia nerek ze względu na swój indukujący wpływ na proliferację komórek mezangium [16].

Endogenne peptydy opioidowe współuczestniczą w kontroli wydzielania wewnętrznego. Pobudzają wydzielanie prolaktyny, oksytocyny i hormonu wzrostu, hamują wydzielanie gonadotropin, hormonu folikulotropowego, luteinizującego oraz hormonu tyreotropowego [15, 56]. Możliwy jest ich wpływ na wydzielanie glukokortykoidów i androgenów [15]. Hamują ponadto wydzielanie insuliny przez komórki  $\beta$ -wysp trzustkowych i mogą uczestniczyć w rozwoju cukrzycy [45]. Postulowany jest udział peptydów opioidowych w etiopatogenezie niektórych schorzeń dermatologicznych i chorób z autoimmunizacji [68, 84, 109]. W warunkach eksperymentalnych  $\beta$ -endorfina ułatwia penetrację i rozwój wirusa HIV w komórkach ośrodkowego układu nerwowego [99, 100].

### Receptory opioidowe na komórkach układu odpornościowego

Endogenne peptydy opioidowe są agonistami receptorów opioidowych [83]. Obecność dużych ilości tych receptorów stwierdzono w ośrodkowym układzie nerwowym; zwłaszcza w układzie limbicznym [48]. W myśl zaproponowanej w 1976 roku przez Martina i Gilberta, a następnie rozbudowanej teorii wieloreceptorowej wyróżnia się kilka klas receptorów opioidowych; dotychczas odkryto i opisano 6 następujących typów:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\lambda$  [48, 83]. W ostatnim okresie wyróżniono podklasy receptorów opioidowych różniące się specyficznością i siłą wiązania naturalnych i syntetycznych opioidów np.  $\mu$ -  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  i  $\mu_3$ ,  $\delta$ -  $\delta_1$  i  $\delta_2$ ,  $\kappa$ -  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  i  $\kappa_3$  [48]. Białka receptorowe poszczególnych typów receptorów są prawdopodobnie kodowane przez odmienne geny [48]. Endogenne peptydy opioidowe nie są selektywnymi agonistami określonego typu receptora opioidowego. Wykazano, że zarówno pentapeptydy: met- i leu-enkefalina, jak i  $\beta$ -endorfina są związane z porównywalnym powinowactwem przez receptory  $\mu$  i  $\sigma$  oraz ze stosunkowo niższym przez receptory  $\kappa$  [48]. Uważa się, że peptydy o dłuższych łańcuchach aminokwasowych są naturalnymi ligandami receptorów  $\kappa$ , peptydy będące produktami rozpadu proenkefaliny pobudzają zarówno receptory  $\mu$ , jak i  $\delta$ .  $\beta$ -endorfina natomiast ma prawie jednakowe powinowactwo do receptora  $\mu$  i  $\delta$  [48, 52].

Receptory opioidowe zbudowane są z łańcucha polipeptydowego, zawierającego 402–590 reszt aminokwasowych. Do wywołania odpowiedzi komórki po aktywacji tego typu receptora nie jest konieczne wniknięcie do jej wnętrza substancji sygnałnej [28]. Aktywacja receptora opioidowego zapoczątkowuje szereg procesów metabolicznych z udziałem białek G. Przyłączenie agonisty (np. morfina) katalizuje reakcję fosforylacji GDP do GTP i powoduje oddysocjowanie z białka G podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ . Podjednostka  $\alpha$  pozostaje dalej w kontakcie z receptorem, modulując jego funkcje. Dzięki aktywności GTP-azowej hydrolizuje GTP i doprowadza do odtworzenia pierwotnego kompleksu [28, 83]. Aktywacja receptorów opioidowych w ośrodkowym układzie nerwowym: hamuje syntezę cAMP, inozytolu-IP<sub>3</sub>, zwiększa przepustowość kanału potasowego [55]. Analogiczne szlaki transdukcji sygnału uru-

chamiane są w trakcie pobudzenia receptorów opioidowych na komórkach układu odpornościowego, wywołując określone efekty biologiczne [28, 83].

Do poszukiwań specyficznych receptorów opioidowych także na tych komórkach skłoniły badaczy obserwacje dotyczące reakcji komórek układu odpornościowego na związki opioidowe. Pierwsze sugestie dotyczące obecności takich molekuł pojawiły się w 1979 roku. Tworzenie rozet ludzkich limfocytów krwi obwodowej z krwinkami barana podczas ekspozycji na morfinę zależne było według Wybrana i współpr. od receptorów opioidowych [111]. W następnych latach wykazano obecność miejsc wiążących dla opiatów i peptydów opioidowych na erytrocytach, płytkach krwi, tymocytach, limfocytach, monocytach, makrofagach i granulocytach [26, 32, 52]. Metodami genetyki molekularnej ustalono, że receptory opioidowe obecne na komórkach ośrodkowego układu nerwowego i komórkach układu odpornościowego są produktami tych samych genów [32, 80, 108]. Badano obecność poszczególnych podklas receptorów opioidowych na komórkach układu odpornościowego. Wyniki dotychczasowych badań przedstawia tabela 1. Wykazano, że niektóre zmiany funkcji komórek immunokompetentnych pod wpływem peptydów opioidowych są odwracalne po zadziałaniu antagonistów receptorów opioidowych, takich jak na przykład nalokson – antagonistą nieselektywny [59].

#### Receptory niewrażliwe na nalokson na komórkach układu odpornościowego

Fakt, że nie wszystkie zmiany czynności komórek pod wpływem peptydów opioidowych były zależne od receptorów opioidowych skłonił badaczy do poszukiwań receptorów innych niż opioidowe, a wiążących te peptydy.

Madden wykazał obecność receptorów niewrażliwych na nalokson, które były specyficzne dla neuropeptydów [58]. Hazum w 1979 opisywał specyficzne miejsca wiążące dla  $\beta$ -endorfiny na limfocytach, które nie ulegały zablokowaniu pod wpływem antagonistów receptorów opioidowych. Receptory te łączyły się z karboksylowym końcem peptydu obejmującym sekwencję H-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Leu-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Gly-Glu-OH.  $\alpha$ -endorfina, nie mająca takiej sekwencji C-końcowej, nie wykazywała powinowactwa do tych miejsc wiążących [33]. Wykazano obecność podobnych receptorów dla  $\beta$ -endorfiny na monocytach U937, na limfocytach śledziony [88]. Shahabi wyizolował z komórek ludzkiego guza histiocytarnego U-937 receptory specyficzne dla  $\beta$ -endorfiny i niewrażliwe na nalokson. Receptor taki składał się z trzech podjednostek białkowych o masie 44, 59, 66 kDa, które po przyłączeniu ligandu tworzą kompleks szybko ulegający internalizacji. Proces ten zależny jest od kalmoduliny [88].

Ekspresja receptorów niewrażliwych na nalokson zależna jest od stanu fizjologicznego komórki. Splenocyty mysie stymulowane mitogenem wykazywały większą ekspresję receptorów specyficznych dla  $\beta$ -endorfiny, w porównaniu do komórek niestymulowanych [42]. Shaker opisywał istnienie na tymocytach miejsc wysoko-

Tabela 1. Obecność niektórych receptorów opioidowych na ludzkich komórkach układu odpornościowego

Podklasa receptora	Typ komórek	Źródło
$\delta$	limfocyty T , B	12
	monocyty	12
	granulocyty ( $\delta_1$ i $\delta_2$ )	59
$\mu_3$	monocyty	98
	makrofagi	98
	granulocyty	98
	komórki endotelialne	98
$\kappa$	limfocyty	52
	makrofagi	52
	tymocyty	52
<b>Specyficzne dla naloksonu</b>	limfocyty T	58
	granulocyty	58
	<b>Specyficzne dla dihydromorfiny</b>	granulocyty

i niskospecyficznych dla  $\beta$ -endorfiny. Stymulacja tych komórek przy pomocy ConA zmniejszała ekspresję miejsc wysokospecyficznych [89]. Opisano również inne czynniki modyfikujące wiązanie tych receptorów ze swoistym ligandem. Inkubacja makrofagów mysich z prostaglandyną  $E_2$  zwiększała ekspresję receptorów specyficznych dla  $\beta$ -endorfiny w badaniach Gelfanda i współprac. [27]. Autorzy ci wykazali, że funkcje receptorów regulowane są przy udziale cAMP. Zastosowanie izobutylometyloksantyny – inhibitora fosfodiesterazy zwiększało powinowactwo tych receptorów do  $\beta$ -endorfiny.

## DZIAŁANIE PEPTYDÓW OPIOIDOWYCH NA KOMÓRKI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Minęło 130 lat od doświadczeń Cantacuzene, który opisał hamowanie pod wpływem morfiny ameboidalnych ruchów ludzkich białych ciałek krwi [11]. Od tamtego czasu wielu badaczy potwierdzało udział egzogennych opiatów i endogennych peptydów opioidowych w regulacji funkcji komórek układu odpornościowego. Ostatnie dwudziestolecie przyniosło wiele nowych danych. Utarty do niedawna pogląd, według którego enkefaliny pobudzają, a  $\beta$ -endorfina hamuje procesy immunologiczne, ulega dzięki tym badaniom głębokiej weryfikacji.



Tabela 2. Wpływ wybranych peptydów opioidowych na niektóre funkcje ludzkich komórek układu odpornościowego

Komórka	Peptyd	Działanie	Źródło	
<b>Limfocyt T</b>	met-enkefalina	prolifерacja aktywowana PHA, ConA + synteza IL-2 aktywowana mitogenem +	104 2	
	$\beta$ -endorfina	prolifерacja aktywowana PHA -, + synteza IL-2 aktywowana mitogenem + ekspresja receptora dla IL-2 + ekspresja HLA DR + autologiczna mieszana reakcja limfocytów (AMLR) -	64 34, 64 114 114 21	
		met-enkefalina	sekrecja Ig w obecności <i>Staph. aureus</i> +	77
		$\beta$ -endorfina	sekrecja Ig w obecności <i>Staph. aureus</i> + sekrecja Ig w obecności <i>Herpes S.</i> +	66 66
			NK	met-enkefalina naturalna cytotoksyczność + $\beta$ -endorfina naturalna cytotoksyczność +, - synteza IFN- $\gamma$ stymulowana ConA +
<b>Monocyt</b>	met-enkefalina	chemotaksja stymulowana kazeiną +, -	77, 78	
	$\beta$ -endorfina	generowanie $O^{2-}$ +, - chemotaksja stymulowana kazeiną +, - ekspresja HLA DR i CR3 -	34 78, 86 78	
		<b>Makrofag</b>	met-enkefalina	generowanie $O^{2-}$ +, - fagocytoza +, - synteza glutationu stymulowana PMA -
$\beta$ -endorfina	generowanie $O^{1-}$ + fagocytoza +		34 40	
	dynorfina		generowanie $O^{2+}$ +	29
<b>Mastocyt</b>	$\beta$ -endorfina	uwalnianie histaminy +	90	
<b>Granulocyt</b>	met-enkefalina	wybuch tlenowy + preaktywacja +	29, 30 29	
		$\beta$ -endorfina	chemotaksja + adherencja do HUVEC +	20 20, 110

+ stymulacja, - hamowanie

### Limfocyty T

Peptydy opioidowe mogą wpływać na proliferację komórek układu odpornościowego. W badaniach prowadzonych na zwierzętach  $\beta$ -endorfina zwiększała odpowiedź proliferacyjną szczurzych limfocytów na PHA i ConA [35]. W badaniach Van der Bergha efekt ten zależny był od dawki peptydu [105]. Także met-enkefalina zwiększała proliferację ludzkich limfocytów T [3]. Heijnen, a następnie Miller wskazywali na wysoką, indywidualnie zmienną odpowiedź proliferacyjną komórek po ekspozycji na peptydy opioidowe.  $\beta$ -endorfina w zależności od dawcy i daty pobrania zarówno wzmacniała, jak i zmniejszała aktywowaną mitogenem proliferację lu-

dzkich limfocytów T [34, 64]. Efekt działania peptydów na odpowiedź proliferacyjną limfocytów stymulowaną mitogenami: PHA, ConA częściowo lub w ogóle nie był znoszony pod wpływem antagonisty receptora opioidowego – naloksonu [25].

Pojawiły się także doniesienia o możliwym udziale peptydów opioidowych w procesach związanych z rozpoznaniem i swoistą odpowiedzią na alloantygeny. W obecności  $\beta$ -endorfiny obserwowano zależne od klasycznych receptorów opioidowych hamowanie autologicznej, mieszanej reakcji limfocytów (AMLR) [21]. Wykazano także wzrost ekspresji antygenów HLA DR na komórkach jednojądrzastych po ich ekspozycji na  $\beta$ -endorfinę [3].

Wpływ na układ odpornościowy peptydy opioidowe mogą wywierać także poprzez indukcję uwalniania cytokin. Endogenne peptydy opioidowe mogą zmieniać produkcję niektórych limfokin i ekspresję receptorów na stymulowanych limfocytach. Opisywano wzrost syntezy IL-2, IFN- $\gamma$  i IL-1 przez limfocyty indukowane mitogenem w obecności endorfin i enkefalin [104, 114]. Efekt działania peptydu w tych badaniach był niezależny od klasycznych receptorów opioidowych; nie zmieniał się pod wpływem naloksonu.  $\beta$ -endorfina zmieniała także ekspresję receptora dla IL-2 na powierzchni ludzkich limfocytów T [72]. Wykazano hamujący wpływ  $\beta$ -endorfiny i met-enkefaliny na produkcję czynnika chemotaktycznego i wzmacniający sekrecję IFN- $\gamma$  przez ludzkie limfocyty [3, 81, 104]. Efekty te częściowo znoszone były pod wpływem naloksonu.

Zarówno  $\beta$ -endorfina, jak i met- i leu-enkefalina zwiększały migrację limfocytów T [34]. Efekt działania peptydów ulegał zahamowaniu pod wpływem antagonisty receptorów opioidowych – naloksonu.

### Limfocyty B

Niejednoznaczne są obserwacje dotyczące wpływu peptydów opioidowych na limfocyty B. Johnson opisywał zmniejszenie wydzielania przeciwciał przez mysie splenocyty pod wpływem  $\alpha$ -endorfiny i met-enkefaliny [34]. Wykazano hamowanie syntezy przeciwciał przez szczurze limfocyty B pobudzone przez krwinki czerwone barana [36]. Obserwowano zahamowanie sekrecji immunoglobulin przez ludzkie limfocyty B indukowane *Staphylococcus aureus* w obecności  $\beta$ -endorfiny i met-enkefaliny [43, 66]. Peptydy użyte w tych badaniach nie hamowały proliferacji komórek; działanie hamujące następowało dopiero w późniejszych etapach aktywacji bądź po proliferacji. Efekt widoczny był jedynie w przypadku przeciwciał klasy IgG i IgM, nie obserwowano wpływu peptydów na sekrecję przeciwciał klasy IgA.

W regulacji syntezy przeciwciał przez opioidy postulowany jest udział receptorów opioidowych. Pobudzenie przez selektywnych agonistów receptorów  $\mu$ ,  $\kappa$  i  $\delta$  prowadziło do spadku sekrecji przeciwciał przez ludzkie limfocyty B [66].

Obserwowano dualistyczny efekt działania peptydów na odpowiedź humoralną.  $\beta$ -endorfina i met-enkefalina w zależności od dawcy zwiększały lub hamowały wtórną odpowiedź limfocytów B na toksynę tężcza [69]. W zależności od stosowanych

dawk leu- i met-enkefalinę produkcja przeciwciał przez szczurze limfocyty B wzrastała przy niskich, a zmniejszała się przy wysokich dawkach peptydów [17]. Podobny efekt obserwowano w badaniach *in vivo*;  $\beta$ -endorfina hamowała pierwotną i zwiększała wtórną odpowiedź humoralną na antygeny u szczurów [82].

### Komórki NK

Komórki NK mają właściwość spontanicznego zabijania komórek nowotworowych i transformowanych wirusem. Efekt cytotoksyczny tych komórek nie podlega restrykcji w zakresie głównego układu zgodności tkankowej MHC [110]. Mimo że komórki NK w samej swej naturze mają właściwość spontanicznego niszczenia komórek nowotworowych, istnieje wiele czynników, które mogą modyfikować te właściwości. Pewne dane wskazują, że udział w takiej regulacji biorą także peptydy opioidowe.

We wczesnych obserwacjach notowano wzrost efektu cytotoksycznego komórek NK w stosunku do komórek linii białaczkowej K562 pod wpływem peptydów opioidowych [96]. W badaniach *in vitro* met-enkefalina zwiększała aktywność cytotoksyczną komórek NK pochodzących od zdrowych ochotników i od osób z chorobą nowotworową [79]. Takie działanie peptydów może nieść potencjalne możliwości wykorzystania ich w terapii przeciwnowotworowej. Obserwowano zahamowanie rozwoju nowotworu pod wpływem peptydów opioidowych; wydłużenie czasu przeżycia myszy białaczkowych, spadek ilości przerzutów czerniaka (B-16), guza neuroblastycznego (S20Y), mięsaka (PYB6) u myszy po iniekcjach met-enkefalinę [96]. Zmianom tym towarzyszył wzrost liczby śledzionowych komórek NK. Wyniki innych badań nie okazały się jednak już tak jednoznaczne. Obserwowano zahamowanie aktywności cytotoksycznej komórek NK pod wpływem  $\beta$ -endorfiny w badaniach Chiappelli i wspólr. [14].

Efekt działania peptydu w innych badaniach był osobniczo zmienny i różny w zależności od jego dawki, płci i wieku dawcy, a także pory dnia, w której pobierano komórki [68]. Według Mozanica aktywność komórek NK i poziom uwalniania endogennych peptydów opioidowych podlegają podobnym rytmom dobowym. Maksimum aktywności komórek, a także największy poziom peptydów opioidowych w osoczu obserwuje się w godzinach rannych, najniższe aktywności natomiast w godzinach wieczornych [68]. Także różne stany chorobowe mogą zmieniać wrażliwość komórek cytotoksycznych NK na peptydy opioidowe. Preaktywacja z  $\beta$ -endorfina lub z met-enkefalina komórek limfatycznych pochodzących od osób z ostrymi epizodami migrenowymi, osób chorych na stresową chorobę pourazową (*post traumatic stress disorder* – „Vietnam veterans”) zmniejszała aktywność cytotoksyczną komórek NK [67].

Badano także wpływ peptydów na syntezę i uwalnianie cytokin przez komórki NK.  $\beta$ -endorfina zwiększała syntezę interferonu przez komórki NK i inne komórki jednojądrzaste [23]. W odpowiedzi na dożylną dawkę leu-enkefalinę u zwierząt

obserwowano wzrost aktywności komórek cytotoksycznych i zwiększenie sekrecji IFN- $\gamma$  [23].

Niejednoznaczne są wyniki badań w warunkach *in vivo*. Met-enkefalina i  $\beta$ -endorfina podawane zwierzętom dootrzewnowo czy też dokomorowo zwiększały liczbę aktywnych śledzionowych komórek NK [23]. W innych badaniach wzrost uwalniania  $\beta$ -endorfin z przysadki mózgowej u zwierząt w czasie doświadczalnego wstrząsu korelował ze zmniejszaniem aktywności cytotoksycznej komórek NK [22, 23]. Ostatnio opisano, że działanie  $\beta$ -endorfiny na aktywne komórki NK zależne jest od receptorów opioidowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Dokomorowe podanie peptydu zwiększało u zwierząt efekt cytotoksyczny komórek NK w sposób zależny od naloksonu [44]. Podobnych zmian nie obserwowano po podskórnych dawkach opioidu. Warto dodać, że działanie met-enkefaliny na komórki NK prawdopodobnie jest niezależne od osi podwzgórze-przysadka-kora nadnerczy. Podczas gdy supresyjny efekt pentapeptydu na proliferację limfocytów zależny był *in vivo* od wzrostu poziomu osoczowego ACTH i kortykosterydów; to podobnej korelacji nie udało się ustalić w przypadku komórek NK [61]. Preinkubacja ludzkich limfocytów wzbogaconych w komórki NK z kortykosterydami nie zmieniała ich odpowiedzi na met-enkefalinę [47]. Co więcej; adrenalectomia u zwierząt nie znosiła indukującego aktywność tych komórek wpływu met-enkefaliny [61]. Próbowano stosować met-enkefalinę u myszy, którym zainfekowano wirus HIV. W trakcie trwania takiej terapii obserwowano wzrost aktywności komórek NK [91, 95].

Efekt działania  $\beta$ -endorfiny na komórki NK w warunkach *in vitro* i *in vivo* był częściowo lub całkowicie znoszony pod wpływem antagonistów receptorów opioidowych: naloksonu i naltreksonu [47, 61].

Ostatnio opisano istotną rolę jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w regulacji aktywności komórek NK przez peptydy opioidowe. Właściwości cytotoksyczne komórek NK związane są głównie z obecnością perforyn i granzymów w ich ziarnistościach azurofilnych [57, 101]. Jony wapniowe są niezbędne do właściwego uwalniania perforyn i zawierających proteiny granzymów A [57, 101]. Wykazano, że peptydy opioidowe zwiększają wpływ jonów wapniowych z mysich limfocytów i komórek Jurkat T [81]. Niezbędne wydaje się wyjaśnienie roli endogennych peptydów opioidowych w regulacji wewnątrzkomórkowych stężeń  $\text{Ca}^{2+}$  i ich znaczenia w mobilizacji komórek NK.

### Monocyty, makrofagi i mastocyty

Właściwości cytotoksyczne i bakteriobójcze jednojądrzastych komórek fagocytarnych zależne są od zdolności generowania wolnych rodników tlenowych, takich jak  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Wykazano indukujący efekt  $\beta$ -endorfiny na generowanie reaktywnych form tlenu przez izolowane ludzkie monocyty [78, 86]. Odmienne okazały się rezultaty badań prowadzonych w krwi pełnej, gdzie zaobserwowano hamowanie uwalniania wolnych rodników przez monocyty pod wpływem  $\beta$ -endorfiny [78, 86].

Zdaniem autorów tego doniesienia; pod wpływem użytego opioidu obecne w płynie doświadczalnym limfocyty uwalniały nieznane substancje hamujące aktywność monocytarnej NADPH-oksydazy odpowiedzialnej za wybuch oddechowy. W badaniach Prieto peptydy opioidowe zwiększały aktywność fagocytarną, wpływały na zmiany konformacji składowych cytoszkieletu (wimentyny), zwiększały ekspresję niektórych molekuł adhezyjnych na powierzchni monocytów [78].

W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że stymulowane przez LPS makrofagi szpiku kostnego wytwarzają i uwalniają więcej IL-1 w obecności  $\beta$ -endorfiny [3, 40]. Peptyd samoistnie nie indukował produkcji tej cytokiny, lecz działał synergistycznie z LPS zastosowanym w suboptymalnych stężeniach. Efekt ten był całkowicie znoszony przez nalokson. W innych badaniach opisano stymulujący wpływ suboptymalnych dawek  $\beta$ -endorfiny i dynorfiny na produkcję  $O_2^-$  przez ludzkie makrofagi otrzewnowe [40]. Zjawisko to hamował nalokson. Met-enkefalina wykazywała zależny od dawki i osobniczo zmienny wpływ na aktywność makrofagów, produkcję  $O_2^-$  i fagocytozę [3]. Niektóre peptydy opioidowe ( $\beta$ -endorfina, leu- i met-enkefalina) *in vivo* wzmacniały aktywność przeciweguzową mysich makrofagów stymulowanych IFN- $\gamma$  i LPS [31]. Wykazano ponadto efekt pobudzający fagocytozę makrofagów ludzkich przez  $\beta$ -endorfina [40].

Autorzy podkreślają udział receptora  $\delta$  obecnego na powierzchni makrofagów w regulacji uwalniania  $H_2O_2$ . Zablokowanie tego receptora przez wysoce selektywnego antagonistę – ICI 174864 znosiło efekt działania peptydów opioidowych na makrofagi otrzewnowe szczura [81]. Jak wskazują ostatnie obserwacje, możliwy jest także udział receptorów opioidowych w różnicowaniu makrofagów.  $\beta$ -endorfina (w sposób odwracalny pod wpływem naloksonu) stymulowała różnicowanie się makrofagów w obecności M-CSF w mieszanych hodowlach komórek mysiego szpiku kostnego [66].

Wykazano, że pod wpływem peptydów opioidowych następuje wzrost uwalniania przez mysie makrofagi mediatorów zapalnych, takich jak: IL-2, IL-4, IL-6 oraz IFN- $\gamma$  [22, 81]. Natomiast po aktywacji receptorów wysoce selektywnymi agonistami (nie będącymi peptydami opioidowymi) obserwowano zmniejszanie uwalniania przez ludzkie makrofagi IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  [60].

Zdolność do adherencji decyduje o szybkim dotarciu komórek fagocytujących z krążenia do tkanek objętych procesem zapalnym. Peptydy opioidowe, jak wskazują badania *in vitro*, mogą odgrywać rolę regulacyjną w tym procesie. W badaniach Sacerdote  $\beta$ -endorfina i met-enkefalina zwiększały spontaniczną i stymulowaną kazeiną chemotaksję komórek monocytarnych [85].

Wielu autorów zwraca uwagę na możliwość udziału peptydów opioidowych w regulacji funkcji komórek tucznych. Wydaje się, że białka te mogą brać udział w reakcjach nadwrażliwości. W sposób niezależny od naloksonu  $\beta$ -endorfina indukowała uwalnianie histaminy ze szczurzych mastocytów w badaniach Shanahana i wspólr. [90]. Działanie opioidu częściowo ulegało zahamowaniu pod wpływem

kromoglykanu sodowego. Analogiczny efekt wykazywały niektóre egzorzyny – peptydy opioidowe występujące w mleku i będące fragmentami łańcucha kazeiny. Obserwowano zwiększone wydzielanie histaminy z komórek tucznych zwierząt i ludzi pod wpływem  $\beta$ -kazomorfiny-7 [50].

### Granulocyty

Nieliczne są doniesienia na temat roli peptydów opioidowych w regulacji funkcji granulocytów. Badano wpływ peptydów opioidowych na wybuch tlenowy granulocytów. Met-enkefalina i leu-enkefalina w sposób zależny od dawki zwiększały uwalnianie przez ludzkie neutrofile (spoczynkowe i stymulowane estrami forbolu – PMA) anionorodnika ponadtlenkowego –  $O_2^-$  [29, 73]. Obserwowany efekt był osobniczo zmienny, lecz we wszystkich badanych przypadkach obserwowano indukujący wpływ peptydów w stężeniu  $10^{-8}$  M. Haberstock i współpr. wykazali wzrost uwalniania  $O_2^-$  przez neutrofile stymulowane fMLP w obecności met-enkefaliny [29, 30]. Efektowi temu towarzyszył wzrost poziomu DAG w błonie komórkowej neutrofilów, obserwowano przemieszczanie się kinazy białkowej C z cytozolu do powierzchni komórek i wypływ jonów wapniowych z magazynów wewnątrzkomórkowych na zewnątrz komórek. Efekt działania pentapeptydu był znoszony pod wpływem inhibitora kinazy białkowej C - H7 [29, 30]. Także inni autorzy potwierdzają indukujący wpływ peptydów opioidowych na wybuch tlenowy granulocytów. Wykazano, że działanie to zależne było od receptorów opioidowych. Nie stwierdzano natomiast efektu stymulacji po zastosowaniu peptydów ze zmodyfikowanym końcem aminowym [72, 73].  $\beta$ -endorfina wykazywała zdolność do zwiększania chemotaksji komórek granulocytarnych [20, 110]. Po preaktywacji komórek endotelialnych tym peptydem obserwowano zależny od receptorów opioidowych wzrost migracji ludzkich neutrofilów [109]. Ostatnie badania dowiodły, że w warunkach *in vitro* met-enkefalina może działać jako typowy preaktywator wzmagając uwalnianie anionorodnika ponadtlenkowego  $O_2^-$  przez ludzkie neutrofile stymulowane takimi czynnikami, jak: fMLP, IFN- $\gamma$  [29, 73].

W pracach Fischera i współpr.  $\beta$ -endorfina zwiększała *in vitro* adhezję neutrofilów do ludzkich komórek śródbłonkowych z żyły pępowinowej (HUVEC od ang. *human umbilical vein endothelial cells*) [20]. Badano także zachowanie się granulocytów po ekspozycji na opioidy *in vivo*. Wykazano zahamowanie chemotaksji spontanicznej i stymulowanej fMLP granulocytów u osób używających heroiny lub będących w trakcie terapii metadonowej [62]. W badanych grupach obserwowano wzrost liczby receptorów opioidowych na neutrofilach. Zdaniem tych autorów receptory opioidowe odgrywają decydującą rolę w odpowiedzi chemotaktycznej komórek na peptydy opioidowe i alkaloidy opium.

## BIODEGRADACJA PEPTYDÓW W KRĄŻENIU OBWODOWYM – ROLA PEPTYDAZ

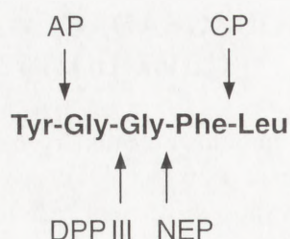
Peptydy opioidowe charakteryzują się krótkotrwałą aktywnością biologiczną. Obecne w krążeniu peptydy ulegają szybko hydrolizie enzymatycznej. Okres półtrwania enkefalin wynosi 5–15 min, natomiast  $\beta$ -endorfiny 40 min [46, 75]. W osoczu krwi i na powierzchni komórek układu odpornościowego obecne są specyficzne peptydazy, które mają aktywność lityczną w stosunku do opioidów [38, 46]. Enzymy te pod wpływem niektórych czynników mogą być uwalniane do krążenia przez komórki układu odpornościowego [38]. Aktywowane na przykład przeciwciałem anti-CD3 limfocyty CD4(+) i CD8(+) uwalniają metalopeptydazy tiolowe metabolizujące  $\beta$ -endorfinę [7]. W badaniach Bongiorno i wółpr. wykazano wzrost uwalniania peptydaz w stymulowanych komórkach jednojądrzastych, któremu towarzyszyło zwiększenie rozkładu hydrolitycznego leu-enkefaliny [7].

Szczególną uwagę badacze poświęcają obecnie tym peptydazom, które obecne są na powierzchni komórek układu odpornościowego. Ze względu na łatwy dostęp i potencjalne możliwości ich blokowania np. przez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych istnieje możliwość regulowania funkcji tych molekuł. Enzymy te są egzopeptydazami. Występują na komórkach jako integralne białka błonowe [38]. Większość z nich w centrum aktywnym zawiera atom cynku; jedynie peptydaza dwupeptydowa IV jest peptydazą serynową [38]. Obecność tych enzymów wykazano na komórkach ośrodkowego układu nerwowego, na kosmkach jelitowych, nabłonku migawkowym nerki, na komórkach łożyska [38, 102].

W największej ilości występuje obojętna endopeptydaza NEP 24.22 (EC 3.4.24.11). Jest to kluczowy enzym, który inicjuje hydrolizę peptydów opioidowych, tachykinin i peptydu natriuretycznego. Wraz z kilkoma innymi aminopeptydazami uczestniczy w degradacji peptydów opioidowych uwalnianych w synapsach [102]. Ze względu na aktywność hydrolityczną nazywany jest także enkefalinazą. Enzym ten obecny jest na makrofagach pęcherzyków płucnych, monocytach, limfocytach T, limfocytach B [102]. Metodami genetyki molekularnej ustalono, że sekwencja aminokwasowa enkefalinazy (EC 3.4.24.11.) jest identyczna z sekwencją antygeny CALLA (od ang. *common acute lymphoblastic leukaemia antigen*) opisywanym jako CD10 [54].

Inny enzym aminopeptydaza N (EC 3.4.11.2) wykazuje natomiast analogię do glikoproteiny gp 150 opisywanej jako antygen CD13 [55]. Antygen ten obecny jest na komórkach śródbłonna, nabłonkowych jelita i nerek, na błonach synaptycznych, różnicujących się komórkach hematopoetycznych linii mielo- i limfoidalnych, granulocytach, monocytach oraz limfocytach T [38].

Peptydazy mogą regulować również aktywność niektórych cytokin. W badaniach z użyciem ludzkich komórek grasiczych stwierdzano, że w warunkach *in vitro*



AP	- aminopeptydazy	
	N (EC 3.4.11.2) <b>CD13</b>	
	M (EC 3.4.11.1)	
CP	- karboksypeptydaza M	
DPP III	- dipeptyl(amino)peptydaza III	(EC 3.4.14.4)
NEP	- obojętna endopeptydaza	(EC 3.4.24.11) <b>CD10</b>

Rys. 3. Miejsca hydrolizy łańcucha aminokwasowego enkefalin i fragmentu aktywnego peptydów opioidowych przez peptydazy (wg [96] zmodyfikowany)

endopeptydaza EC 3.4.24.11 inaktywuje IL-1 $\beta$  i czynnik grasiczy THF (od ang. *thymic humoral factor*) [41]. Istotną wydaje się także rola peptydaz w kontroli procesu zapalnego. Obojętna endopeptydaza NEP 24.11 (EC 3.4.24.11) ma zdolność hydrolizowania fMLP [6, 53]. Enzym ten wykazuje działanie immunosupresyjne poprzez zdolność konwersji hormonu adrenokortykotropowego ACTH do  $\alpha$ -MSH – hormonu stymulującego melanocyty, który ma działanie immunosupresyjne [94]. Ma to znaczenie w zespole AIDS, gdzie wirus HIV może indukować syntezę ACTH, a powstały po jego konwersji pod wpływem endopeptydaz  $\alpha$ -MSH hamuje odpowiedź immunologiczną ustroju [94].

Bodźce stresowe, a także niektóre choroby mogą zmieniać aktywność układu enzymatycznego hydrolizującego peptydy opioidowe. Wykazano wzrost stężeń aminopeptydazy w osoczu krwi obwodowej u osób cierpiących na migrenę i chorobę Alzheimera [48, 92]. Zwiększoną biodegradację  $\beta$ -endorfiny czy też leu-enkefalinę obserwowano u ludzi podczas przewlekłego stresu [75, 97].

Aktywność peptydaz obecnych w osoczu kontrolowana jest przez naturalne inhibitory tych enzymów [6]. Czynnione są próby wyizolowania takich substancji. Opublikowano pierwsze korzystne wyniki badań nad zastosowaniem syntetycznie uzyskanych inhibitorów peptydaz w leczeniu zmian miażdżycowych [49].



## MOŻLIWE MECHANIZMY DZIAŁANIA PEPTYDÓW OPIOIDOWYCH NA KOMÓRKI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

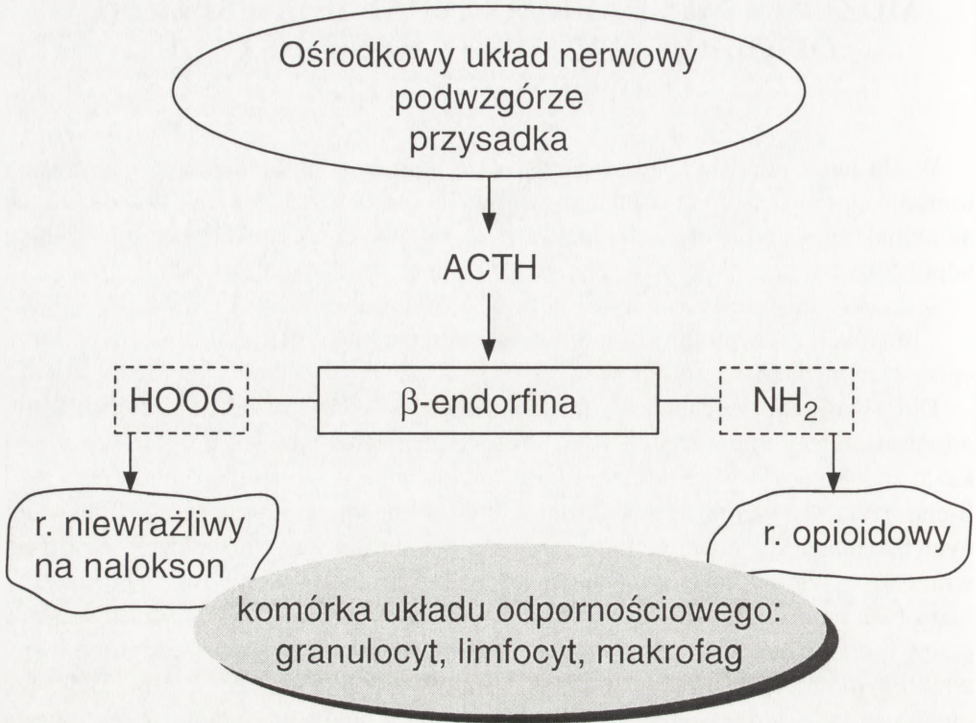
Wielu autorów wskazuje na dualistyczny (zarówno immunostymulujący, jak i immunosupresyjny) efekt działania peptydów opioidowych. Jakże są przyczyny tak niejednakowego oddziaływania peptydów opioidowych na funkcje komórek układu odpornościowego? Należy sądzić, że działanie opioidów zależy od:

- dawki stosowanych *in vitro* peptydów opioidowych,
- interakcji z receptorami opioidowymi i niewrażliwymi na nalokson receptorami, opisywanymi jako nieopiodowe.

Dla wyjaśnienia mechanizmu działania peptydów opioidowych na komórki układu odpornościowego interesujące wydają się spostrzeżenia van den Bergha. Autor wykazał indukujący wpływ końców karboksylowych  $\beta$ -endorfiny ( $\beta$ -endorfina<sub>6-31</sub> i  $\beta$ -endorfina<sub>18-31</sub>) na proliferację limfocytów wzmacnianą mitogenem [107]. W innych badaniach stwierdzano, że nieopiodowe receptory specyficzne dla  $\beta$ -endorfiny wrażliwe są właśnie na karboksylowe fragmenty łańcucha peptydowego [106]. Zdaniem tych autorów możliwa jest dwukierunkowa regulacja aktywności limfocytów przez  $\beta$ -endorfinę. Łączenie peptydu końcem karboksylowym z receptorem niewrażliwym na nalokson doprowadza do wzrostu proliferacji limfocytów. Efekt ten ulega natomiast odwróceniu po interakcji końca aminowego ligandu z receptorem opioidowym. Powinowactwo obu typów receptorów przypuszczalnie zmienia się w zależności od stężeń stosowanych peptydów i od stanu czynnościowego komórek.

Działanie peptydów opioidowych podlega kontroli układu podwzgórzowo-przysadkowo-tarczycowego. Zdaniem wielu autorów układ ten wydaje się odgrywać kluczową rolę w fizjologicznej integracji osi neuro-immuno-endokrynnej [74]. Działanie peptydów podlega regulacji przez układ hydrolizujących je enzymów, w tym w szczególności naturalnych endopeptydaz specyficznych dla niektórych opioidów. Istotnym elementem interakcji pomiędzy układem neuroendokrynnym i odpornościowym jest także zdolność syntezy *de novo* peptydów opioidowych przez komórki układu odpornościowego.

Przedstawione powyżej wyniki badań można przyjąć jako dowód na istnienie powiązań czynnościowych pomiędzy układem odpornościowym i neuroendokrynnym. Peptydy opioidowe prawdopodobnie odgrywają rolę komunikującą pomiędzy tymi układami. W tym miejscu warto nadmienić, że pojawiły się ostatnio sugestie, aby jeden z tych peptydów: met-enkefalinę sklasyfikować jako cytokinę [77]. Dostrzega się obecnie więc coraz większą rolę peptydów opioidowych w regulacji prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Wyniki dotychczasowych badań pozwalają przypuszczać także istnienie możliwości wykorzystania peptydów



Rys. 4. Przypuszczalny mechanizm działania  $\beta$ -endorfiny na komórki układu odpornościowego (wg [103, 104, 105] zmodyfikowany)

opiodowych w terapeutycznej immunomodulacji. Wymaga to jednak dalszych intensywnych badań na tym polu.

## LITERATURA

- [1] ALABSI M, BUCHANA T, LOVALLO WR. Pain perception and cardiovascular responses in men with positive parental history for hypertension. *Psychophysiology* 1996; **33**: 655–661.
- [2] ANGELOPOULOS TJ, ROBERTSON RJ, GOSS FL, UTTER A. Insulin and glucagon immunoreactivity during high-intensity exercise under opiate blockade. *Eur J Applied Physiol Occupational Physiol* 1997; **75**: 132–135
- [3] BAJPAI K, SINGH VK, DHAWAN VC, HAQ W, MATHUR KB, AGARWAL SS. Immunomodulation by two potent analogs of met-enkephalin. *Immunopharmacology* 1997; **35**: 213–220.
- [4] BENYOZ, WAHL M. Opiate receptor-mediated mechanism in the regulation of cerebral blood flow. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996, **8**: 326–357.

- [5] BLALOCK JE. Production of neuroendocrine peptide hormones by the immune system. *Proc Allergy* 1988; **43**: 1–5.
- [6] BOHACEK R, DELOMBATERT S, McMARTIN C, PRIESTLE J, GRUTTER M. Three-dimensional models of ACE and NEP inhibitors and their use in the design of potent dual ACE/NEP inhibitors. *J Am Chem Soc* 1996; **118**: 8231–8249.
- [7] BONGIORNO L, MARINI M, URBANI A, AUSIELLO CM, RODA LG. Effect of stimulation on soluble proteolytic enzymes released by peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol* 1993; **15**: 621–625.
- [8] BRAMBILLA F, FERRARI E, BRUNETTA M, PEIRONE A, DRAISCI A, SACERDOTE P, PANERAI AE. Immunoendocrine aspects of anorexia nervosa. *Psychiatr Res* 1996; **62**: 97–104.
- [9] BRAMBILLA F, GUARESCHICAZZULLO A, TACCHINI C, MUSETTI C, PANERAI AE, SACERDOTE P. Beta-endorphin and cholecystokinin 8 concentration in peripheral blood mononuclear cells of autistic children. *Neuropsychobiology* 1997; **35**: 1–4.
- [10] BRAMBILLA F, MAGGIONI M, PANERAI AE, SACERDOTE P, CENACCHI T.  $\beta$ -endorphin concentration in peripheral blood mononuclear cells of elderly depressed patients – effects of phosphatidylserine therapy. *Neuropsychobiology* 1996; **34**: 18–21.
- [11] CANTACUZENE J. Nouvelles recherches sur le mode de destruction des vibrions dans l'organisme. *Ann Inst Pasteur* 1898; **12**: 274–276.
- [12] CARR DJJ, DECOSTA B, KIM CH, JACOBSON AE, GUARCELLO AE, RICE KC, BLALOCK JE. Opioid receptors on cells of the immune system: evidence for  $\delta$ - and  $\kappa$ -classes. *J Endocrinol* 1989; **122**: 161–164.
- [13] CHAO TM, PEREZ JJ, LOEW GH. Characterization of the bioactive form of linear peptide antagonists at the  $\delta$ -opioid receptor. *Biopolymers* 1995; **38**: 759–768.
- [14] CHIAPPELLI F, YAMASHITA N, FAISAI M, KEMENY M, BULLINGTON R., NGUYEN L, CLEMENT LT, FAHEY JL. Differential effect of beta-endorphin on three cytotoxic cell populations. *Int J Immunopharmacol* 1991; **13**: 291–297.
- [15] CLARKE D, REARON U, CUNNIGHAM SK, McKENNA TJ. The steroidogenic effects of  $\beta$ -endorphin and joning peptide. A potential role in the modulation of adrenal androgen production. *J Endocrinol* 1996; **151**: 301–307.
- [16] DAVIES G, KINGSWOOD C, STREET M. Pharmacokinetics of opioid in renal dysfunction. *Clin Pharmacokinet* 1996; **31**: 410–422.
- [17] DYKSTRA LA, PRESTON KL, BIGELOW GE. Discriminative stimulus and subjective effects of opioids with mu and kappa activity: data from laboratory animals and human subjects. *Psychopharmacology* 1997; **130**: 14–27.
- [18] FAGARASAN MO, ARORA PK, AXELROD J. Interleukin-1 potentiation of  $\beta$ -endorphin secretion and the dynamics of interleukin-1 internalization in pituitary cells. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 1991; **15**: 551–560.
- [19] FONATANA F, BERNARDI P, SPAMPINATO S, BOSCHI S, IASIO R, GROSSI G. Pressor effects of endogenous opioid system during acute episodes of blood pressure increases in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; **29**: 105–109.
- [20] FISCHER EG, STINGL A, KIRKPATRICK CJ. Opioid influence on the adherence of granulocytes to human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Cell Biol Int Rep* 1990; **14**: 797–804.
- [21] FROELICH CJ. Modulation of autologous mixed lymphocyte reaction by  $\beta$ -endorphin. *J Neuroimmunol* 1987; **17**: 1–10.
- [22] GABRILOVAC J, IKIC-SUTLIC M, KNEZEVIC N, POLJAK L. Leu-enkephalin enhances interferon secretion in mice. *Res Exp Med* 1996; **196**: 137–144.
- [23] GABRILOVAC J, MARTIN-KLEINER I, OSMAK M. Modulation of NK and ADCC activities by leu-enkephalin *in vivo* and *in vitro*. *Period Biol* 1990; **92**: 79–81.

- [24] GALLI A, RANAUDO E, GIANNINI L, COSTAGLI C. Reversible inhibition of cholinesterases by opioids: Possible pharmacological consequences. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 1164–1168.
- [25] GARCIA I, PEREZ-CASTILLO A, MORENO J, ALEMANY S.  $\beta$ -endorphin inhibits interleukin-2 release and expression of interleukin-2 receptors in concanavalin A-stimulated splenic lymphocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 1992; **11**: 339–345.
- [26] GAVERIAUX-RUFF C, SIMONIN CF, PELUSO J, BEFORT K, KIEFFER B. Expression of opioid receptor mRNAs in immune cells. *Regul Pept* 1994; **54**: 103–109.
- [27] GELFAND R.A., WEPSIC HT, PARKER LN, JADUS MR. Prostaglandin E<sub>2</sub> induces up-regulation of murine macrophage  $\beta$ -endorphin receptors. *Immunol Lett* 1995; **45**: 143–148.
- [28] GERARD C, GERARD NP. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 140–145.
- [29] HABERSTOCK H, MAROTTI T. Methionine-enkephalin primes human neutrophils for enhanced superoxide anion production. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; **19**: 135–145.
- [30] HABERSTOCK H, MAROTTI T, BANFIC H. Neutrophil signal transduction in met-enkephalin modulated superoxide anion release. *Neuropeptides* 1996; **30**: 193–201.
- [31] HAGI K, UNO K, INABA K, MURAMATSU S. Augmenting effect of opioid peptides on murine macrophage activation. *J Neuroimmunol* 1994; **50**: 71–76.
- [32] HALFORD WP, GEBHARDT BM, CARR DJ. Functional role and the analysis of lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol* 1995; **59**: 91–101.
- [33] HAZUM E, CHANG KJ, CUATRECASA P. Specific nonopioid receptors for  $\beta$ -endorphin. *Science* 1979; **205**: 1033–1035.
- [34] HEIJNEN CJ, ZIJSTRA J, KAVELAARS A, CROISET G, BALLIEUX RE. Modulation of the immune response by POMC-derived peptides. *Brain Behav Immun* 1987; **1**: 284–291.
- [35] HEMMICK LM, BIDLACK JM.  $\beta$ -endorphin stimulates rat T lymphocyte proliferation. *J Neuroimmunol* 1990; **29**: 239–248.
- [36] HEMMICK LM, BIDLACK JM.  $\beta$ -endorphin suppresses rat plaque-forming cell response by non-opioid mechanism. *J Neuroimmunol* 1989; **23**: 67–71.
- [37] HERZ A. Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology* 1997; **129**: 99–111.
- [38] HOOPER NM. Family of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 1994; **354**: 1–6.
- [39] HUGHES J, SMITH TW, KOSTERLIZ HW, FOTHERGIL L, MORGAN BA, MORRIS HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; **158**: 577–579.
- [40] ICHINOSE M, ASAI M, SAWADA M. Beta-endorphin enhanced phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* 1995; **42**: 311–316.
- [41] INDIG FE, PECHT M, TRAININ N, BURSTEIN Y, BLUMBERG S. Hydrolysis of thymic humoral factor by neutral factor by neutral endopeptidases (EC.3.4.24.11). *Biochem J* 1991; **278**: 891–894.
- [42] JIA L, HARA H, OKOCHI T, NEGORO S. Regulation of  $\beta$ -endorphin receptor expression in mouse spleen cells with Con A and rIL-2. *Int J Immunopharmacol* 1992; **14**: 809–819.
- [43] JOHNSON PS, WANG JB, WANG WF, UHL GR. Expressed mu opiate receptor couples to adenylate cyclase and phosphatidylinositol turnover. *Neuroreport* 1994; **12**: 507–509.
- [44] JONSDOTTIR IH, JOHANSSON C, ASEA A, HELLSTRAND K, THOREN P, HOFFMAN P. Chronic intracerebroventricular administration of beta-endorphin augments natural killer cell cytotoxicity in rats. *Regul Pept* 1996; **62**: 113–118.
- [45] KAMEI J, KAWASHINA N, HITOSUGI H, MISAWA M, NAGASE H, KASUYA Y. Effect of diabetes on the antinociceptive effect of  $\beta$ -endorphin. *Brain Res* 1993; **619**: 76–80.
- [46] KANJHAN R. Opioids and pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; **22**: 397–403.

- [47] KLEINER IM, GABRILOVAC J. Pretreatment of human peripheral blood lymphocytes with interleukin-2 or dexamethasone does not alter their response to met-enkephalin in a NK-cytotoxic assay. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1996; **8**: 37–58.
- [48] KREEK J. Opioid receptor: some perspectives from early studies of their role in normal and in specific addictive diseases. *Neurochem Res* 1996; **21**: 1469–1488.
- [49] KUGIYAMA K, SUGIYAMA S, MATSUMURA T, OHTA Y, DOI H, YASUE H. Suppression of arteriosclerotic in cholesterol-fed treated with an oral inhibitor of neutral endopeptidase 24.11 (EC 3.4.24.11). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; **16**: 1080–1087.
- [50] KUREK M. Pokarmowe reakcje pseudoalergiczne (PAR): nietolerancje naturalnych i syntetycznych składników pożywienia naśladujące objawy alergii. *Pediatr Pol* 1996; **9**: 734–752.
- [51] LAPCHAK PA, ARAUJO DM. Interleukin-2 regulates monoamine and opioid release from the hypothalamus. *Neuroreport* 1993; **4**: 303–306.
- [52] LAWRENCE DP, EL-HAMOULY W, ARCHER S, LEARY JF, BIDLACK JM. Identification of  $\kappa$ -opioid receptors in the immune system by indirect immunofluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1062–1063.
- [53] LESSER M, FUNG K, ALMENOFF PL, ROSENBAUM C, CARDOZO C. Hydrolysis of N-formylmethionyl chemotactic peptides by endopeptidase 24.11 and endopeptidase 24.15. *Peptides* 1996; **17**: 13–16.
- [54] LETARTE M, VERA S, TRAN R, ADDIS JBL, ONIZUKA RJ, QUACKENBUSH EJ, JONGENEEL CV, McINNES RR. Common acute lymphocytic leukaemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 1988; **168**: 1247–1253.
- [55] LOOK AT, ASHUM RA, SHAPIRO LH, PEIPER SC. Human myeloid plasma glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1299–1307.
- [56] LINDOW SW, NEWHAM A, HENDRICKS MS, THOMPSON JW, VANDERSPUY ZM. The 24-hour of oxytocin and beta-endorphin secretion in human pregnancy. *Clin Endocrinol* 1996; **45**: 443–446.
- [57] LIU CC, WALSH CM, YOUNG JDE. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995; **16**: 194–201.
- [58] MADDEN JJ, DONAHOE RM, ZWEMER-COLLINS J, SHAFER DA, FALKE A. Binding of naloxone to human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1987; **36**: 4103–4109.
- [59] MAKMAN MH, BILFINGER TV, STEFANO GB. Human granulocytes contain an opiate receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* 1995; **154**: 1323–1330.
- [60] MAROTTI T, BUREK B, RABATAIC S, BALOG T, HRSK I. Modulation of lipopolysaccharide-induced production of cytokines by methionine-enkephalin. *Immunol Lett* 1994; **40**: 43–47.
- [61] MAROTTI T, RABATIC S, GABRILOVAC J. A characterization of the *in vivo* immunomodulation by met-enkephalin in mice. *Int J Immunopharmacol* 1993; **15**: 919–926.
- [62] MAZZONE A, MAZZUCHELLI I, FOSSATI G, GRITTI D, FEA M, RICEVUTI G. Granulocyte defects and opioid receptors in chronic exposure to heroin or methadone in humans. *Int J Immunopharmacol* 1994; **16**: 959–967.
- [63] McGAUGH JL, CAHILL L. Interaction of neuromodulatory systems in modulating memory storage. *Brain Behav Res* 1997; **83**: 31–38.
- [64] MILLAR DB, HOUGH CJ, MAZOROW DL, GOOTENBERG JE.  $\beta$ -endorphin's modulation of lymphocyte proliferation is dose, donor, and time dependent. *Brain Behav Immun* 1990; **4**: 232–242.
- [65] MILLIGAN CE, WEBSTER L, PIROS ET, EVANS CJ, CUNNINGHAM TJ, LEVITT P. Induction of opioid receptor-mediated macrophage chemotactic activity after neonatal brain injury. *J Immunol* 1995; **154**: 6571–6572.

- [66] MORGAN EL. Regulation of human B lymphocyte activation by opioid peptide hormones-inhibition of IgG production by opioid receptor class ( $\mu$ -,  $\kappa$ -, and  $\delta$ -) selective agonists. *J Neuroimmunol* 1996; **65**: 21–30.
- [67] MOSNAIM AD, WOLF ME, MATURANA P, MOSNAIM G, PUENTE J, KUCUCK O, GILMAN-SACHS A. *In vitro* studies of natural killer cell activity in post traumatic stress disorder patients. Response to methionine-enkephalin challenge. *Immunopharmacology* 1993; **25**: 107–116.
- [68] MOZZANICA N, VILLA ML, FOPPA S, VIGNATI G, CATTANEO A, DIOTTI R, FINZI AF. Plasma  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\beta$ -endorphin, met-enkephalin and natural killer cell activity in vitiligo. *J Amer Acad Dermatol* 1992; **26**: 693–700.
- [69] MUNN NA, LUM LG. Immunoregulatory effects of  $\alpha$ -endorphin,  $\beta$ -endorphin, methionine-enkephalin and adrenocorticotrophic hormone on anti-tetanus toxoid antibody synthesis by human lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; **52**: 376–385.
- [70] NABESHIMA T, MATSUNO K, KAMEYAMA T. Involvement of the different opioid receptors subtypes in electric shock-induced analgesia and motor suppression in the rat. *Eur J Pharmacol* 1985; **114**: 197–207.
- [71] PARSADANIANTZ SM, BATSCHE E, GEGOUTPOTTIE P, TERLAIN GILLET P, NETTER P, KERDELHUE B. Effects of continuous infusion of interleukin 1 beta on corticotropin-releasing hormone (CRH), CRH receptors, proopiomelanocortin gene expression and secretion of corticotropin, beta-endorphin and corticosterone. *Neuroendocrinology* 1997; **65**: 53–63.
- [72] PARSADANIANTZ SM, LENOIR V, FERLAIN B, KERDELHUE B. Lack of effect of interleukins 1 $\alpha$  and 1 $\beta$ , during *in vitro* perfusion on anterior pituitary release of adrenocorticotrophic hormone and  $\beta$ -endorphin in the male rat. *J Neurosci Res* 1993; **34**: 315–323.
- [73] PASOTTI D, MAZZONE A, ROSSI M, RICEVUTI G. *In vitro* effect of opioid agonists and antagonist on superoxide release by granulocytes. *Funct Neurol* 1992, **7**: 445–449.
- [74] PAWLIKOWSKI M, KOMOROWSKI J, STEPIEN H, WINCZYK K. Thyreoliberin (TRH) and Thyrotropin (TSH) as immunopotentializing hormones. *Int J Thymol* 1996; **4** (suppl.) 36–38.
- [75] PERNA GP, MODONI S, VALLE G, STANISLAO M, LOPERDIFO F. Plasma  $\beta$ -endorphin response to exercise in patients with congestive heart failure. *Chest* 1997; **111**: 19–22.
- [76] PERT CB, SYNDER SN. Opiate receptors: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; **179**: 1011–1014.
- [77] PLOTNIKOFF NP, FAITH RE, MURGO AJ, HERBERMAN RRB, GOOD RA. Methionine enkephalin: A new cytokine - human studies. *Clin Immunol Immunopathol* 1997, **82**: 93–101.
- [78] PRIETO J, SUBIRA ML, CASTILLA A, ARROYO JL, SERRANO M. Opioid peptides modulate the organization of vimentin filaments, phagocytic activity and expression of surface molecules in monocytes. *Scand J Immunol* 1989; **29**: 391–398.
- [79] PUENTE J, MATURANA P, MIRANDA D, NAVARRO C, WOLF ME, MOSNAIM AD. Enhancement of human natural killer cell activity by opioid peptides: similar response to methionine-enkephalin and  $\beta$ -endorphin. *Brain Behav Immun* 1992; **6**: 32–39.
- [80] RADULESCU RT, DECOSTA BR, JACOBSON AE, RICE KC, BLALOCK JE, CARR DJJ. Biochemical and functional characterization of  $\mu$ -opioid receptor binding site on cells of the immune system. *Prog Neuroendocrin Immunol* 1991; **4**: 166–179.
- [81] RADULOVIC J, DIMITRIJEVIC M, LABAN O, STANOJEVIC S, VASILJEVIC T, KOVACEVIC-JOVANOVIC V, MARKOVIC B. Effect of the met-enkephalin and opioid antagonists on rat macrophages. *Peptides* 1995; **16**: 1209–1213.
- [82] RADULOVIC J, MILIJEVIC C, DJERGOVIC D, VUJIC V, ANTIC J, VONHORSTEN S, JANKOVIC BD. Opioid receptor-mediated suppression of humoral immune response *in vivo* and *in vitro*: Involvement of  $\kappa$  opioid receptors. *J Neuroimmunol* 1995; **57**: 55–62.
- [83] REISINE T, BELL GI. Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurol Sci* 1993; **16**: 506–510.

- [84] RUPPRECHT M, SALZER B, RAUM B, HORNSTEIN OP, KOCH HU, RIEDERER P, SOFIC E, RUPPRECHT R. Physical stress-induced secretion of adrenal and pituitary hormones in patients with atopic eczema compared with normal controls. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; **105**: 39–45.
- [85] SACERDOTE P, BIANCHI M, MANFREDI B, PANERAI AE. Intracerebroventricular interleukin-1 alpha increases immunocyte beta-endorphin concentrations in the rat: Involvement of corticotropin-releasing hormone, catecholamines, and serotonin. *Endocrinology* 1994; **135**: 1346–1351.
- [86] SACERDOTE P, PANERAI AE. Analysis of the beta-endorphin structure-related activity on human monocyte chemotaxis: Importance of the N- and C-terminal. *Peptides* 1989; **10**: 565–569.
- [87] SCHAFER M, CARTER L, STEIN C. Interleukin-1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4219–4223.
- [88] SHABABI NA, SHARP BM. Activation of protein kinase C rapidly down-regulates naloxone-resistant receptors for  $\beta$ -endorphin on U937 cells. *J Pharmacol Exp Therap* 1993; **264**: 276–281.
- [89] SHAKER M, SHABABI NA, SHARP BM. Expression of naloxone-resistant  $\beta$ -endorphin binding sites on A20 cells; effects of concavalin A and dexamethasone. *Immunopharmacology* 1994; **28**: 183–192.
- [90] SHANAHAN F, LEE TDG, BIENENSTOCK J, BEFUS AD. The influence of endorphins on peritoneal and mucosal mast cell secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1984; **74**: 449–504.
- [91] SIN JI, SPECTER S. The role of interferon- $\gamma$  in antiretroviral activity of methionine enkephalin and AZT in a murine cell culture. *J Pharmacol Exp Therap* 1996; **279**: 1268–1273.
- [92] SINGH VK, FUDENBERG HH. Binding of [ $^{125}$ I] corticotropin releasing factor to blood immunocytes and its reduction in Alzheimer's disease. *Immunol Lett* 1988; **18**: 5–9.
- [93] SMITH EM, BLALOCK JE. Human lymphocyte production of ACTH and endorphin-like substances: association with leukocyte interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 66–77.
- [94] SMITH EM, HUGHES TKJ, HASHEMI F, STEFANO GB. Immunosuppressive effects of ACTH and MSH and their possible significance in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 782–791.
- [95] SPECTER B, PLOTNIKOFF N, BADLEY WG, GOODFELLOW D. Methionine enkephalin combined with AZT therapy reduce murine retrovirus-induced disease. *Int J Immunopharmacol* 1994; **16**: 911–917.
- [96] SRISUCHART B, FUCHS BA, SIKORSKI EE, MUNSON AE, LOVELLES SE. Antitumor activity of enkephalin analogues in inhibiting PYB6 tumor growth in mice and immunological effects of methionine enkephalinamide. *Int J Immunopharmacol* 1989; **11**: 487–500.
- [97] STAREC M, ROSINA J, MALEK J, KRŚIAK M. Influence of dynorphin A (1-13) and dynorphin A (1-10) amide on stress-induced analgesia. *Physiol Res* 1996; **45**: 433–438.
- [98] STEFANO GB, HARTMAN A, BILFINGER TV, MAGAZINE HI, LIU Y, CASARES F, GOLIGORSKY MS. Presence of the  $\mu_3$  opiate receptor in endothelial cells; coupling to nitric oxide production and vasodilation. *J Biol Chem* 1995; **270**: 30290–30294.
- [99] SUNDAR SK, KAMARAJU LS, McMAHON J, BITONTE RA, GOLLAPUDI S, WILSON WH, KONG L, HONG JS, LEE JE. Endogenous opioids and HIV infection. AIDS. [w] Friedman H [red.] Drugs of Abuse, and the Neuroimmune Axis. New York : Plenum Press 1996: 53–57.
- [100] SUNDAR SK, KAMARAJU LS, McMAHON J, BITONTE RA, GOLLAPUDI S, WILSON WH, KONG L, HONG JS, LEE JE. Beta-endorphin enhances the replication of neurotropic human immunodeficiency virus in fetal perivascular microglia. *J Neuroimmunol* 1995; **61**: 97–104.
- [101] TCHÓRZEWSKI H. Do granulocytes express the immunoregulatory functions? *Arch Immunol Therap Exp* 1992; **40**: 5–9.

- [102] TURNER AJ, BARNES K. Distribution and roles of endopeptidase 24.11. *Methods Neurosci* 1995; **23**: 344–362.
- [103] VALVEDE O, FOURNIE-ZALUSKI MC, ROQUES BP, MALDONADO R. Similar involvement of several brain areas in the antinociception of endogenous and exogenous opioids. *Eur J Pharmacol* 1996; **312**: 15–25.
- [104] VAN DEN BERGH P, DOBBER R, RAMLAL S, ROZING J, NAGELKERKEN L. Role of opioid peptides in the regulation of cytokine production by murine CD4+ T-cells. *Cell Immunol* 1994; **154**: 109–122.
- [105] VAN DEN BERGH P, ROZING J, NAGELKERKEN L. Beta-endorphin stimulates expression on mouse B cells by inducing interleukin-4 secretion by CD4+ T cells. *Cell Immunol* 1993; **149**: 180–192.
- [106] VAN DEN BERGH P, ROZING J, NAGELKERKEN L. Identification of two moities of beta-endorphin with opposing effects on rat T-cell proliferation. *Immunology* 1993; **79**: 18–23.
- [107] VAN DEN BERGH P, ROZING J, NAGELKERKEN L. Two opposing modes of action of  $\beta$ -endorphin on lymphocyte function. *Immunology* 1991; **72**: 537–543.
- [108] VAN WOUDENBERG AD, METZELAAR MJ, VAN DER KLEIJ AA, DE WIED D, BURBACH JP, WIEGANT VM. Analysis of proopiomelanocortin (POMC) messenger ribonucleic acid and POMC-derived peptides in human peripheral blood mononuclear cells: no evidence for a lymphocyte-derived POMC system. *Endocrinology* 1993; **133**: 1922–1933.
- [109] VILLIGER PM, LOTZ M. Expression of prepro-enkephalin in human articular chondrocytes is linked to cell proliferation. *EMBO J* 1992; **11**: 135–143.
- [110] WIEDERMANN CJ, SCHRATZBERGER P, KAHLER CM. Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with  $\beta$ -endorphin. *Brain Behav Immun* 1994; **8**: 270–277.
- [111] WYBRAN J, APPELBOOM T, FAMAHEY JP, GOVAERTS A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T-lymphocytes. *J Immunol* 1979; **123**: 1068–1070.
- [112] YOSHINO S, KOIWA M, SHIGA H, NAKAMURA H. Detection of opioid peptides in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; **19**: 660–668.
- [113] ZAGON IS, GIBO DM, McLAUGHLIN PJ. Adult and developing human cerebella exhibit different profiles of opioid binding sites. *Brain Res* 1990; **523**: 62–68.
- [114] ZBRÓG Z, LUCIAK M, TCHÓRZEWSKI H, POKOCA L. Modification of some lymphocyte functions *in vitro* by opioid receptor agonists and antagonists in chronic uremic patients and healthy subjects. *Int J Immunopharmacol* 1991; **13**: 475–483.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 16.04. 1997 r.*

*Przyjęto: 04.07. 1997 r.*

*Adres autora: Zakład Patofizjologii, Wojskowa Akademia Medyczna*

*Plac Hallera 1 90-647 Łódź 39*



## BIOCHEMICZNE MECHANIZMY REGULACJI RUCHU PLEMNIKÓW SSAKÓW\*

### REGULATION OF BIOCHEMICAL MECHANISMS OF MAMMALIAN SPERM MOTILITY

Władysław KORDAN, Jerzy STRZEŻEK

Katedra Biochemii Zwierząt,  
Akademii Rolniczo-Technicznej im. M. Oczapowskiego, Olsztyn-Kortowo

*Streszczenie:* W pracy dokonano przeglądu najnowszych danych dotyczących czynników wpływających na ruchliwość plemników ssaków. W kolejnych podrozdziałach omówiono budowę anatomiczną aparatu koordynacji ruchu plemników (axonema), biochemiczny mechanizm regulacji ruchliwości męskich komórek płciowych oraz wskazano na główne systemy enzymatyczne zaangażowane w kontroli czynności axonemy, z uwzględnieniem wpływu różnych czynników chemicznych na aktywność omawianych enzymów. Podkreślono rolę plazmy nasienia jako źródła substancji aktywujących i hamujących aparat ruchu plemników, w tym peptydów i białek. Przedstawiono również metody oceny ruchu plemników stosowane w diagnozowaniu płodności męskiej.

*Słowa kluczowe:* plemnik, plazma nasienia, dodatkowe gruczoły płciowe, axonema, cyklaza adenylanowa, cAMP

*Summary:* The review of this study is based on new information concerning the factors that affect motility of mammalian spermatozoa. The following subsections are based on description of the anatomical structure of coordination system of sperm motility (axoneme), regulation of biochemical mechanisms of motility of male sex cells, and the main enzymatic systems which take part in the control of axoneme activity, with regard to the influence of different chemical factors on the activity of the discussed systems. The role of seminal plasma as a source of substances, such as peptides and proteins, which activate and inhibit the mechanism of sperm motility is defined in this study. The methods of analysing sperm motility used in diagnosis male fertility are also presented in this study.

*Key words:* spermatozoa, seminal plasma, accessory sex glands, axoneme, adenylate cyclase, cAMP

\*Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 5 P06D 04908

## WPROWADZENIE

Plemniki zwierząt wyróżniają się specyficznymi mechanizmami regulacyjnymi w zakresie ich głównych funkcji fizjologicznych, tj. zdolności do ruchu i zapłodnienia komórki jajowej. Każda z wymienionych funkcji związana jest z określonymi strukturami morfologicznymi plemnika zabezpieczonymi systemami błon biologicznych i związanymi z nimi układami enzymatycznymi.

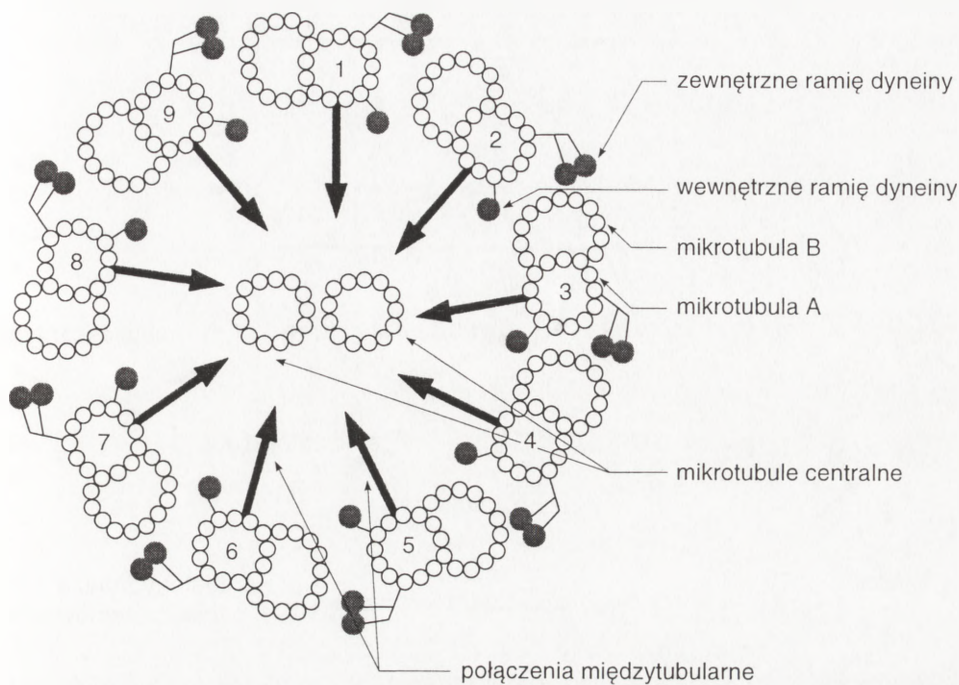
Ruch plemników możliwy jest dzięki wstawce i witce. Struktury te zawierają aparat koordynacji ruchu komórek (axonema) oraz enzymatyczny system syntezy związków energetycznych.

Głównym źródłem substancji regulujących ruchliwość męskich komórek płciowych jest plazma nasienia. Należą do nich przede wszystkim nisko- i wysokocząsteczkowe związki azotowe, działające w większości za pośrednictwem wtórnego przekaźnika – adenozyno-3',5'-monofosforanu (cAMP).

## BUDOWA APARATU RUCHU PLEMNIKÓW

Axonema zbudowana jest z dwóch włókien (mikrotubul) usytuowanych centralnie, wokół których skupionych jest 9 par mikrotubul obwodowych (9 + 2). Każda z mikrotubul obwodowych zbudowana jest z cylindrycznej mikrotubuli A, zawierającej 13 profilamentów, oraz przylegającego do niej niepełnego cylindra mikrotubuli B zawierającego 11 profilamentów [23, 70]. Opisany układ włókien, otoczony dodatkowo spiralą mitochondrialną i połączony specjalnymi wypustkami międzywłókienkowymi oraz ramionami mikrotubul, tworzy jedną funkcjonalną jednostkę podlegającą mechanizmom regulacyjnym, warunkującym ruch plemników (rys. 1).

Axonema jest kompozycją dwóch podstawowych białek. Jednym z nich jest tubulina występująca w formie dimeru (Mr 110 kDa) zbudowanego z dwóch podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ , z których każda związana jest z jedną cząsteczką GDP lub GTP. Omawiane białko wchodzi w skład ścian mikrotubul. Drugim głównym białkiem axonemy jest dyneina, wykazująca aktywność ATP-azową, zależną od jonów magnezowych. Wchodzi ona w skład ramion mikrotubul. Dyneina, podobnie jak miozyna włókna mięśniowego, jest białkiem wysokocząsteczkowym (Mr 500 kDa), jednakże białka te różnią się składem aminokwasowym [55]. Zasadniczą funkcją ATP-azy dyneinowej jest udział w procesie skurczu włókien axonemy, co z kolei związane jest z ruchem plemnika. Ruch witki plemnika polega na tworzeniu przegięć w różnych częściach wymienionej struktury. Zanik przegięć witki występuje w wyniku aktywnego ślizgania się peryferyjnych par mikrotubul, jedna o drugą. Dochodzi wówczas, podobnie jak we włóknie mięśniowym, do zamykania i rozwierania się mostków dyneinowych. Do zamykania mostków niezbędna jest obecność jonów  $Mg^{2+}$ , natomiast wiązanie i hydroliza ATP warunkują ich rozerwanie i kierunkowe ślizganie się mikrotubul.



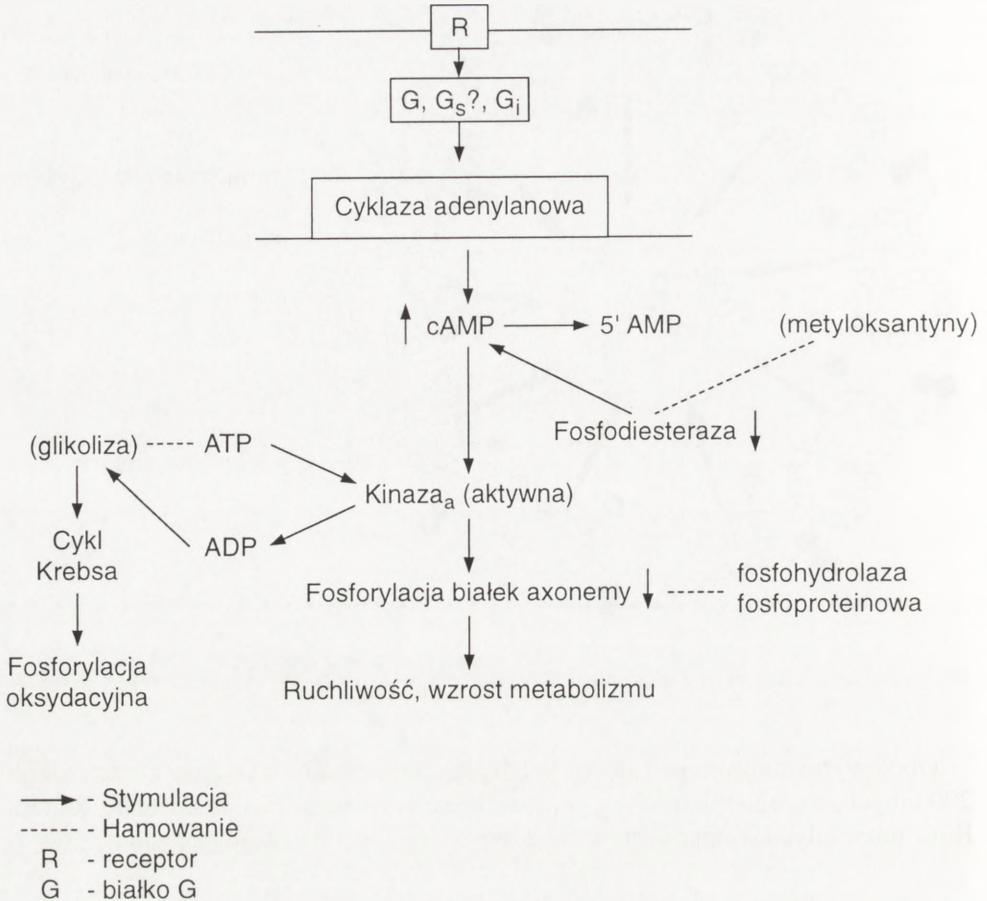
Rys. 1. Struktura axonemy

Obok wymienionych podstawowych białek, w axonemie występuje jeszcze około 200 innych, z czego tylko 30% związanych jest bezpośrednio z omawianą strukturą. Rola pozostałych komponentów białkowych nie została dotąd poznana [23].

## UDZIAŁ cAMP W REGULACJI RUCHLIWOŚCI PLEMNIKÓW

Szczególną rolę w regulacji metabolizmu i ruchliwości plemników pełni cAMP, głównie przez udział w procesach fosforylacji białek kontrolujących skurcz witki [24, 63].

Na rysunku 2 przedstawiono rolę cAMP w regulacji omawianych procesów. Poziom cAMP zależy głównie od aktywności cyklazy adenylanowej (EC 4.6.1.1), enzymu plazmolemy plemnika [3, 47] oraz od dostępności ATP, substratu omawianego enzymu [37]. Usytuowanie mitochondriów w bliskości axonemy sprzyja procesom syntezy, magazynowania i przekazywania energii dla aparatu ruchu plemników. Ładunek energetyczny plemnika zależy od równowagi między ciągami reakcji wykorzystującymi ATP i szlakami metabolicznymi wytwarzającymi ten związek. Szczególną rolę pełni tu proces utleniania aktywnego octanu [55]. Tym niemniej należy nadmienić, że zasadniczą reakcją metaboliczną plemników ssaków jest zu-



Rys. 2. Udział cAMP w regulacji metabolizmu i ruchliwości plemników

żywanie cukrów prostych do syntezy związków makroergicznych. Wszystkie heksozy, w tym również fruktoza, metabolizowane są do kwasu pirogronowego lub mlekowego drogą glikolizy fosforylującej.

Budowa i mechanizm aktywacji cyklazy adenylanowej w komórkach somatycznych poznano stosunkowo dobrze. Kluczową rolę w aktywacji omawianego enzymu pełnią białka błonowe wiążące nukleotydy guanylanowe (tzw. białka G). Białko G<sub>s</sub> uczestniczy w aktywacji, zaś G<sub>i</sub> w hamowaniu aktywności cyklazy adenylanowej, głównie przez oddziaływanie z podjednostką katalityczną enzymu. Omawiane białka to heterotrimery zbudowane z podjednostki α- wiążącej GDP lub GTP oraz podjednostek β i γ [44]. Wymienione substancje są uniwersalnym łącznikiem pomiędzy receptorami błonowymi a wewnątrzkomórkowymi białkami efektorowymi. Należy dodać, że efektorami dla białek G mogą być, oprócz cyklazy

adenylanowej, również inne enzymy, takie jak: cyklaza guanylanowa, fosfolipaza C oraz fosfolipaza A<sub>2</sub>.

W dostępnym piśmiennictwie znaleziono niewiele danych dotyczących obecności białek G w plazmolemie. W plemnikach myszy zlokalizowano białko Gi, które wydaje się uczestniczyć w regulacji aktywności cyklazy adenylanowej [21, 84]. Brak danych dotyczących obecności białka Gs w plemnikach wskazywać może na inny mechanizm regulacji aktywności omawianego enzymu w gametach męskich, w porównaniu do komórek somatycznych.

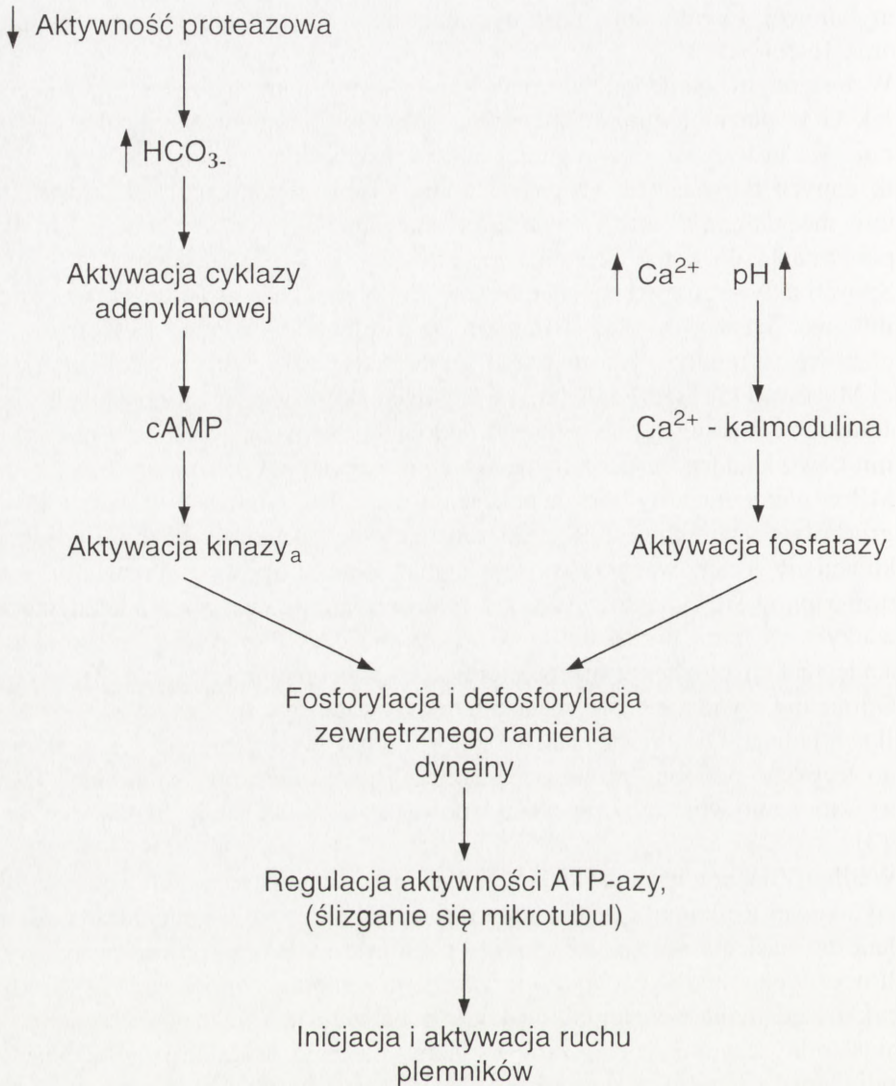
Sposób aktywacji cyklazy adenylanowej w plemnikach ssaków jest specyficzny gatunkowo. Yoshi i in. [86] stwierdzili, że w plemnikach knura i człowieka jony węglanowe stymulują syntezę cAMP przez aktywację cyklazy adenylanowej. Z kolei Morisawa [57] szczególną rolę w regulacji aktywności tego enzymu przypisuje proteinazom. Według autora trypsyno-podobna proteinaza, związana z plazmolemą plemników z najądrzy knura, hamuje aktywność cyklazy i tym samym obniża poziom cAMP w plemnikach. Głównym miejscem sekrecji inhibitorów proteinaz u knura są gruczoły pęcherzkowe [79], stąd substancje te obecne w plazmie nasienia po ejakulacji mogą hamować aktywność proteinaz. Zjawisko powyższe powoduje wzrost poziomu jonów HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, głównych aktywatorów plemnikowej cyklazy adenylanowej. Towarzyszący temu procesowi wzrost poziomu cAMP w plemnikach uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych inicjujących ruch plemników (rys. 3).

Odmienne wydaje się być mechanizm aktywacji cyklazy adenylanowej w plemnikach buhaja. Ostatnio, z nasienia tego gatunku, wyodrębniono i scharakteryzowano trypsyno-podobną proteinazę, nazwaną przez autorów "ninhibiną" (Mr 40 kDa), która aktywuje cyklazę adenylanową przez blokowanie białka błonowego Gi [3].

Według Vijayaraghavan i Hoskins [82] jednym z regulatorów aktywności cyklazy adenylanowej z plemników jest adenozyina i jej analogi. Wymienione substancje dodane do nasienia buhaja, zwiększały poziom cAMP oraz powodowały wzrost ruchliwości plemników pochodzących z ogona najądrzy. Morisawa [52] stwierdził, że cyklaza adenylanowa plemników knura pobudzana jest przez niskocząsteczkowy, termostabilny czynnik pochodzący z plazmy nasienia, oddziałujący bezpośrednio z podjednostką katalityczną enzymu. Należy dodać, że jony Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, a szczególnie Ca<sup>2+</sup> mogą stymulować plemnikową cyklazę różnych gatunków zwierząt [22].

Spośród innych regulatorów aktywności omawianego enzymu w plemnikach wymienić należy kalmodulinę – białko wiążące jony wapniowe [48]. Toscano i Gross [80] wykazali stymulujący wpływ kalmoduliny na aktywność cyklazy adenylanowej plemników konia. Zastosowane w badaniach stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> przekraczały jednak znacznie wartości fizjologiczne.

Poziom cAMP w plemnikach uzależniony jest nie tylko od aktywności cyklazy adenylanowej, ale również od aktywności fosfodiesterazy cAMP (EC 3.1.4.17.),



Rys. 3. Mechanizm inicjacji ruchliwości plemników ssaków

związanej przede wszystkim z plazmolemą i frakcją cytozolową plemnika [23]. Omawiany enzym dodany do mieszaniny zawierającej plemniki knura lub chomika pozbawione plazmolemy wyraźnie hamował ich ruch poprzez obniżenie poziomu cAMP [30].

Nie w pełni wyjaśniony jest udział jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i kalmoduliny w regulacji aktywności plemnikowej fosfodiesterazy cAMP. Z jednej strony jony  $\text{Ca}^{2+}$  są potencjalnym

aktywatores cykazy adenyłanowej, z drugiej natomiast mogą stymulować aktywność fosfodiesterazy [48]. Według Lindeman i Goltz [50] działanie jonów wapniowych na kluczowe enzymy regulujące poziom cAMP, a w konsekwencji ruchliwość plemników, uzależnione jest od zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowego pH. W niskim pH, w najądrzach, dominować może aktywacja fosfodiesterazy, natomiast w czasie kapacytacji, w układzie rozrodczym samicy, gdzie pH jest znacznie wyższe, dochodzi do stymulacji cykazy adenyłanowej wskutek wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , a w konsekwencji do "hyperaktywacji" plemników [83]. Badania Chaundry i Casillasa [11] potwierdziły hipotezę o stymulującym wpływie kalmoduliny na aktywność fosfodiesterazy cAMP. Po dodaniu  $Ca^{2+}$  i kalmoduliny do mieszaniny inkubacyjnej, zawierającej pozbawione plazmoemy plemniki buhaja, obserwowano wyraźny wzrost aktywności omawianego enzymu oraz drastyczne obniżenie poziomu cAMP. Z kolei Bhatnagar i Anad [8] stwierdzili w witce plemników bawołu obecność dwóch typów fosfodiesterazy o podobnym powinowactwie do cAMP i cGMP. Należy nadmienić, że cGMP w przypadku plemników niektórych gatunków zwierząt pełni podobną funkcję regulacyjną w stosunku do axonemy jak cAMP.

W piśmiennictwie światowym istnieje wiele doniesień odnośnie wpływu metyloksantyn – naturalnych inhibitorów fosfodiesterazy cAMP na ruchliwość plemników. Dodatek kofeiny (1,3,7-trimetyloksantyna), głównego inhibitora fosfodiesterazy cAMP i antagonisty receptorów adenozyliny, do mieszanin inkubacyjnych zawierających plemniki różnych gatunków zwierząt powodował wzrost tempa fruktolizy, oddychania oraz ruchliwości tych komórek [76]. Podobny efekt obserwowano w przypadku działania teofiliny (1,3-dimetyloksantyna) na plemniki człowieka [13]. Substancja ta znalazła również zastosowanie w ocenie zdolności zapładniającej plemników człowieka [51]. Dodatek bowiem teofiliny do plemników z zaburzeniami ruchliwości, wyraźnie poprawiał ich zdolność zapładniającą. Gould i in. [27] stwierdzili, że substancja ta w stężeniu 50 mM wyraźnie przyspieszała inicjację ruchu plemników szympansa pochodzących z ogona najądrzy. Zjawisku temu towarzyszył wzrost poziomu cAMP.

W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na rolę pentoksyfiliny (3,7-dimetylo-1-5-oksoheksyloksantyna) w stymulacji ruchliwości plemników człowieka. Shen i in. [67] wykazali, że 3-miesięczna terapia pacjentów z zastosowaniem tego związku wyraźnie zwiększała ruchliwość plemników. Tarlatzis i in. [74] oraz Tesarik i in. [77] obserwowali dodatni wpływ pentoksyfiliny na niektóre parametry ruchu plemników u mężczyzn z zaburzeniami płodności. Inni autorzy stwierdzili, że dodatek omawianej substancji w stężeniu 3,6 mM wydatnie poprawiał progresywny ruch plemników człowieka [81]. Należy dodać, że dodatek metyloksantyn (szczególnie pentoksyfiliny) do plemników wpływa dodatnio na przebieg reakcji akrosomowej [76]. Z drugiej jednak strony pentoksyfilina może pobudzać peroksydację lipidów błonowych plemników człowieka, a wytworzone w tym procesie duże ilości dial-

dehydu malonowego mogą wpływać niekorzystnie na męskie komórki płciowe [26].

Podstawą ruchu plemników ssaków są procesy fosforylacji i defosforylacji białek axonemy, w których uczestniczą plemnikowe fosfotransferazy oraz fosfohydrolazy fosfoproteinowe [18, 45, 72].

Fosfotransferazy, reprezentowane są w plemnikach, między innymi, przez kinazy białkowe zależne od cAMP (kinazy A) (EC 2.7.1.37.). Enzymy te zbudowane są z dwóch podjednostek, wykazują właściwości katalityczne w obecności wysokich stężeń cAMP. Nukleotyd ten łączy się z podjednostką regulacyjną kinazy, co powoduje oddysocjowanie podjednostki katalitycznej, odpowiedzialnej za fosforylację białek axonemy [46, 54, 57, 59]. Należy nadmienić, że aktywność kinaz białkowych uwarunkowana jest, między innymi, odpowiednim poziomem ATP w plemnikach.

Druga, alternatywna droga regulacji aparatu ruchu plemników dokonuje się przy udziale kinazy C, zlokalizowanej przede wszystkim w plazmolemie. Bezpośrednim aktywatorem enzymu jest 1,2- diacyloglicerol (DAG), produkt rozpadu 1,4-difosforanu fosfatydyloinozytolu [78]. Aktywność kinazy C uzależniona jest również od odpowiedniego poziomu jonów  $Ca^{2+}$ . Ostatnio omawiany enzym zlokalizowano w części wstawkowej ejakulowanych plemników człowieka [61] oraz najądrzowych plemników buhaja [10]. Rotem i in. [61, 62] wykazali, stymulujący wpływ aktywatorów kinazy C na ruchliwość plemników człowieka.

Mechanizm aktywacji ruchu plemników z udziałem kinazy C nie jest w pełni poznany. Tym niemniej wydaje się, że pod wpływem omawianego enzymu dochodzi do fosforylacji określonych białek odpowiedzialnych za ruch tych komórek. Opisany mechanizm może być alternatywną drogą regulacji ruchu plemników, niezależną od cAMP.

Kinazę C zlokalizowano również w plemnikach drobiu, nie stwierdzono jednak istotnego wpływu tego enzymu na ruchliwość męskich komórek płciowych [7].

W warunkach *in vivo* aktywacja plemników może być hamowana przez inhibitory kinaz, w tym fosfohydrolazę fosfoproteinową (EC 3.1.3.16.). Tash i Bracho [75] stwierdzili, że zwiększonej aktywności fosfatazy towarzyszył wzrost poziomu  $Ca^{2+}$  w plemnikach człowieka i psa, korespondujący ze spadkiem ruchliwości tych komórek.

Istotną rolę w kontroli systemów enzymatycznych axonemy plemnika pełnią składniki środowiska zwnątrkomórkowego. Zwłaszcza sprawność plazmolemy w transporcie jonowym warunkuje odpowiednią stabilność wewnątrzkomórkowego pH. Specyficzny wpływ na ruchliwość plemników wywierają przede wszystkim jony  $Ca^{2+}$ . Jak już wcześniej wspomniano, omawiane jony realizują swą funkcję przez regulację aktywności cykazy adenylnowej i fosfodiesterazy cAMP. Badania Fenga i in. [20] wykazały, że ruchliwość plemników chomika, zawieszonych w mieszaninie inkubacyjnej pozbawionej jonów  $Ca^{2+}$  była hamowana, natomiast do-



datek jonów  $\text{Ca}^{2+}$  powodował aktywację ruchu omawianych komórek. Odwrotny efekt obserwowano w przypadku plemników pozbawionych błony plazmatycznej. Wskazywać to może, że inicjacja ruchliwości plemników chomika następuje poprzez bezpośrednią aktywację cyklazy adenylanowej, a nie przez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapniowych.

Jony  $\text{Ca}^{2+}$  pełnią wyjątkową rolę podczas procesu kapacytacji plemników w żeńskim układzie rozrodczym. Po kapacytacji zmienia się rodzaj i charakter ruchu plemników z progresywnego i liniowego na bardzo energiczny, "przypadkowy", nieprogresywny i nieliniowy. Zjawisko powyższe określa się jako "hyperaktywacja" plemników. Luconi i in. [52] wykazali, że "hyperaktywacji" plemników towarzyszyło nasilenie transportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do wnętrza plemnika. Sprawność omawianego transportu, uzależniona między innymi od wartości pH środowiska, mogła być hamowana przez zmiany zewnątrzkomórkowego poziomu jonów  $\text{HCO}_3^-$ .

Jony  $\text{Ca}^{2+}$  odgrywają istotną rolę w obniżaniu intensywności oddychania komórkowego pod wpływem glukozy (tzw. efekt Crabtree). Cechą charakterystyczną komórek wykazujących efekt Crabtree (w tym również plemników) jest wysoka zdolność do beztlenowej glikolizy oraz zmniejszania szybkości syntezy ATP w mitochondriach. Zjawisko powyższe wywołane jest następującym ciągiem zdarzeń: glukoza powoduje wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie, co sprzyja akumulacji tych jonów w mitochondriach powodując jednocześnie hamowanie aktywności kompleksu syntazy ATP i obniżenie mitochondrialnych procesów oddechowych.

## PLAZMA NASIENIA JAKO ŹRÓDŁO SUBSTANCJI REGULUJĄCYCH APARAT RUCHU PLEMNİKÓW

Plazma nasienia ssaków jest mieszaniną wydzielin jąder, przewodów wyprowadzających i dodatkowych gruczołów płciowych. Z płynem tym związane są różnorodne filzjologiczne i biochemiczne funkcje nasienia. Wśród wielu komponentów plazmy nasienia substancje peptydowe i białkowe pełnią szczególną rolę w regulacji procesu zapłodnienia jaja i płodności samca [68].

Peptydy i białka plazmy nasienia uczestniczą również w mechanizmach regulacji aparatu ruchu plemników. Acott i Hoskins [1] oraz Acott i in. [2] po raz pierwszy zidentyfikowali i opisali glikoproteinę wydzielaną przez ogon najądrzy buhaja. Białko to nazwane "białko ruchu postępowego" (*forward motility protein*) inicjuje ruchliwość plemników najądrzowych przez udział w mechanizmie transportu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez plazmolemę oraz stymulację syntezy cAMP w plemnikach. Johnson in. [38] wyizolowali z plazmy nasienia mężczyzn dwie frakcje glikoproteinowe, pobudzające ruchliwość plemników. Według Juang i in. [40] czynnikiem pobudzającym ruchliwość plemników może być relaksyna. Ten peptydowy hormon (Mr

6 kDa), obecny zarówno w męskim i żeńskim układzie rozrodczym, dodany do nasienia świeżego i poddanego kriokonserwacji wyraźnie stymulował ruchliwość plemników. Poziom relaksyna w plazmie nasienia korelował dodatnio z ruchliwością plemników. Z kolei stymulujący wpływ omawianego peptydu na ruchliwość męskich komórek płciowych mógł być hamowany przez dodatek surowicy odpornościowej anti-relaksyna do mieszanin inkubacyjnych. Interesujące jest, że wcześniejsza pre-inkubacja anti-surowicy z EDTA lub kofeiną neutralizowała jej niekorzystny wpływ na ruchliwość plemników [39]. Mechanizm działania relaksyny na aparat ruchu plemników nie jest w pełni poznany. Tym niemniej, przypuszcza się że hormon ten może wpływać na podniesienie poziomu cAMP oraz zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w plemnikach.

Istotną rolę w regulacji aparatu ruchu plemników pełni również system kallikreina-kinina, obecny w plazmie nasienia wielu gatunków zwierząt [66]. Najważniejszym komponentem omawianego systemu jest bradykinina – hormon peptydowy, powstający z plazmowego kininogenu pod wpływem syntetyzowanego w prostatie enzymu proteolitycznego kallikreiny. Sato i Schill [64] stwierdzili stymulujący wpływ kallikreiny i bradykininy na aktywność aparatu ruchu plemników człowieka. Z kolei Muller i in. [58] wykazali stymulujący wpływ bradykininy na ruchliwość plemników tryka. Autorzy obserwowali dodatni wpływ omawianego hormonu zarówno na ruchliwość plemników świeżych, jak i poddanych kriokonserwacji, co sugerować może receptorowy mechanizm działania bradykininy.

Czynniki stymulujące ruchliwość plemników mogą pochodzić również spoza męskiego układu rozrodczego. Ostatnio Lee i in. [49] wyizolowali i oczyścili stymulator ruchu plemników z płynu pęcherzykowego lochy. Wyodrębniona substancja (glikoproteina o Mr 52 kDa) pobudzała ruchliwość plemników knura w zależności od jej stężenia w mieszaninie inkubacyjnej.

Obok czynników stymulujących ruchliwość męskich komórek płciowych, w plazmie nasienia zidentyfikowano wiele substancji inhibitorowych działających na aparat ruchu plemników. Najczęściej są to niskocząsteczkowe białka lub peptydy.

Garcia i Graham [25] stwierdzili, że usunięcie przez dializę niskocząsteczkowych białek plazmy nasienia przed zamrożeniem plemników buhaja, istotnie zwiększało odsetek komórek ruchliwych po rozmrożeniu.

Ostatnio Al-Somai i in. [5, 6] wykazali, że białkowe komponenty plazmowe o masach cząsteczkowych od 2 do 16 kDa, uzyskane po dializie plazmy nasienia buhaja, stanowią kompleks inhibitorów ruchliwości plemników. Omawiane formy białek niskocząsteczkowych mogą ponownie agregować do wysokocząsteczkowych białek plazmy. Wskazywać to może na funkcjonowanie w nasieniu zwierząt specyficznego mechanizmu molekularnych modyfikacji białek plazmowych, opartego na zjawiskach agregacji i dezagregacji. W ten sposób peptydy i białka plazmy nasienia mogą modulować metabolizm i ruch plemników.

Badania nad inhibitorami ruchu plemników z plazmy nasienia są wyjątkowo zaawansowane. Po raz pierwszy obecność inhibitora w plazmie nasienia buhaja tryka i królika stwierdzili de Lamirande i Gagnon [16] oraz de Lamirande i in. [15]. Działanie omawianego inhibitora ruchu plemników hamowane było przez dodatek ATP. Wyniki te sugerowały, że istnieje współzawodnictwo pomiędzy wymienionymi substancjami o wspólne miejsca receptorowe na plazmolemie plemników. Głównym źródłem omawianej substancji okazały się gruczoły pęcherzykowe i w mniejszym stopniu prostata [17]. Iwamoto i Gagnon [31] scharakteryzowali inhibitor ruchliwości plemników człowieka (pozbawionych plazmolemy). Omawiana substancja, peptyd o Mr 13–15 kDa, okazała się stabilna w szerokim zakresie pH od 5 do 10. Stwierdzono ponadto niespecyficzny gatunkowo mechanizm działania inhibitora, który hamował ruchliwość plemników nie tylko człowieka, ale również buhaja i szczura. Najwyższą aktywność omawianej substancji stwierdzono w płynie gruczołów pęcherzykowych [53]. U człowieka inhibitor syntetyzowany jest w formie białka prekursorowego (Mr 52 kDa), które podczas procesu upłynnienia ejakulatu podlega degradacji do mniejszych polipeptydów przez proteazy pochodzące z prostaty. Dzięki temu zjawisku plemniki odzyskują zdolność do ruchu [60]. Iwamoto i in. [34] wyodrębnili ponadto termostabilny inhibitor ATP-azy dyneinowej (SPMI) z plazmy nasienia knura. SPMI okazał się heterogennym białkiem o szerokim optimum pH, zawierającym się w przedziale 6–11, który hamował ruchliwość plemników pozbawionych plazmolemy przez oddziaływanie z funkcjonalnym ramieniem dyneiny mikrotubul axonemy. Po ustaleniu sekwencji aminokwasowej omawianego inhibitora [32], stwierdzono jego homologię z białkiem AQN 3, należącym do grupy tzw. spermadhezyn, wiążących się po ejakulacji na plazmolemie plemników knura i zaangażowanych w procesie interakcji plemników z osłoną przejrzystą jaja [9]. Najwyższą aktywność SPMI stwierdzono w płynie gruczołów pęcherzykowych, niższą w plazmie nasienia i płynie ogona najądrzy [33].

Ostania Jeng i in. [35] opisali dwa inhibitory (Mr 15kDa) ruchliwości plemników z plazmy nasienia knura. Omawiane substancje wywierały ponadto inhibitorowy wpływ na aktywność chymotrypsyny. Autorzy wykazali, że ruchliwość plemników mogła być przywrócona po inkubacji tych komórek z płynem pęcherzykowym lochy.

Również w naszym laboratorium oczyszczono i częściowo scharakteryzowano peptydowy czynnik hamowania ruchu plemników z plazmy nasienia knura (SMIF) [72]. Peptyd ten (Mr 5,7 kDa) ma zdolność naruszania wewnątrzplemnikowej homeostazy, co przejawia się inaktywacją aparatu ruchu plemników różnych gatunków zwierząt oraz zdecydowanym obniżeniem poziomu ATP w tych komórkach [43]. Wyniki badań z zastosowaniem metyloksantyn wykazały, że SMIF działając przez adenylinowe receptory plazmolemy (zwłaszcza receptor  $A_2$ ) stymulował cyklazę adenylinową i w konsekwencji powodował wzrost cAMP w komórce [41]. Ostatnio stwierdzono, że SMIF jest komponentem wielofunkcyjnej cynkoglikoproteiny plazmy nasienia knura opisaną przez Hołodego i in. [29] oraz Strzeżka i Hołodego

Tabela 1. Wybrane czynniki fizjologiczne biorące udział w regulacji aparatu ruchu plemników

Czynnik	Pochodzenie	Sposób działania	Piśmiennictwo
cAMP	męski i żeński układ rozrodczy	aktywacja kinazy A, inicjacja ruchliwości plemników	San Augustin i Witman, 1994, Co-wart i in., 1994
białko ruchu postępowego	ogon najądrzy	stymulacja syntezy cAMP, inicjacja ruchliwości plemników	Acott i Hoskins, 1981, Acott i in., 1983
glikoproteina 52 kDa	płyn pęcherzykowy lochy	stymulacja ruchu plemników	Lee i in., 1992
kompleks białek plazmowych (2–16 kDa)	plazma nasienia	hamowanie ruchliwości plemników	Al-Somai i in., 1994a, 1994b
białkowy inhibitor ruchliwości plemników	gruczoły pęcherzykowe, prostata	hamowanie ruchliwości plemników pozbawionych plazmolemy	De Lamirande i Gagnon, 1983, 1984, De Lamirande i in., 1986, 1987
białkowy inhibitor ATP-azy dyneinowej (SPMI)	gruczoły pęcherzykowe, ogon najądrzy	hamowanie aktywności ATP-azy dyneinowej, hamowanie ruchliwości plemników pozbawionych plazmolemy	Iwamoto i in., 1992, 1993, 1995
peptydowy czynnik hamowania ruchliwości plemników (SMIF)	gruczoły pęcherzykowe knura	spadek poziomu ATP w plemnikach, hamowanie ruchliwości plemników	Strzeżek i in., 1992, Kordan i Strzeżek 1992, Kordan i in., 1997
białkowy czynnik hamowania ruchliwości plemników koguta	plazma nasienia	hamowanie ruchliwości plemników	Mohan i in., 1995
seminalplazmin	plazma nasienia	hamowanie ruchliwości plemników	Scheit i in., 1985, 1986
białkowe inhibitory ruchliwości plemników (SMI 1, SMI 2)	plazma nasienia	hamowanie ruchliwości plemników	Jeng i in., 1993

[71]. W innych badaniach [42] wykazano między innymi, że omawiany inhibitor powodował zmiany morfologiczne plazmolemy w regionie akrosomowym, hamował peroksydację lipidów [12] oraz stabilizował chromatynę plemników knura [42]. Oprócz wymienionych właściwości, stwierdzono również antybakteryjną aktywność SMIF w stosunku do niektórych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [72].

Ostatnio Mohan i in. [56] oczyścili z plazmy nasienia koguta wysokocząsteczkowy (Mr 78 kDa), białkowy czynnik hamowania ruchliwości plemników (SMIF), który

wykazywał ponadto właściwości antybakteryjne. Autorzy nie obserwowali zmian w poziomie ATP w plemnikach pod wpływem SMIF. Sugerować to może inny sposób inaktywacji aparatu ruchu plemników przez omawiany inhibitor, w porównaniu z opisanym przez nas [43].

W plazmie nasienia buhaja stwierdzono obecność peptydu "seminalplasmin" (Mr 5,4 kDa), który obok właściwości hamowania ruchu plemników i reakcji akrosomowej wykazywał właściwości bakteriostatyczne wobec różnych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [65].

W tabeli 1 zestawiono omawiane wcześniej ważniejsze czynniki uczestniczące w regulacji aktywności aparatu ruchu plemników, jednakże dokładne poznanie mechanizmu działania tych substancji wymaga dalszych badań.

## METODY OCENY RUCHU PLEMNIKÓW W DIAGNOZOWANIU PŁODNOŚCI

Ocena ruchu plemników przy zastosowaniu konwencjonalnej metody z użyciem mikroskopu świetlnego jest mało precyzyjna, a jej wynik w dużej mierze uzależniony jest od subiektywnej oceny osoby przeprowadzającej badania. W ostatnich latach zastosowano z powodzeniem komputerowe systemy oceny jakości nasienia, w tym system CASA (*Computer-Assisted Semen Analysis*). Zaletą tego systemu jest możliwość precyzyjnej oceny indywidualnego ruchu plemników, z uwzględnieniem prędkości poszczególnych komórek w jednostce czasu. Dodatkowo system CASA klasyfikuje rodzaj ruchu plemników na postępowo-liniowy, nieliniowy oraz cyrkulacyjny [14].

Gunzel-Apel i in. [28] wykazali, że odsetek plemników z ruchem postępowym i liniowym jest istotnym parametrem w ocenie przydatności omawianych komórek do kriokonserwacji. Wskaźniki te korelowały również z ruchliwością plemników po rozmrożeniu. Z kolei Yeung i Nieschlag [85] stwierdzili, że precyzyjna ocena indywidualnego ruchu plemników pomocna jest w diagnozowaniu płodności męskiej, a prawidłowe parametry ruchu korelowały z szybkością transportu plemników w żeńskim układzie rozrodczym. Należy zaznaczyć, że system CASA używany jest często do oceny zmian w parametrach ruchu, jakie zachodzą podczas hyperaktywacji plemników poddanych procesowi kapacytacji [73]. Stachecki i in. [69] stwierdzili istotne różnice w parametrach ruchu pomiędzy plemnikami z normospermią a wykazującymi zmiany morfologiczne w regionie witki. Autorzy wykazali, że ruch postępowy uzależniony jest od częstotliwości uderzeń witki, zaś uszkodzenia zarówno wstawki, jak i witki powodują obniżenie prędkości ruchu plemników. Generalnie najważniejszym parametrem w ocenie przydatności plemników do zapłodnienia jest ruch liniowy. Aitken i in. [4] obserwowali obniżenie prędkości ruchu liniowego

oraz wartości odchylenia główek plemników u mężczyzn nieplodnych. Parametry te korelowały ze zdolnością zapładniającą plemników przy użyciu testu penetracji jaj chomika [19]. Jeulin i in. [36] wykazali natomiast istotne korelacje pomiędzy wartością omawianych wskaźników a powodzeniem zapłodnienia *in vitro* u człowieka.

Znajomość molekularnych mechanizmów kontroli aparatu ruchu plemników oraz dobór odpowiedniej metody oceny ruchliwości omawianych komórek wydają się być podstawą pełniejszego zrozumienia zjawisk towarzyszących procesowi zapłodnienia u ssaków.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ACOTT TS, HOSKINS DD. Bovine sperm forward motility protein: binding to epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1981; **24**: 234–238.
- [2] ACOTT TS, KATZ DF, HOSKINS DD. Movement characteristics of bovine epididymal spermatozoa: effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol Reprod* 1983; **29**: 389–399.
- [3] ADENIRAN A J, SHOSHANI I, MINUTH M, AWAD JA, ELCE JN, JOHNSON R A. Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence of adenyl cyclase-activating protease from bovine sperm. *Biol Reprod* 1995; **52**: 490–499.
- [4] AITKEN RJ, WARNER P, BEST FSM, TEMPLETON AA, DJAHANBAKHICH O, MORTIMER D, LEES MM. The predictability of subnormal penetrating capacity in cases of unexplained infertility. *Int J Androl* 1983; **6**: 212–220.
- [5] AL-SOMAI N, VISHWANATH R, MOLAN PC., SHANNON P. Anionic and cationic components from protein aggregates in bovine seminal plasma and their effects on sperm motility. *Mol Reprod Dev* 1994; **39**: 328–336.
- [6] AL-SOMAI N, VISHWANATH R, SHANNON P, MOLAN PC. Low molecular weight components in bovine semen diffusate and their effects on sperm motility of bull sperm. *Reprod Fertil Dev* 1994; **6**: 165–171.
- [7] ASHIZAWA K, KATAYAMA S, KOBAYASHI T, TSUZUKI Y. Possible role of protein kinase C in regulation of flagellar motility and intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration of fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1994; **101**: 511–517.
- [8] BHATNAGAR SK, ANAD SR. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in midpiece and tail of buffalo spermatozoa and its role in sperm motility. *Bioch Bioph Acta* 1982; **716**: 133–139.
- [9] CALVETE JJ, SOLIS D, SANZ L, DIAZ-MAURINO T, SCHAFER W, MANN K, TOPFER-PETERSEN E. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. *Eur J Bioch* 1993; **218**: 719–725.
- [10] CHAUNDRY P S, CASILLAS ER. Isozymes of protein kinase C in bovine sperm. *Arch Bioch Bioph* 1992; **295**: 268–272.
- [11] CHAUNDRY PS, CASILLAS ER. Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase in plasma membranes of bovine epididymal spermatozoa. *Arch Bioch Bioph* 1988; **262** (2): 439–444.
- [12] CHMURA J, STRZEZEK J, SŁAWIŃSKI J, KORDAN W, GODLEWSKI M. Antioxidative properties of the sperm motility inhibiting factor from boar seminal plasma as determined by

- electrochemiluminescent method. IV Międzynarodowe Sympozjum "Molekularne i Fizjologiczne Aspekty Regulacji Ustrojowej", Kraków 1995; 60–63.
- [13] COWART CL, LONDON SN, VERNON MW, PEDIGO NG. The effects of cyclic adenosine monophosphate, forskolin, and theophylline on motility parameters in gossypol-treated human sperm. *Fertil Steril* 1994; **61** (5): 929–934.
- [14] DAVIS RO, SIEMERS RJ. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 1995; **7**: 857–869.
- [15] DE LAMIRANDE E, BELLES-ISLES MC, GAGNON C. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Ann NY Acad Sci* 1984; **438**: 125–130.
- [16] DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Aprotinin and seminal plasma factor provide two new tools to study the regulation of sperm motility. *J Submicrosc Cytol* 1983; **15** (1): 83–87.
- [17] DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Origin of a motility inhibitor within the male reproductive tract. *J Androl* 1984; **5**: 269–276.
- [18] EMILIOZZIC, FENICHEL P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol Reprod* 1997; **56**: 674–679.
- [19] FENEUX D, SERRES C, JOUANNET P. Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? *Fertil Steril* 1985; **44**: 508–511.
- [20] FENG B, BHATTACHARYYA A, YANAGIMACHI R.  $Ca^{2+}$  is essential for the motility of plasma membrane - intact, but not of demembranated, hamster spermatozoa. *Andrologia* 1988; **20** (1): 155–162.
- [21] FRASER LR. Adenosine and its analogues, possibly acting at  $A_2$  receptors, stimulate sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. *J Reprod Fertil* 1990; **89**: 467–476.
- [22] FRASER LR, McDERMOT CA.  $Ca^{2+}$ -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J Reprod Fertil* 1992; **96**: 363–377.
- [23] GAGNON C. Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Rprod Fertil Dev* 1995; **7**: 847–855.
- [24] GALANTINO-HOMER HL, VISCONTI PE, KOPF GS. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by cyclic adenosine 3,5- monophosphate-dependent pathway. *Biol Reprod* 1997; **56**: 707–719.
- [25] GARCIA M A, GRAHAM E F. Dialysis of bovine semen and its effect on fresh and freeze-thawed spermatozoa. *Cryobiology* 1987; **24**: 446–454.
- [26] GAVELLA M, LIPOVAC V. Effect of pentoxifylline on experimentally induced lipid peroxidation in human spermatozoa. *Int J Androl* 1994; **17**: 308–313.
- [27] GOULD KG, YOUNG LG, HINTON BT. Alteration in primate sperm motility with maturation and during exposure to theophylline. *Am J Primat* 1988; **15**: 325–336.
- [28] GUNZEL-APEL AR, GUNTHER C, TERHAER P, BADER H. Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1993; **47**: 271–278.
- [29] HOŁODY D, STRZEŻEK J, BORKOWSKI K, GIŃDZIENSKI A, KORDAN W, TORSKA J. Purification and partial characterization of the 54 kDa glycoprotein from boar seminal plasma. *App Biol Comm* 1994; **4** (5–6): 131–139.
- [30] ISHIDA K, OKUNO M, MORISAWA S, MOHRI T, MOHRI H, WAKU M, MORISAWA M. Initiation of sperm motility induced by cyclic AMP in hamster and boar. *Dev Growth Differ* 1987; **29** (1): 47–56.
- [31] IWAMOTO T, GAGNON C. Purification and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *J Androl* 1988; **9** (6): 377–383.
- [32] IWAMOTO T, HIROAKI H, FURUICHI Y, WADA K, SATOH M, SATOH M, OSADA T, GAGNON C. Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein. *FEBS Letters* 1995; **368**: 420–424.
- [33] IWAMOTO T, TANAKA H, OSADA T, SHINAGAWA Y, OSAMURA C, GAGNON C. Origin of a sperm motility inhibitor from boar seminal plasma. *Mol ReprodDev* 1993; **36**: 475–481.

- [34] IWAMOTO T, TSANG A, LUTERMAN M, DICKSON J, DE LAMIRANDE E, OKUNO M, MOHRI H, GAGNON C. Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATP-ase inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 1992; **31**: 55–62.
- [35] JENG H, LIU KM, CHANG WCH. Purification and characterization of reversible sperm motility inhibitors from porcine seminal plasma. *Bioch Bioph Res Comm* 1993; **19**: (2): 435–440.
- [36] JEULIN C, FENEUX D, SERRES C, JOUANNET P, GUILLET-ROSSO F, BELAISCH-ALLART J, FRYDMAN R, TESART J. Sperm factors related to failure of human *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil* 1986; **76**: 735–744.
- [37] JEULIN C, SOUFIR JC. Reversible intracellular ATP changes in intact spermatozoa and effects on flagellar sperm movement. *Cell Motil Cytoskeleton* 1992; **21**: 210–222.
- [38] JOHNSON WL, HUNTER AG, JEYENDRAM RS, REREZ-PELAEZ M. Association of asthenozoospermia with a deficiency of a seminal glycoprotein. *Int J Fertil* 1985; **30** (2): 57–60.
- [39] JUANG HH, MUSAH AI, ANDERSON LL. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and caffeine are antagonistic to antirelaxin serum inhibition of porcine sperm motility. *Anim Reprod Sci* 1990; **22**: 253–260.
- [40] JUANG HH, MUSAH AI, SCHWABE C, ANDERSON LL. Immunoactive relaxin in boar seminal plasma and its correlation with sperm motility. *Anim Reprod Sci* 1990; **22**: 47–53.
- [41] KORDAN W, STRZEŻEK J. The influence of the sperm motility inhibiting factor (SMIF) from boar seminal plasma on the ATP and cAMP contents in spermatozoa. *App Biol Comm* 1992; **2** (6–7): 285–292.
- [42] KORDAN W, HOŁODY D, ERICSSON B, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, STRZEŻEK J. Sperm motility inhibiting factor (SMIF) – a component of the 54 kDa glycoprotein from boar seminal plasma acting through membrane receptors on spermatozoa. *Reprod Donn Anim* 1997 (w druku)
- [43] KORDAN W, STRZEŻEK J. Wpływ niskocząsteczkowego inhibitora ruchu plemników (SMIF) z plazmy nasienia knura na ładunek energetyczny plemników różnych gatunków zwierząt. *Mat XXX Zjazdu PTBioch* 1994; 46–47.
- [44] KWIATKOWSKA J, Białka G jako "uniwersalny łącznik" w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. *Post Bioch* 1988; **24** (3): 123–130.
- [45] LECLERC P, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Cyclic adenosine 3,5-monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* 1996; **55**: 684–692.
- [46] LECLERC P, GAGNON C. Phosphorylation of Triton X-100 soluble and insoluble protein substrates in a demembrated/reactivated human sperm model. *Mol Reprod Dev* 1996; **44**: 200–211.
- [47] LECLERC P, KOPF GS. Mouse sperm adenylyl cyclase: general properties and regulation by the zona pellucida. *Biol Reprod* 1995; **52**: 1227–1233.
- [48] LECLERC P, SIRARD MA, CHAFOULEAS JG, LAMBERT RD. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1992; **94**: 23–32.
- [49] LEE SL, KUO YM, KAO CHCH, HONG CHY., WEI YH. Purification of a sperm motility stimulator from porcine follicular fluid. *Comp Biochem Physiol* 1992; **101b** (4): 591–594.
- [50] LINDEMAN CB, GOLTZ JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in Triton X-100 extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskeleton* 1988; **10**: 420–431.
- [51] LOUGHLIN KR, AGARWAL A. Use of theophylline to enhance sperm function. *Arch Androl* 1992; **28**: 99–103.
- [52] LUCONI M, KRAUSZ C, FORTI G, BALDI E. Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1996; **55**: 207–216.
- [53] LUTERMAN M, IWAMOTO T, GAGNON C. Origin of the seminal plasma motility inhibitor within the reproductive tract. *Int J Androl* 1991; **14**: 91–98.



- [54] MACLEOD J, MEI X, ERLICHMAN J, ORR GA. Association of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase and its binding proteins with the fibrous sheath of rat sperm flagellum. *Eur J Biochem* 1994; **255**: 107–114.
- [55] MANN T, LUTWAK-MANN C. Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, New York 1981.
- [56] MOHAN J, SAINI M, JOSHI P. Isolation of a spermatozoa inhibiting factor from chicken seminal plasma with antibacterial property. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1245**: 407–413.
- [57] MORISAWA M. Cell signalling mechanism for sperm motility. *Zool Sci* 1994; **11**: 647–662.
- [58] MULLER K, HEDER G, NEHRING H, SIEMS WE, WOLFR. Investigations on the influence of bradykinin upon the motility of ram spermatozoa. *Andrologia* 1991; **23**: 357–362.
- [59] PARISET C, WEINMAN S. Differential localization of two isoforms of the regulatory subunit RII of cAMP-dependent protein kinase in human sperm. Biochemical and cytochemical study. *Mol Reprod Dev* 1994; **39**: 415–422.
- [60] ROBERT M, GAGNON C. Purification and characterization of the active precursor of a human sperm motility inhibitor secreted by the seminal vesicles: identity with semenogelin. *Biol Reprod* 1996; **55**: 813–821
- [61] ROTEM R, PAZ GF, HOMONNAI ZT, KALINA M, NAOR Z. Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Na. Acad Sci USA* 1990a; **87**: 7305–7308.
- [62] ROTEM R., PAZ GF, HOMONNAI ZT, KALINA M, NAOR Z. Further studies on the involvement of protein kinase C in human sperm flagellar motility. *Endocrinology* 1990b; **127**: 2571–2577.
- [63] SAN AUGUSTIN JT, WITMAN GB. Role of cAMP in the reactivation ram spermatozoa. *Cell Mot Cyt* 1994; **27**: 206–218
- [64] SATO H., SCHILL WB. Temperature-dependent effects of components of kallikrein-kinin system on sperm motility *in vitro*. *Fertil Steril* 1987; **47** (4): 684–688.
- [65] SCHEIT KH, ZIMMER M, SHYAMALA RAO N, PRASAD KSM, BHARGAVA PM. Antibacterial activity of seminalplasmin a basic protein from bovine seminal plasma. *Microbios* 1986; **45**: 105–112.
- [66] SCHILL WB, MISKA W. Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 1992; **24**: 69–75.
- [67] SHEN R M, CHANG PH, YANG RCH, HONG CHY, CHEN SS. Pentoxifylline stimulates sperm motility both *in vitro* and after oral therapy. *Br J Pharmac* 1991; **31**: 711–714.
- [68] SHIVAJI S, SCHEIT KH, BHARGAWA PM. Proteins of seminal plasma Wiley, New York 1990.
- [69] STACHECKI JJ, GINSBURG KA, LEACH RE, ARMANT DR. Computer - assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J Androl* 1993; **14** (1): 60–65.
- [70] STRZEŻEK J. Struktury morfologiczne plemnika i ich funkcja biochemiczna. *Biuletyn Informacyjny, Dział Wydawnictw ART* 1988; 67–89.
- [71] STRZEŻEK J, HOŁODY D. Separation of 54 kDa glycoprotein with suppressive properties from boar seminal plasma. *Adv Contra Deliv Syst* 1996; **12**: 235–246.
- [72] STRZEŻEK J, KORDAN W, KOSTYRA H, ZABORNIAK A. Purification and partial characterization of a 5700 Da sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. *Anim Reprod Sci* 1992; **29**: 35–52.
- [73] SUAREZ SS, KATZ DF, OWEN DH, ANDREW JB, POWEL RL. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* 1991; **44**: 375–381.
- [74] TARLAZIS BC. Effect of pentoxifylline on human sperm motility and fertilizing capacity. *Arch Androl* 1995; **34**: 33–42.
- [75] TASH JS, BRACHO CE. Regulation of sperm motility: emerging evidence for major role for protein phosphatases. *J Androl* 1994; **15** (6): 505–509.

- [76] TESARIK J, MENDOZA C, CARRERAS A. Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril* 1992a; **58** (6): 1185–1190.
- [77] TESARIK J, THEBAULT A, TESTART J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod* 1992b; **7** (9): 1257–1263.
- [78] TOMES CN, McMASTER CR, SALING PM. Activation of mouse sperm phosphatidylinositol -4,5 biphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* 1996; **43**: 196–204.
- [79] TORSKA J, STRZEZEK J. Proteinase inhibitor of high molecular weight in seminal plasma of boars. *Adv Contra Deliv Syst* 1995; **11**: 217–218.
- [80] TOSCANO WA, GROSS MK. Calmodulin-mediated adenylyl cyclase from equine sperm. *Met Enzym* 1991; **195**: 92–110.
- [81] TOURNAYE H, JANSSENS R, CAMUS M. Pentoxifylline is not useful in enhancing sperm function in cases with previous *in vitro* fertilization failure. *Fertil Steril* 1993; **39** (1): 210–215
- [82] VIJAYARAGHAVAN S, HOSKINS DD. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate by adenosine and its analogues. *Biol Reprod* 1987; **34**: 468–477.
- [83] VISCONTI PE, MOORE GD, BAILEY JL, LECLERC P, CONNORS SA, PAN D, OLDS-CLARKE P, KOPF GS. Capacitation in mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; **121**: 1139–1150.
- [84] WILDE MW, WARD CR, KOPF GS. Activation of G protein in mouse sperm by the zona pellucida, an egg-associated extracellular matrix. *Mol Reprod Dev* 1992; **31**: 297–306.
- [85] YEUNG CHH, NIESCHLAG E. Performance and comparison CASA systems equipped with different phase-contrast optics. *J Androl* 1993; **14** (3): 222–228.
- [86] YOSHI S, ISHIKAWA H, KOISO K, OKAMURA N. The relationship between the sperm motility and adenylate cyclase activity, and the bicarbonate levels in human. *Jap Fert Implant* 1987; **4**: 9–11.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 19.06. 1997 r.

Przyjęto: 10.07. 1997 r.

Adres autora: ul. Oczapowskiego 5,  
10-718 Olsztyn-Kortowo

## APOPTOZA W UKŁADZIE ODPORNOŚCIOWYM – ROLA Fas, bcl-2 I INTERLEUKINY 2

### APOPTOSIS IN THE IMMUNE SYSTEM – ROLE OF Fas, Bcl-2 AND IL-2

Jacek ROLIŃSKI

Zakład Immunologii Klinicznej i Klinika Hematologii AM w Lublinie

*Streszczenie:* Apoptoza odgrywa istotną rolę w rozwoju i w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Można wyróżnić dwa mechanizmy prowadzące do apoptozy komórek układu odpornościowego: 1) dodatnie sygnały indukujące apoptozę poprzez połączenie liganda (Fas-L) do receptora na powierzchni komórki (Fas) 2) negatywna indukcja poprzez utratę sygnałów hamujących apoptozę (utrata hamującego działania cytokin). Rodzina białek bcl-2 odgrywa centralną rolę w regulacji apoptozy związanej z brakiem sygnałów pochodzących od cytokin. Zwiększona ekspresja niektórych członków rodziny (np. bcl-2 i bcl-x<sub>L</sub>) hamuje apoptozę w przypadku niedoboru cytokin. Nadmierna ekspresja innych członków rodziny (np. bax i bad) tłumi sygnały pochodzące od receptorów cytokinowych i indukuje apoptozę. Artykuł przedstawia obydwa mechanizmy śmierci zachodzące w aktywowanych komórkach układu odpornościowego.

*Słowa kluczowe:* apoptoza, Fas, Fas-L, bcl-2, IL-2, limfocyty.

*Summary:* Apoptosis plays an important role in the development and functioning of the immune system. There are two pathways that lead to apoptosis: 1) positive induction by ligand (Fas-L) binding to a plasma membrane receptor (Fas) 2) negative induction by loss of a suppressor signal (loss of cytokine-dependent suppression). The bcl-2 family of protein are central components to apoptosis resulting from the absence of incoming signals generated by cytokine binding. Overexpression of some family members (e.g. bcl-2 and bcl-x<sub>L</sub>) suppresses apoptosis when cytokines are withdrawn. Overexpression of others (e.g. bax and bad) override the incoming signals from the cytokine-receptor and induce apoptosis. This article describe how both death pathways interact in activated immune cells.

*Key word:* apoptosis, Fas, Fas-L, bcl-2, IL-2, lymphocytes.

## WPROWADZENIE

Przeżycie organizmu zależy nie tylko od namnażania się i różnicowania odpowiedniej liczby komórek, ale także od ich obumierania. W rozwoju organizmu umieranie komórek jest równie ważne, jak ich namnażanie. Liczba komórek w różnych narządach (wielkość narządów) zależy od równowagi pomiędzy proliferacją komórek a ich śmiercią [3]. Nadmierna proliferacja, jak i również zaburzenia umierania komórek mogą być przyczyną wielu chorób. Zmniejszone umieranie komórek może wiązać się z patogenezą nowotworów, chorób autoimmunologicznych czy infekcji wirusowych. Z drugiej strony ich nadmierne umieranie może leżeć u podłoża schorzeń neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, Parkinsona), AIDS, osteoporozy czy zespołów mielodysplastycznych oraz niedokrwistości aplastycznej [13].

Rozróżnia się obecnie dwa rodzaje śmierci komórki [35,38]:

– śmierć patologiczna znana jako martwica (nekroza), zwana także przypadkową śmiercią komórki (ang. *accidental cell death*) lub morderstwem komórki – spowodowana nieodwracalnym jej uszkodzeniem,

– śmierć fizjologiczna, programowana (ang. *programmed cell death*), określana również jako apoptoza [19], śmierć samobójcza lub altruistyczna – jest to taki rodzaj śmierci, którą komórka planuje i odpowiednio się do niej przygotowuje.

Nadmierna aktywacja układu odpornościowego może sama prowadzić do większych patologicznych zniszczeń niż inwazja antygeny/patogenu. Muszą więc istnieć skuteczne mechanizmy kontrolujące odpowiedź immunologiczną. Wydaje się, że usunięcie aktywowanych limfocytów T drogą apoptozy w procesie określanym jako śmierć komórek indukowana aktywacją (ang. AICD – *activation-induced-cell death*) po wykonaniu przez nie swojego zadania leży u podstaw homeostazy układu odpornościowego [4].

O uruchomieniu programu śmierci (apoptozy) decyduje bardzo wiele różnych czynników zarówno endo-, jak i egzogennych [18]. Do czynników endogennych mogą należeć błędy w samym DNA, do czynników egzogennych hormony i czynniki wzrostowe obecne w płynach ustrojowych [41]. Sygnały uruchamiające program śmierci pochodzą najczęściej z zewnątrz i docierają do komórki przez odpowiednie receptory. W przypadku limfocytów sygnałem uruchamiającym program śmierci mogą być:

- przeciwciała przeciwko:
  - kompleksowi TCR/CD3 (receptor limfocytów T (ang. TCR – *T cell receptor*) /antygen CD3) [4],
  - CD95 (Fas/APO1) [42,30],
- receptor TNF (receptor czynnika martwicy nowotworów (ang. TNF – *tumor necrosis factor*)) [5],
- swoiste antygeny czy też różnego rodzaju migoteny (np. LPS, PHA).

Szczególnie silnym induktorem apoptozy w układzie odpornościowym są autoantygeny.

Apoptoza w przeciwieństwie do nekrozy jest genetycznie kontrolowanym procesem samounicestwienia się niepotrzebnych organizmowi komórek. Proces ten odgrywa też kluczową rolę w rozwoju i funkcjonowaniu układu odpornościowego.

Apoptozę w układzie immunologicznym obserwujemy:

- 1) *w czasie rozwoju układu odpornościowego*, kiedy ponad 95% młodych limfocytów T w grasicy i ok. 75% prekursorów limfocytów B w szpiku ginie w procesie śmierci samobójczej [23]. W grasicy brak sygnału przez TCR wywołuje zawsze apoptozę tymocytów, podczas gdy stymulacja przez TCR może prowadzić albo do przeżycia i różnicowania się w dojrzałe limfocyty (pozytywna selekcja) bądź do apoptozy (negatywna selekcja) [1].
- 2) *w czasie aktywacji układu odpornościowego*, kiedy niszczenie komórek zakaźnych wirusem lub komórek nowotworowych przez limfocyty cytotoksyczne odbywa się w drodze apoptozy. Limfocyty CD 8+ mogą indukować apoptozę zarówno przez aktywację receptora Fas na powierzchni niszczonej komórki, jak i przez wprowadzenie do jej wnętrza proteaz serynowych, takich jak granzymy A i B, co również daje początek programowi śmierci [11,5]. Granzymy były wcześniej nazywane fragmentynami, co wynikało z ich zdolności do indukowania fragmentacji DNA komórki docelowej. Morfologiczny obraz fragmentacji DNA jest typowy dla apoptotycznej śmierci komórki.
- 3) *poprzez apoptozę dochodzi do wyciszenia procesów odpornościowych*. Aktywacja, a następnie proliferacja limfocytów w odpowiedzi na antygen prowadząca do zwiększenia ich liczby musi podlegać sprawnej kontroli. Po zakończeniu odpowiedzi immunologicznej zwiększona masa aktywowanych komórek powinna powrócić do stanu wyjściowego z zachowaniem niezbędnej ilości długo żyjących komórek pamięci CD45RA-/CD45RO+ [40,26]. Są one konieczne do szybkiej odpowiedzi przy ponownym kontakcie z tym samym antygenem. Po wykonaniu swojego zadania większość aktywowanych limfocytów T i B wybiera drogę samounicestwienia, a ilość komórek i wielkość zmienionych zapalnie obwodowych narządów limfatycznych wraca do normy.

Przykładem może być końcowa faza zakażenia wirusem Epstein-Barr (EBV) u chorych na mononukleozę zakaźną. Eliminacja nadmiernej ilości (już niepotrzebnych) aktywowanych (HLADR+) limfocytów T powstałych na skutek odpowiedzi przeciw zakażonym EBV komórkom B odbywa się w drodze apoptozy [48]. U chorych tych zarówno limfocyty CD4+/45RO+, jak i CD8+/CD45RO+ ulegają spontanicznej apoptozie, a tylko niewielka ich część przetrwa jako długo żyjące limfocyty T pamięci. Może wskazywać to na fizjologiczny sposób pozbywania się limfocytów T aktywowanych infekcją wirusową. W „umierających” limfocytach obserwuje się spadek ekspresji genu bcl-2, a więc czynnika blokującego program śmierci komórki, co umożliwia spontaniczną apoptozę. W przeciwieństwie do ob-

serwowanych w mononukleozie zmian, u osób zdrowych nieaktywowane limfocyty T CD45 RO+ (komórki pamięci) cechuje silna ekspresja bcl-2 i słaba tendencja do spontanicznej apoptozy w ocenie *in vitro* [48].

## ROLA FAS I FAS-L W UKŁADZIE ODPORNOŚCIOWYM

Wiele danych wskazuje, że apoptoza aktywowanych limfocytów T może odbywać się za pośrednictwem antygeny CD95 (Fas/APO-1). Fas (CD95) nazywany również „czynnikiem śmierci” (*the Fas death factor*) został po raz pierwszy wyizolowany w 1989 r. przez dwie niezależne grupy [30]. Powierzchniowy antygen rozpoznawany przez przeciwciała klasy IgM został nazwany Fas, natomiast ten sam antygen wykryty przez drugą grupę badaczy wiążący przeciwciała klasy IgG3 określony został jako APO-1 [30]. U ludzi pojedynczy gen kodujący antygen CD95 leży w chromosomie 10 [18]. Antygen CD95 jest glikoproteiną błony komórkowej o masie cząsteczkowej 40–50 kD. CD 95 należy do nadrodziny receptorów, takich jak: TNF-R (receptor czynnika martwicy nowotworów), NGF-R (receptor czynnika wzrostu neuronów), antygen OX, glikoproteiny CD27, CD30, CD40 [1]. Jeśli idzie o rolę antygeny CD95, to wykazano że stransformowane mysie linie komórkowe ze stałą ekspresją CD95, stymulowane przeciwciałem anti-Fas, umierają w drodze apoptozy w ciągu około 5 godzin [30]. Świadczy to o możliwości przewodzenia sygnału indukującego apoptozę przez antygen CD95.

CD 95 występuje na niewielkim odsetku spoczynkowych (ang. *resting*) komórek T i B krwi obwodowej i ok. 5% spoczynkowych komórek NK oraz subpopulacji monocytów [31]. Ekspresja CD95 charakteryzuje także subpopulacje limfocytów T (TCR  $\alpha/\beta$ +) pamięci immunologicznej CD45RO zarówno CD4, jak i CD8 oraz limfocytów T CD45RO (TCR $\gamma/\delta$ +) [26]. Natomiast limfocyty dziewicze (ang. *naive*) CD45RA+ nie wykazują ekspresji CD95. Wśród limfocytów B, jedynie komórki bez powierzchniowej IgD (sIgD-) cechuje ekspresja CD95, limfocyty IgD+ nie wykazują ekspresji CD95 [26]. Wydaje się więc, że ekspresja antygeny CD95 na limfocytach T i B krwi obwodowej może odzwierciedlać ich stan aktywacji antygenowej. Przeciwciała monoklonalne anti-APO-1 sprzężone z fikoerytryną reaguje z większością tymocytów, chociaż zagęszczenie antygeny CD95 na powierzchni tych komórek jest znacznie mniejsze niż na spoczynkowych limfocytach T i monocytach [31]. Ekspresja CD95 na aktywowanych komórkach T, B i NK oraz na limfocytach stransformowanych wirusami HTLV-1, HIV i EBV istotnie wzrasta [30]. Występowanie CD95 charakteryzuje również limfocyty białaczki T komórkowej, chłoniaka B-komórkowego śródpiersia i choroby Hodgkina [36]. Wstępnie wykazaliśmy (Roliński i wsp. praca zgłoszona do druku) znaczną ekspresję Fas na białaczkowych limfocytach B krwi obwodowej od chorych na przewlekłą białaczkę

limfaticzną. Ekspresja antygenu CD95 na spoczynkowych limfocytach i monocytach nie upośledza żywotności komórek. Natomiast inkubacja aktywnych komórek B, T i NK z przeciwciałem anti-CD95 indukuje apoptozę. Szczególny region złożony z 68 aminokwasów w domenie cytoplazmatycznej CD95 przypuszczalnie odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu apoptotycznego sygnału. Przeciwnie natomiast, koniec-C białka CD95 złożony z 15 aminokwasów negatywnie reguluje przewodzenie tego sygnału [36].

Przez dłuższy czas trwały poszukiwania liganda dla receptora Fas. W 1994 roku wyizolowano i oczyszczono ligand (Fas-L) dla antygenu Fas [42,43]. Oczyszczony Fas-L jest białkiem o masie cząsteczkowej około 40 000 kD, wykazującym silną cytotoksyczność przeciwko Fas+ komórkom. Mysi i ludzki Fas-L (Fas-ligand) są w 76,9% identyczne w sekwencji aminokwasów i cechują się zmiennym działaniem [30]. Fas-L jest powierzchniową molekułą należącą do rodziny czynnika martwicy nowotworów- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  – *tumor necrosis factor- $\alpha$* ). Do rodziny tej należą również: limfotoksyna nazywana inaczej czynnikiem martwicy nowotworów- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), CD40 ligand (gp39), CD27 ligand, CD30 ligand [1,43]. Połączenie Fas-Fas-L indukuje apoptozę w komórkach z ekspresją Fas. Fas-L jest obecny prawie wyłącznie na aktywowanych limfocytach T, na tych samych komórkach stwierdza się również ekspresję receptora Fas [30]. Ekspresja Fas i Fas-L na dziewiczych nieaktywowanych limfocytach T jest niska. Aktywowane limfocyty T wykazujące ekspresję zarówno receptora Fas, jak i jego liganda, stają się „podatne na śmierć” przez mechanizm Fas-Fas-L. Interakcja dwóch aktywowanych limfocytów T może prowadzić do przekazania sygnału śmierci przez jedną komórkę drugiej [50]. Proces ten często określa się mianem śmierci bratobójczej, w przeciwieństwie do śmierci samobójczej, kiedy Fas i Fas-L znajdują się na jednej komórce i na zasadzie autokrynej mogą indukować swoją zagładę [7,39]. Pojedynczy gen dla Fas-L jest zlokalizowany na chromosomie 1 u ludzi i myszy [45,43]. Jak już wcześniej wspomniano, w układzie odpornościowym Fas i Fas-L są odpowiedzialne za wyhamowanie odpowiedzi immunologicznej oraz pośredniczą w cytotoksyczności indukowanej przez limfocyty T. Osłabienie funkcji układu Fas - Fas-L może być przyczyną limfoproliferacji, czy zaostrzenia chorób auto-immunologicznych, natomiast nasilenie jego aktywności prowadzi do uszkodzenia tkanek [28,10,27].

Badania prowadzone na myszach Lpr (od *lymphoproliferation*) noszących na chromosomie 19 zmutowany gen, który koduje produkt homologiczny do antygenu CD95 i myszach gld (od *generalized lymphoproliferative disease*) mających zmutowany gen na chromosomie 1 potwierdziły rolę układu Fas-Fas-L w chorobach limfoproliferacyjnych i autoimmunologicznych [44,37,12]. Choroby te charakteryzuje akumulacja nieprawidłowych komórek T i wytwarzanie autoprzeciwciał klasy IgG i IgM anty-DNA i czynnika reumatoidalnego. U myszy lpr i gld dochodzi do powiększenia węzłów chłonnych i śledziony, rozwija się kłębkowe zapalenie nerek lub reumatoidalne zapalenie stawów. Zwierzęta te giną ok. 5 miesiąca życia.

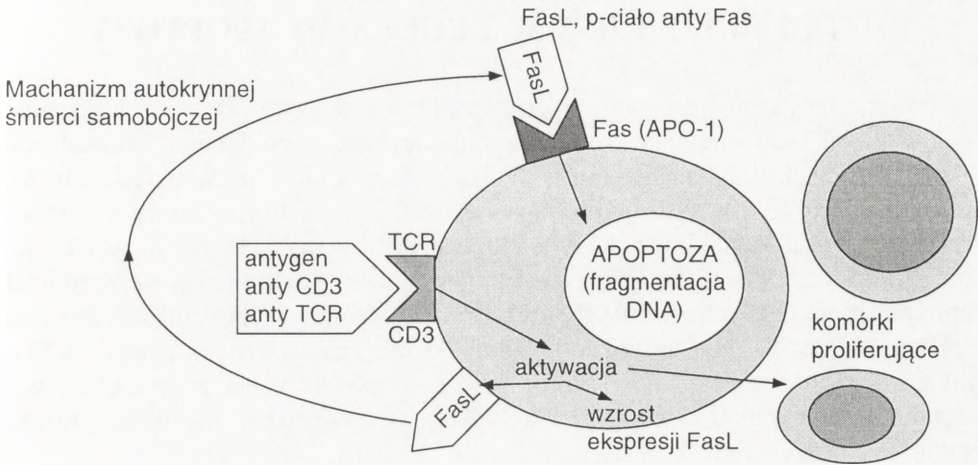
Wydaje się że nieprawidłowa ekspresja genów kodujących Fas i Fas-L zmniejsza apoptozę autoreaktywnych limfocytów. A zatem Fas odgrywa rolę zarówno w eliminacji klonów autoreaktywnych komórek T, jak i aktywnych limfocytów T, po zakończeniu ich odpowiedzi na obce antygeny [44,39].

Inkubacja limfocytów T z przeciwciałami anti-TCR lub anti-CD3 w początkowym okresie prowadzi do aktywacji limfocytów, a później prowadzi do fragmentacji DNA i śmierci komórki [7]. Ciekawe jest, że sygnały prowadzące do aktywacji i proliferacji przez kompleks TCR/CD3 są często takie same jak sygnały prowadzące do śmierci komórki. Wiadomo jest, że zarówno dojrzałe limfocyty T, jak i niedojrzałe komórki T (tymocyty) stymulowane przez TCR/CD3 ulegają apoptozie. Jednak zjawiska te przebiegają inaczej w dojrzałych limfocytach T i tymocytach. Jest to prawdopodobnie związane z rolą drugiego sygnału niezbędnego do aktywacji limfocytów. W wyniku kontaktu antygeny z kompleksem TCR/CD3, limfocyty, otrzymują tzw. pierwszy sygnał, który prowadzi do aktywacji lub śmierci komórki. Droga, którą wybierze komórka: aktywacja (prolifерacja) czy śmierć, zależy przypuszczalnie od drugiego kostymulacyjnego sygnału. W przypadku dojrzałych komórek, drugim sygnałem jest połączenie się CD28 na limfocytach T ze strukturą B7(CD80) na komórkach prezentujących antygen, czy też kontakt pomiędzy CD40 na limfocytach B ze swoim ligandem L-CD40 na limfocytach T [34,47]. Drugi sygnał w przypadku dojrzałych limfocytów może prowadzić do zwiększenia poziomu  $bcl-x_L$ , homologu  $bcl-2$ , który również hamuje śmierć komórek [6,47]. Natomiast w tymocytach drugi sygnał może być sygnałem śmierci prowadzącym do klonalnej delecji [34]. W przypadku tymocytów CD30 może być cząsteczką przewodzącą drugi sygnał [26]. Tymocyty myszy z uszkodzonym genem dla CD30 nie przechodzą negatywnej selekcji w grasicy. W chwili obecnej niewiadomo dlaczego sygnał kostymulujący w jednych komórkach prowadzi do aktywacji, a w innych do śmierci. Być może tymocyty są bardziej podatne na śmierć po otrzymaniu drugiego sygnału niż dojrzałe limfocyty T [14]. W kompleksie CD3 składającym się z pięciu łańcuchów, łańcuch  $\eta$  jest szczególnie istotny w przekazywaniu sygnałów prowadzących do śmierci.

Dheim i wsp. [16] udowodnili, że indukcja apoptozy w limfocytach T przez kompleks TCR/CD3 odbywa się przy udziale APO-1. Przeciwciała anti-CD3 nasilały ekspresję Fas-L i prowadziły do apoptozy aktywowanych przez przeciwciała anti-CD3 komórek (rys. 1). Proces ten był hamowany przez zablokowanie receptora Fas przez przeciwciała anti-Fas. Autorzy sugerują że apoptoza indukowana przez TCR w aktywowanych komórkach T może odbywać się w drodze „autokrynej śmierci samobójczej” wyzwalanej przez Fas-Fas-L (rys. 1). Apoptoza indukowana przez Fas różni się od indukowanej przez przeciwciała anti-CD3 szybszym przebiegiem [16]. Różnicę w czasie przebiegu apoptozy można tłumaczyć bezpośrednim (Fas) i pośrednim (anti-CD3) wpływem tych czynników na proces programowanej śmierci komórki. Pośrednia indukcja przez CD3 wymaga zaangażowania większej



## Czynnik śmierci Fas



Rys. 1. Schemat „autokrynej śmierci samobójczej” wywołanej przez Fas-L. Stymulacja limfocytów przez kompleks TCR/CD3 prowadzi do aktywacji i namnażania się komórek, indukując jednocześnie apoptozę. Antygen lub przeciwciała anti-CD3 wywołują ekspresję Fas-L na limfocytach, co jest sygnałem do fragmentacji DNA

ilości wewnątrzkomórkowych czynników i zdarzeń prowadzących do ekspresji Fas mRNA i Fas-L.

W regulacji procesu apoptozy przez system Fas-Fas-L bierze również udział rozpuszczalna forma antygeny Fas (sFas) trudno wykrywalna w surowicy krwi u ludzi zdrowych, natomiast obecna w wysokim stężeniu u pacjentów z toczeniem rumieniowatym trzewnym (SLE), ponad 60% chorych. Cheng i wsp. [10] stwierdzili, że podwyższony poziom sFas u chorych z SLE hamuje apoptozę limfocytów indukowanych przez antygen Fas *in vitro*, a także wykazali istotny wpływ rozpuszczalnej formy sFas na różnicowanie i proliferację limfocytów w odpowiedzi na własne antygeny. Sugeruje to rolę sFas w chorobach z autoagresji.

W ustroju człowieka są miejsca (przednia komora oka, mózg, jądra) o obniżonej reaktywności na przeszczepy allograficzne. Początkowo sądzono, że brak odrzucania przeszczepu wiąże się z istnieniem bariery krwi-tkanki blokującej dostęp alloreaktywnych limfocytów do przeszczepionych komórek. Obecnie wiadomo, że ekspresja Fas-L w tych tkankach (np. na komórkach parenchymalnych w przedniej komorze oka czy komórkach Sertoliego w jądrach) indukuje apoptozę alloreaktyw-

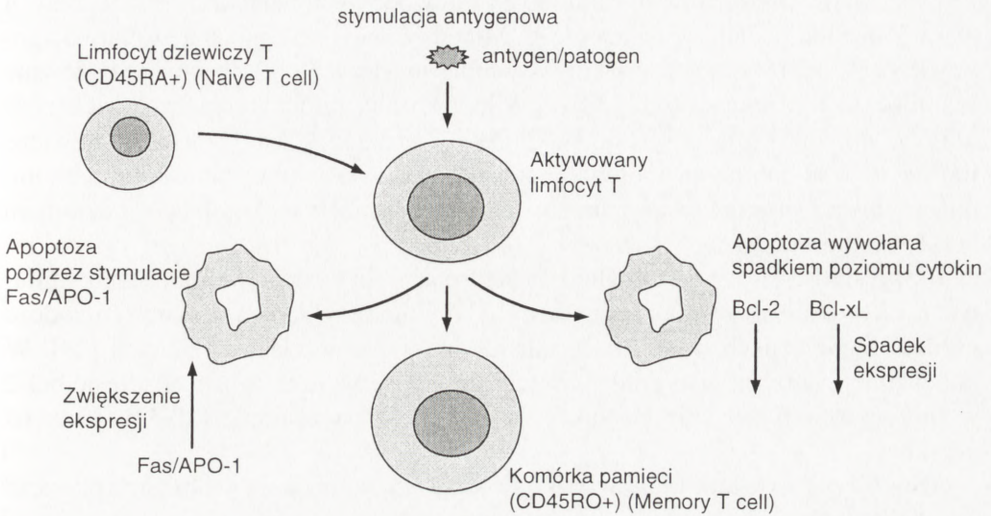
nych limfocytów przez receptor Fas, eliminując w ten sposób komórki zdolne do odrzucenia przeszczepu [17].

## UDZIAŁ BCL-2 I IL-2 W REGULACJI APOPTOZY

Inwazja antygeny (patogenu) w organizmie prowadzi do aktywacji i ekspansji pobudzonych limfocytów, makrofagów, granulocytów, „nadmiernego” gromadzenia się ich w narządach i tkankach objętych procesem chorobowym. W okresie zdrowia pula limfocytów T w organizmie pozostaje stała, a ich liczba zależy wyłącznie od „pojemności” tkanki limfoidalnej niezbędnej do utrzymania homeostazy. Choć ilość limfocytów T wydaje się być względnie niezmienna, proporcje poszczególnych komórek specyficznych (swoistych) dla różnych antygenów mogą wahać się znacznie zależnie od czasu, jaki upłynął od ostatniego wtargnięcia danego patogenu. Wynikiem tego jest większa ilość limfocytów T swoistych wobec powszechnie występujących antygenów, z którymi kontaktuje się organizm, niż wobec rzadko spotkanych antygenów.

Wydaje się, że apoptoza komórek aktywowanych w drodze AICD i układ Fas i Fas-L są niewystarczające do wyhamowania odpowiedzi immunologicznej. Drugim istotnym mechanizmem, którego znaczenie podkreśla się ostatnio, może być niedobór cytokin i rola mikrośrodowiska komórkowego jako źródła tych czynników [3]. Cytokiny i mikrośrodowisko komórkowe obok AICD stanowią ważny mechanizm regulujący odpowiednie proporcje pomiędzy aktywowanymi limfocytami a komórkami pamięci (CD45RO+). Wydaje się, że ratowanie aktywowanych limfocytów T od śmierci samobójczej przez stymulujące działanie cytokin jest istotnym czynnikiem utrzymującym pokaźną pulę komórek CD45RO+. Pod koniec odpowiedzi immunologicznej, kiedy stężenie antygeny jest niskie, aktywowane limfocyty T uruchamiają program śmierci, który wyzwalany jest obniżeniem poziomu cytokin (rys. 2). Indukcja apoptozy przez Fas na tym etapie nie ma większego znaczenia [3]. Natomiast w okresie dużego stężenia antygeny sygnały wysyłane przez receptory cytokinowe nie są w stanie zapobiec śmierci indukowanej przez Fas. Może stanowić to system obronny przed nadmierną stymulacją układu odpornościowego [3]. Aktywowane limfocyty T wymagają stałej obecności interleukiny 2 w celu podtrzymania klonalnej ekspansji i przeciwdziałania apoptozie. IL-2 blokuje samobójczą śmierć aktywowanych limfocytów T przez zwiększenie ekspresji białek hamujących apoptozę, takich jak produkt genu *bcl-2* [3]. Usunięcie IL-2 ze środowiska aktywowanych limfocytów T *in vitro* zmniejsza ekspresję *bcl-2* i indukuje apoptozę. Linie komórkowe limfocytów T CD45RO+ zależne od IL-2 cechuje wysoka ekspresja *bcl-2* w obecności IL-2 w hodowli *in vitro*. Usunięcie IL-2 z pożywki prowadzi do gwałtownego spadku ekspresji *bcl-2* i apoptozy hodowanych komórek. Doświad-

## Dwa mechanizmy indukcji apoptozy w aktywowanych limfocytach T



Rys. 2. Rola IL-2 i innych cytokin w regulacji procesów umierania komórek. Aktywacja limfocytów prowadzi do apoptozy przez układ Fas-Fas-L. Obniżenie stężenia IL-2 wywołuje również apoptozę związaną ze spadkiem ekspresji bcl-2

czenia te potwierdzają istotną rolę IL-2 w regulacji ekspresji bcl-2 w aktywowanych mysich liniach T komórkowych.

Krążące limfocyty T od chorych z infekcją wirusową cechuje niski poziom bcl-2. Komórki te w hodowli *in vitro* ulegają gwałtownej apoptozie, dopóki do pożywki nie doda się IL-2. Co więcej, dodanie IL-2 do hodowli aktywowanych limfocytów T CD45RO+ otrzymanych od pacjentów z ostrą infekcją wirusową prowadzi do zwiększenia ekspresji bcl-2 i ratuje te komórki przed apoptozą [3].

Białka regulujące apoptozę mogą ułatwiać lub hamować programowaną śmierć komórki. W przeciwieństwie do układu Fas-Fas-L kierującego komórki w stronę śmierci, inne białko bcl-2 (od *B-cell leukemia/lymphoma*) hamuje ten proces. Gen bcl-2 został odkryty i sklonowany przez Tsujimoto i Croce w 1984 r., zlokalizowano go w długich ramionach chromosomu 18 (18q21.3) [46]. Produkt genu bcl-2 białko p26 jest integralnym białkiem błony mitochondrialnej i błony jądrowej oraz błon retikulum endoplazmatycznego. Bcl-2 jest głównym czynnikiem wydłużającym życie spoczynkowych limfocytów T i B przez hamowanie apoptozy [21]. U myszy z wyłączonym genem bcl-2 spoczynkowe limfocyty T są bardziej podatne na apoptozę niż bcl-2+ spoczynkowe komórki T. Takiej różnicy nie stwierdza się w przypadku

aktywowanych limfocytów T. Limfocyty B bcl-2- (ujemne) cechuje krótszy czas życia [15].

Ekspresja czynników regulujących proces śmierci zmienia się w czasie rozwoju i różnicowania limfocytów w centralnych i obwodowych narządach limfatycznych warunkując ich podatność na apoptozę. Młode tymocyty ulegają bardzo łatwo apoptozie (95% tych komórek umiera w obrębie grasicy). Bcl-2 obecny jest głównie w limfocytach rdzenia grasicy [22,49]. Młode korowe tymocyty, których większość umiera, nie wykazują ekspresji bcl-2 [49]. Z drugiej strony dojrzałe dziewicze limfocyty T są odporne na apoptozę, a po aktywacji ponownie stają się komórkami podatnymi na programowaną śmierć komórki. Zmiany te korelują z poziomem bcl-2 w komórce [49].

Ekspresja bcl-2 jest szczególnie zaznaczona w obwodowych narządach limfatycznych, w których zachodzi apoptoza [25]. Takim przykładem są centra rozrodcze grudek limfatycznych występujące między innymi w węzłach chłonnych [24]. W pobudzonej przez antygen grudce limfatycznej obserwuje się różną ekspresję bcl-2 w limfocytach B zależnie od strefy, w której się on znajduje [20,32], i tak na przykład:

- Długo żyjące krążące limfocyty B IgM+IgD+ znajdujące się w obszarze płaszczka (*follicular mantle*) cechuje wysoka ekspresja bcl-2.
- Proliferujące centroblasty z obszaru ciemnego (*dark zone*) wykazują brak lub bardzo słabą ekspresję bcl-2.
- W centrocytach z jasnego obszaru (*light zone*), których większość ginie w drodze apoptozy, również nie stwierdza się ekspresji bcl-2.
- Plazmoblasty i komórki pamięci obecne w grudkach limfatycznych cechuje obecność bcl-2 proteiny.

Omawiając rolę bcl-2 należy również wspomnieć o innych członkach rodziny bcl-2 [33,54]. Rodzinę genów bcl-2 przedstawiono w tabeli 1 [8,9,53]. Bcl-x<sub>L</sub> (*large*) i bcl-x<sub>S</sub> (*small*) są produktami genu bcl-x. Podczas gdy bcl-x<sub>L</sub> hamuje śmierć komórki, bcl-x<sub>S</sub> wywiera przeciwstawne działanie. Obecność bcl-x<sub>L</sub> stwierdzono głównie w grasicy, gdzie jest on istotnym czynnikiem hamującym apoptozę niedojrzałych tymocytów. Członkowie rodziny bcl-2 tworzą zwykle homo- lub heterodimery. Uważa się, że homodimery bax/bax są bezpośrednimi induktorami śmierci [1,51]. Bcl-2 i bcl-x<sub>L</sub> reagując z bax mogą blokować tworzenie się homodimerów bax/bax hamując w ten sposób apoptozę. Z drugiej strony, bad i bak reagując z bcl-2 i bcl-x<sub>L</sub> mogą ułatwiać apoptozę przez wypieranie tych dwóch protein z połączenia z bax. Tak więc hamowanie lub ułatwianie apoptozy przez rodzinę bcl-2 zależy od interakcji i proporcji pomiędzy poszczególnymi członkami tej rodziny.

Wydaje się, że lokalne stężenie w tkankach IL-2 i innych cytokin może odgrywać istotną rolę w regulacji procesów umierania komórek *in vivo*. Spadek lokalnego stężenia IL-2 w tkankach, gdzie patogen został zniszczony, prowadzić będzie do obniżenia ekspresji bcl-2 w limfocytach T, predysponując limfocyty bcl-2 -(ujemne)

TABELA 1. Rodzina genów bcl-2

Geny hamujące apoptozę	Geny ułatwiające apoptozę
bcl-2	bax
bcl-x <sub>L</sub> ( <i>large</i> )	bcl-x <sub>S</sub> ( <i>small</i> )
E1B 19kD (białko adenowirusa)	bak
ced-9 (gen nicienia <i>Caenorhabditis elegans</i> )	bad
ced ( ang. <i>cell death-geny śmierci</i> )	

do apoptozy (rys. 2). Lokalne obniżenie poziomu IL-2, umożliwia więc usunięcie aktywowanych limfocytów T z „gojących się” tkanek, wygaśnięcie odpowiedzi immunologicznej i powrót okolicznych węzłów chłonnych do normalnej wielkości [2]. Przedstawiona wcześniej rola drugiego sygnału w regulacji apoptozy wydaje się potwierdzać znaczenie IL-2 w tym procesie. Kostymulacja przez antygen CD28 może obniżać apoptozę aktywowanych limfocytów T [6,14,29]. Niewiadomo, czy wiąże się to ze wzrostem ekspresji bcl-2. Z drugiej strony sygnał kostymulujący prowadzi do zwiększenia stabilności mRNA dla IL-2, co w konsekwencji nasila syntezę i sekrecję IL-2. Tak więc hamowanie apoptozy przez CD28 wiąże się raczej z pośrednim efektem wywieranym przez IL-2, prowadzącym do zwiększenia ekspresji bcl-2 niż z bezpośrednim wpływem stymulacji CD28 [6,29].

W ciągu ostatnich lat wiedza na temat apoptozy ogromnie się poszerzyła. Cytokiny jako czynniki regulujące namnażanie się i różnicowanie komórek poznane zostały dość dobrze. Ostatnie badania potwierdzają ich znaczenie jako czynników przeżycia komórek. Obecność cytokin jest niezbędna do przeżycia aktywowanych limfocytów. Limfocyty, które przegrywają w konkurencji z innymi o dostęp do cytokin, giną. Niektóre z cytokin, takie jak TNF i być może Fas-L, mogą same indukować proces śmierci komórki. Wydaje się, że najbliższe lata wyjaśnią, czy są jeszcze inne cytokiny mogące aktywować program śmierci limfocytów i udzielią odpowiedzi na wiele innych pytań związanych z umieraniem komórek.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABASTADO JP. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol.* 1996; **147**: 443–456.
- [2] AKBAR AN, BORTHWICK NJ, WICKREMASINGHE RG, PANAYOITIDIS P, PILLING D, BOFILL M, KRAJEWSKI S, REED JC, SALMON M. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-x<sub>L</sub>) but not pro-apoptotic (bax, bcl-x<sub>S</sub>) gene expression. *Eur J Immunol.* 1996; **26**:294–299.
- [3] AKBAR A, SALMON M Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death. *Immunol Today* 1997, **18**: 72–76.

- [4] ALDERSON MR, TOUGH TW, DAVIS SMITH T, BRADY S, FALK B, SCHOOLEY KA, GOODWIN RG, SMITH CA, RAMSDALL F, LYNCH DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; **181**: 71–77.
- [5] BERKE G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995; **81**: 9–12.
- [6] BOISE LH, MINN AJ, NOEL PJ, JUNE CH, ACCAVITTI MA, LINDSTEN T, THOMPSON CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; **3**: 87–98.
- [7] BRUNNER T, MOGIL RJ, LAFACE D, YOO NJ, MAHBOUBI FE, ECHEVERRI F, MARTIN SJ, FORCE WR, LYNCH DH, WARE CF, GREEN DR. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995; **373**: 441–444.
- [8] CHAO DT, LINETTE GP, BOISE LH, WHITE LS, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 1995; **182**: 821–828.
- [9] CHEN G, BRANTON PE, YANG E, KORSMEYER SJ, SHORE GC. Adenovirus E1B 19-kDa death suppressor protein interacts with Bax but not with Bad. *J Biol Chem* 1996; **271**: 24221–24225.
- [10] CHENG J, ZHOU T, LIU C, SHAPIRO JP, BRAUER MJ, KIEFER MC, BARR PJ, MOUNTZ JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; **263**: 1759–1762.
- [11] CHIU VK, WALSH CM, LIU CC, REED JC, CLARK WR. Bcl-2 blocks degranulation but not fas-based cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995; **154**: 2023–2032.
- [12] COHEN PLEISENBERG RA. The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane [published erratum appears in *Immunol Today* 1993 Feb; 14(2): 97]. *Immunol Today* 1992; **13**: 427–428.
- [13] CRAIG B THOMPSON: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; **267**: 1456–1462.
- [14] CRISPE IN. Kingdom of the worm-cell death in the immune system. *The Immunologist* 1995; **3**: 179–181.
- [15] DENG GPODACK ER. Suppression of apoptosis in a cytotoxic T-cell line by interleukin 2-mediated gene transcription and deregulated expression of the protooncogene *bcl-2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2189–2193.
- [16] DHEIN J, WALCZAK H, BAUMLER C, DEBATIN KM, KRAMMER PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995; **373**: 438–441.
- [17] GRIFFITH TS, BRUNNER T, FLETCHER SM, GREEN DR, FERGUSON TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995; **270**: 1189–1192.
- [18] HALE AJ, SMITH CA, SUTHERLAND LC, STONEMAN VE, LONGTHORNE VL, CULHANE AC, WILLIAMS GT. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; **236**: 1–26.
- [19] KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; **26**: 239–257.
- [20] KORSMEYER SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 1992; **13**: 285–288.
- [21] KORSMEYER SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992; **80**: 879–886.
- [22] KORSMEYER SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 1992; **15**: 105–118.
- [23] LYDYARD P, GROSSI C. Development of the immune system. [w] Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. London, Mosby-Year Book Europe, 1993: 11.1–11.16.
- [24] LAGRESLE C, BELLA C, DANIEL PT, KRAMMER PH, DEFRANCE T. Regulation of germinal center B cell differentiation. Role of the human APO-1/Fas (CD95) molecule. *J Immunol* 1995; **154**: 5746–5756.

- [25] MERINO R, DING L, VEIS DJ, KORSMEYER SJ, NUNEZ G. Developmental regulation of the Bcl-2 protein and susceptibility to cell death in B lymphocytes. *EMBO J* 1994; **13**: 683–691.
- [26] MIYAWAKI T, UEHARA T, NIBUR, TSUJI T, YACHIE A, YONEHARA S, TANIGUCHI N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 1992; **149**: 3753–3758.
- [27] MOUNTZ JD, EDWARDS CK. Murine models of autoimmunity: T-cell and B-cell defects. *Curr Opin Rheumatol* 1992; **4**: 612–620.
- [28] MOUNTZ JD, WU J, CHENG J, ZHOU T. Autoimmune disease. A problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 1415–1420.
- [29] MUELLER DL, SEIFFERT S, FANG W, BEHRENS TW. Differential regulation of bcl-2 and bcl-x by CD3, CD28, and the IL-2 receptor in cloned CD4+ helper T cells. A model for the long-term survival of memory cells. *J Immunol* 1996; **156**: 1764–1771.
- [30] NAGATA S, GOLSTEIN P. The Fas death factor. *Science* 1995; **267**: 1449–1456
- [31] NISHIMURA Y, ISHII AJ, YONEHARA S. Expression and function of apoptosis antigen Fas on T lymphocytes in periphery and thymus. [w] SCHLOSSMAN SF i wsp. Leukocyte Typing V. White cell differentiation antigens. Oxford University Press 1995; 1144–1148.
- [32] NUNEZ G, HOCKENBERY D, MCDONNELL TJ, SORENSEN CM, KORSMEYER SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 1991; **353**: 71–73.
- [33] OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; **74**: 609–619.
- [34] RADVANYI LG, SHI Y, VAZIRI H, SHARMA A, DHALA R, MILLS GB, MILLER RG. CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. *J Immunol* 1996; **156**: 1788–1798.
- [35] RADZISZEWSKA E. Fizjologiczna rola apoptozy. *Post Biol Kom* 1995; **22,3**: 247–263.
- [36] ROBERTSON MJ, RITZ J. Cluster report: CD95. [w] SCHLOSSMAN SF i wsp. Leukocyte Typing V. White cell differentiation antigens. Oxford University Press 1995; 1142–1143.
- [37] ROSE LM, LATCHMAN DS, ISENBERG DA. Bcl-2 and Fas, molecules which influence apoptosis. A possible role in systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity* 1994; **17**: 271–278.
- [38] ROŻYŃKOWA D. Genetyczne regulacje apoptozy, programowanej śmierci komórki. *Post Biol Kom* 1994; **21,3**: 303–318.
- [39] RUSSELL JH, RUSH B, WEAVER C, WANG R. Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4409–4413.
- [40] SALMON M, PILLING D, BORTHWICK NJ, VINER N, JANOSSY G, BACON PA, AKBAR AN. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 892–899.
- [41] SILVA M, GRILLOT D, BENITO A, RICHARD C, NUNEZ G, FERNANDEZ LUNA JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996; **88**: 1576–1582.
- [42] SUDA T, NAGATA S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; **179**: 873–879.
- [43] SUDA T, TAKAHASHI T, GOLSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; **75**: 1169–1178.
- [44] TAKAHASHI T, TANAKA M, BRANNAN CI, JENKINS NA, COPELAND NG, SUDA T, NAGATA S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; **76**: 969–976.
- [45] TAKAHASHI T, TANAKA M, INAZAWA J, ABE J, SUDA T, NAGATA S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *International immunology* 1994; **6**: 1567–1574.
- [46] TSUJIMOTO Y, FINGER LR, YUNIS J, NOWELL PC, CROCE CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; **226**: 1097–1099.

- [47] TUSCANO JM, DRUEY KM, RIVA A, PENA J, THOMPSON CB, KEHRL JH. Bcl-x rather than Bcl-2 mediates CD40-dependent centrocyte survival in the germinal center. *Blood* 1996; **88**: 1359–1364.
- [48] UEHARA T, MIYAWAKI T, OHTA K, TAMARU Y, YOKOI T, NAKAMURA S, TANIGUCHI N. Apoptotic cell death of primed CD45RO+ T lymphocytes in Epstein-Barr Virus-induced infectious Mononucleosis. *Blood* 1992; **80**: 452–458.
- [49] VEIS DJ, SENTMAN CL, BACH EA, KORSMEYER SJ. Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 2546–2554.
- [50] VIGNAUX F, GOLSTEIN P. Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngenic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur J Immunol* 1994; **24**: 923–926.
- [51] WHITE E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes and Dev* 1996; **10**: 1–15.
- [52] WATANABE-FUKUNAGA R, BRANNAN CI, ITOH N, YONCHARA N, COPELAND S, JENKINS NG, NAGATA SJ. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; **148**: 1274–1279.
- [53] YANG E, KORSMEYER SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; **88**: 386–401.
- [54] YANG E, ZHA J, JOCKEL J, BOISE LH, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; **80**: 285–291.
- [55] ZHENG L, FISHER G, MILLER RE, PESCHON J, LYNCH DH, LEONARDO MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature*. 1995; **377**: 348–351.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 05.05. 1997 r.*

*Przyjęto: 14.07. 1997 r.*

*Adres autora: ul. Jaczewskiego 8, 20-950 Lublin*



## ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL ( $\Delta\psi$ ) WITH FLUORESCENT PROBES

### ANALIZA POTENCJAŁU BŁONOWEGO ( $\Delta\psi$ ) MITOCHONDRIÓW SONDAMI FLUORYZUJĄCYMI

Andrea COSSARIZZA, Stefano SALVIOLI, Claudio FRANCESCHI

Department of Biomedical Sciences, University of Modena School of Medicine  
Modena, Italy

## INTRODUCTION

During oxidation reactions, the mitochondrial respiratory chain produces energy which is stored in form of an electrochemical gradient consisting of a transmembrane electrical potential ( $\Delta\psi$ ), negative inside of about 180–200 mV, and a proton gradient of about 1 unit; this energy is then able to drive the synthesis of ATP to fuel the cell's energy dependent processes. To study its production and utilization several membrane permeable lipophilic cations, accumulated by living cells, organelles and liposomes exhibiting a negative interior membrane potential, have been used. Such probes include those which exhibit optical and fluorescence activity after accumulation into energized systems [*i.e.*, 3,3'-diehexiloxadecarboxyanine iodide, nonylacridine orange (NAO), safranin O, rhodamine-123 (Rh123) etc.], radiolabelled probes, (*i.e.*, [ $^3\text{H}$ ]methyltriphenyl-phosphonium, etc.) and unlabelled probes used with specific electrodes [*i.e.*, tetraphenyl-phosphonium ion (TPP $^+$ ) etc.].

However, these systems have several possible disadvantages, including the:

a) time required to achieve equilibrium distribution of a mitochondrial membrane probe;

- b) degree of passive (unspecific) binding of probes to a membrane component, such as in the case of NAO, which detects mitochondrial mass as it binds to cardiolipin [1], or Rh123, which has several energy-independent binding sites [2];
- c) toxic effects of probes on mitochondrial functional integrity;
- d) sampling procedures;
- e) interference from light scattering changes and from absorption changes of mitochondrial components;
- f) requirement of large amounts of biological materials.

TPP electrode affords an easy and precise tool to measure due to the:

- i) low interference between bound TPP<sup>+</sup> and the membrane; and
- ii) lack of responses of the electrode to species different from TPP<sup>+</sup>.

However, this method requires discrete amounts of biological samples and, in contrast to isolated mitochondria, uptake of this lipophilic cation by several intact mammalian cells is a slow process.

Recently, we have developed a new cytofluorimetric (FCM) technique by using the lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1) to detect variations in  $\Delta\psi$  at the single cell level [3]. The method has been further validated at the single mitochondrion level [4]. JC-1 is more advantageous over rhodamines and other carbocyanines, capable of entering selectively into mitochondria, since it changes reversibly its color from green to orange as membrane potentials increase (over values of about 80–100 mV). This property is due to the reversible formation of JC-1 aggregates upon membrane polarization that causes shifts in emitted light from 530 nm (*i.e.*, emission of JC-1 monomeric form) to 590 nm (*i.e.*, emission of J-aggregate) when excited at 490 nm [5,6]. Thus, the color of the dye changes reversibly from green to greenish orange as the mitochondrial membrane becomes more polarized [7]. Both colors can be detected using the filters commonly mounted in all flow cytometers, so that green emission can be analyzed in fluorescence channel 1 (FL1) and greenish orange emission in channel 2 (FL2). The main advantage of the use of JC-1 is that it can be both qualitative, considering the shift from green to orange fluorescence emission, and quantitative, considering the pure fluorescence intensity, which can be detected in both FL1 and FL2 channels.

## THE TECHNIQUE AND FLOW CYTOMETRY

Take a cell suspension, adjust it to a density of  $0.5\text{--}1 \times 10^6$  cells/mL and incubate in complete medium (RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, but many other culture media work as well) for at least 10–15 min. at room temperature in the dark with 5–10  $\mu\text{g/mL}$  JC-1. Incubation can also be done in a 37°C incubator, for

10 min. The temperature and length of incubation depend on the cell type, but the right conditions have to be found.

JC-1 has to be dissolved and stored according to the manufacturer's instruction, *i.e.* in DMSO or DMF. It is also important to vortex well during the addition of JC-1 or immediately after, as the solubility of the probe is very low in water. At the end of the incubation period cells have to be washed twice in PBS (or what you like), resuspended in a total volume of 400  $\mu$ L PBS and analyzed.

Prepare always a functional, negative control, to be sure that the probe is working well. If you treat cells with drugs able to collapse  $\Delta\Psi$ , such as the K<sup>+</sup> ionophor valinomycin (100 nM or more) or the proton translocator carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 250 nM), you should see a dramatic change of the fluorescence distribution. A typical example is shown in Figure 1. U937 human monoblastic leukemic cells were first treated with 100 nM valinomycin (10 min at 37°C) and then stained with JC-1. Note the relevant shift to the lower right part of the quadrants. It is important to remind that each cell culture can have a small amount of dead or suffering cells. You can easily recognize these cells in the right lower part of the left panel. In this case they were less than 4%.

Figure 2 represents the intracellular events that occur when you stain cells with JC-1, and when a fall in  $\Delta\Psi$  is provoked by the incubation with valinomycin.

Another good control is that of mitochondrial mass, that can be done with nonyl acridine orange (NAO), a probe capable to bind mitochondria independently of their energization state [1], whose fluorescence is detectable in FL1. Typically, cells are incubated at the concentration of 0.5–1x10<sup>6</sup> cells/mL with 10  $\mu$ M NAO for 10 min in the dark at room temperature, washed twice in cold PBS and immediately analyzed. The result you obtain gives you an idea of the mass of mitochondria present within a cell, and allows you to be sure that the changes you see with a potential-sensitive probe are not dependent upon the simple loss of organelles.

We use routinely a FACScan (Becton Dickinson, San José, USA) equipped with a single 488 nm argon laser. The filter in front of the FL1 photomultiplier (PMT) transmits at 530 nm and has a bandwidth of 30 nm, the filter used in FL2 channel transmits at 585 and has a bandwidth of 42 nm. For the analysis of cells stained with JC-1, the PMT value of the detector in FL1 is set at about 360 V, FL2 PMT at 310 V; FL1-FL2 compensation about 4.0%, FL2-FL1 compensation 12.0%. Take always a minimum of 10–15,000 cells per sample, acquired in list mode with Lysys II software, used for the analysis of the data as well. It is also possible to use a splendid software that works under Windows 3.1 or Windows 95, *i.e.* WinMDI (written by Dr. Joe Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). You can download it through the Internet site <<http://www.bio.umass.edu/mcbfacs/flowcat.html>>.

Note that the fluorescence signal of JC-1 aggregates can go in FL-3, but is quite low. Thus, it is possible to use saturating concentrations of a mAb conjugated with a bright fluorochrome that emits in the deep red (Quantum Red, PerCP, etc.) to recognize, for example, different lymphocyte subpopulations. PMT values have to be quite low either in FL2 or FL3, and, obviously, require a strong compensation until a narrow, distinct peak can be observed in FL3 (this is the mAb). Unfortunately, it is not possible to use propidium iodide for simultaneous measurements of cell viability.

Concerning instruments, the staining has been tested on several different apparatus such as an Excel, from Coulter (in Bergen, Norway), a FACSTAR and a FACSCalibur, from Becton Dickinson (in Krakow, Poland, or Modena and Venice, Italy), a Biorad Brite and a Partec (in Krakow too), and they work perfectly as well. Obviously, compensations have to be set in a different way.

## OTHER PROBES

Clearly,  $\Delta\psi$  has been previously studied by FCM techniques, mostly by evaluating the changes in fluorescence of different dyes. Researchers used first Rh123 [8,9], then other molecules such as 3,3-dihexiloxocarbocyanine iodide [DiOC<sub>6</sub>(3)] [10]. Typically, the signal coming from cells whose mitochondria had a low potential was much lower than that of control samples, and in a classical histogram depolarized populations go to the left. As after the shift to the left the peaks (*i.e.* that of controls and treated cells) are not always perfectly separate, the operator has to decide where the population of cells with depolarized mitochondria begins. These two fluorescent probes have this and other problems, and we have spent some time in analyzing them, and in understanding which is their correct use.

Rh123 binding to mitochondria is difficult to calculate when the cell presents a certain mitochondrial heterogeneity due, for example, to a high number of mature or immature organelles, as occurs in a continuously growing cell line. Moreover, it has been reported that in rat liver mitochondria different binding sites for Rh123 exist, *i.e.* sites which are freely accessible whatever the energy status of the mitochondria and sites which are hidden in the energized state and freely accessible in the deenergized form of the organelle [2]. This has been attributed to different maturative states of the organelles. Thus, in a single cell, organelles can have different Rh123 binding sites with consequent different fluorescence emissions. As a result, it is very difficult to ascertain whether or not mitochondria bind Rh123 in an energy-dependent or energy-independent manner. However, the probe is perfect when used in association with propidium iodide, as this combination allows a clear and elegant distinction between dead and living cells.

DiOC<sub>6</sub>(3) is more reliable for analysis of plasmamembrane potential rather than for studies on  $\Delta\psi$ . Indeed, the first application of this probe in FCM was for the analysis of plasmamembrane potential [11]. After this, DiOC<sub>6</sub>(3) was used in isolated mitochondria to detect  $\Delta\psi$  changes [10]. Obviously, it worked: any cationic molecule goes to negative sites, and is released when the charge changes. If that molecule is fluorescent, the signal decreases when the membrane potential of the organelle is lost. The problems start when intact cells are used. In our hands, DiOC<sub>6</sub>(3) reacted properly when U937 cells were treated with FCCP, but such behaviour was not observed in cells treated with valinomycin. Moreover, when cells were kept in the presence of plasmamembrane depolarizing agents such as ouabain or high doses of extracellular K<sup>+</sup>, a consistent decrease in DiOC<sub>6</sub>(3) fluorescence was noted, indicating a consistent sensitivity of the probe for plasmamembrane (Figures 3 and 4).

This behaviour was not totally unexpected, as it is known that this probe can bind several membranes other than mitochondria [12], as also reported in the Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (edited by the Company that produces and sells this reagent, *i.e.* Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Thus, using this probe, it is very difficult, if not impossible, to distinguish between depolarization of plasmamembrane or changes in  $\Delta\psi$  in several physiological or pathological conditions, when both events can take place.

Figure 5 shows that DiOC<sub>6</sub>(3) can go into mitochondria, but after the fall in  $\Delta\psi$  a peculiar intracellular distribution can take place. Indeed, the probe can redistribute to other membranes such as those of the endoplasmic reticulum (ER), that have a negative charge. The result is that the cell is still fluorescent, and the fluorescence signal can maintain the same intensity. Similar problems are avoided by the use of a probe like JC-1, that changes color after the de-aggregation provoked by the fall in  $\Delta\psi$ .

Surprisingly enough, DiOC<sub>6</sub>(3) has been widely used to detect  $\Delta\psi$  changes during apoptosis [13–18], and a theory has been put forward stating that loss of  $\Delta\psi$  is an early event – if not the cause – of programmed cell death [19]. The methodological analysis of the fluorescence distribution of DiOC<sub>6</sub>(3), together with several reports from our and other groups [20–27], cast some doubts on those studies which, using a PMP-sensitive probe such as DiOC<sub>6</sub>(3) for analyzing  $\Delta\psi$ , generalized that mitochondria depolarization is one of the first events occurring during apoptosis.

## SOME APPLICATIONS AND FUTURE DIRECTIONS

The technique is routinely used by us and by many groups whose members had the possibility to visit our laboratory. Clearly, all scientists who are interested

in these studies and in JC-1 technique are invited to contact us, and are very welcome. In the last years, the use of JC-1 allowed us to demonstrate:

i) that mitochondria functionality is maintained in the early hours of a classical apoptotic process, such as that occurring in dexamethasone-treated rat thymocytes [20]. This allowed us to hypothesize that cellular energy charge, as well as its ATP content, is crucial for apoptosis to occur [28];

ii) that N-acetyl-cysteine protects human cells from TNF-induced apoptosis through an action that also involves mitochondria [22];

iii) the role of mitochondria in the cytotoxic damage induced by L-histidine, whose action is enhanced by inorganic or organic hydroperoxide [29];

iv) the different composition in mitochondria mass and different sensitivity to depolarizing agents of small and large coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida* [21];

v) the toxicity at the mitochondrial level of the doses of chromium which are regularly used by most researchers in studies on NK cell functions [30];

vi) that mitochondria are a target for the protective effects of heat shock proteins after an oxidative stress [31];

vii) that mitochondrial membrane potential can be modified by the action of cytokines such as TNF- $\alpha$  [32];

viii) that mitochondrial functional alterations and a dramatic tendency to undergo apoptosis are characteristics of lymphocytes obtained from patients experiencing and acute, primary HIV syndrome [24], where a variety of immunological alterations take place [33,34];

ix) that mitochondria functionality is well preserved in healthy centenarians [35], *i.e.* individuals able to reach the extreme limit of human life with an intact immune system [36–40].

Actually, we are involved in several other studies on mitochondria physiology and function, and our future goals will be to see whether JC-1 technique could be useful in ascertaining the status of organs such as liver and kidney before their transplantation; to see cellular damages induced by a variety of drugs used in the therapy of cancer, HIV or different infection, and other diseases, and the eventual protection from those damages with antioxidants or other molecules; to further study the functionality of mitochondria during the aging process.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to all the scientists with whom we had the pleasure to collaborate in these years, and especially to Professors Edwin L. Cooper, Walter Malorni, Alberto Masini, Valentina Bobyleva, Barbara S. Polla, Christoph Richter and Umberto Muscatello, and of Drs. Daniela Monti, Miriam Capri, Daniela Barbieri, Leonarda Troiano, Franco Tropea, Sabrina Macchioni.

## MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL IN U937 cells

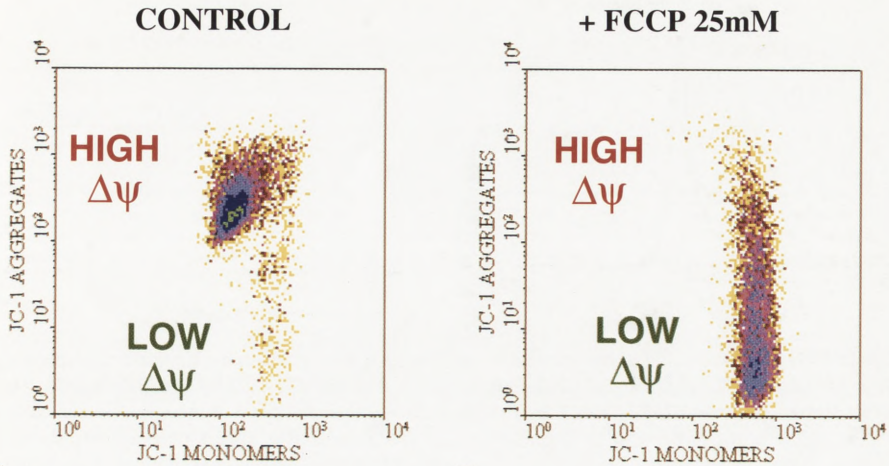


Figure 1. Effects of the incubation with the depolarizing agent valinomycin on  $\Delta\psi$ . Note the relevant shift towards the lower right part of the panel

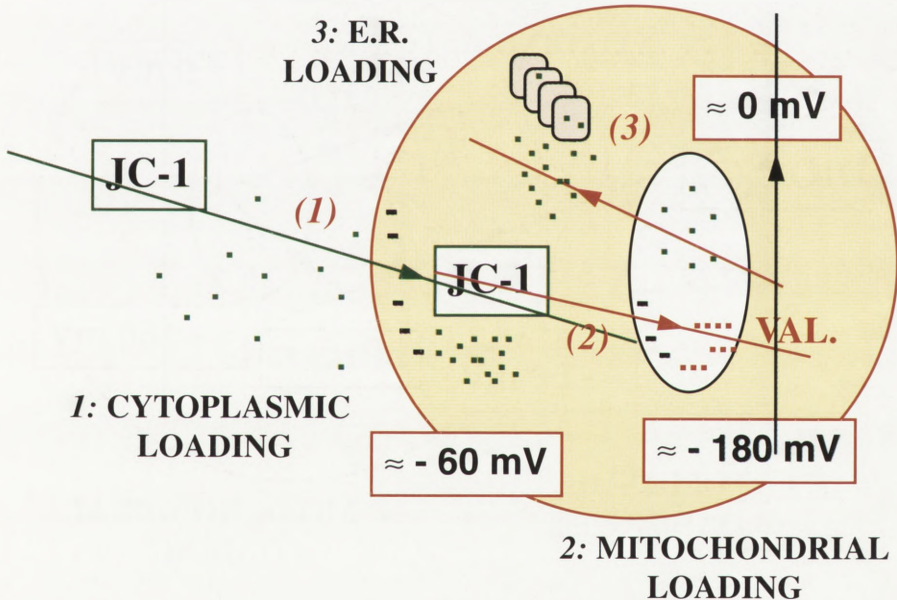


Figure 2. Intracellular distribution of JC-1 before and after the depolarization of mitochondria with valinomycin (VAL). Note that 3 events occur: 1) cytoplasmic loading, which is dependent upon plasmamembrane potential; 2) mitochondrial loading, dependent upon ; 3) endoplasmic reticulum (E.R.) loading, that theoretically can take place after the fall in  $\Delta\psi$ . In the case of JC-1, aggregates are no more present when the dye is released from mitochondria

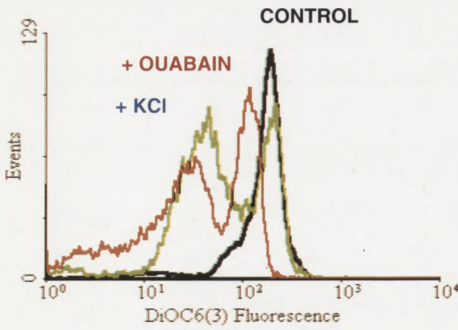


Figure 3. Effects of ouabain and of the incubation in a  $K^+$ -rich medium on the fluorescence intensity of U937 cells stained with DiOC<sub>6</sub>(3). Note the extreme sensitivity of the probe to agents that depolarize plasma membrane but do not affect

EFFECTS OF 1 $\mu$ M VALINOMYCIN IN U937 CELLS

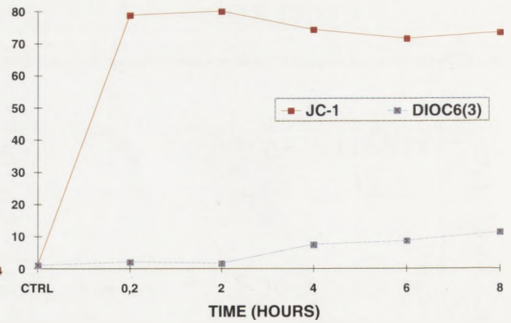


Figure 4. Comparison between the fluorescence of JC-1 and DiOC<sub>6</sub>(3) after the treatment of U937 cells with valinomycin, that collapses  $\Delta\psi$ . Note that in this case DiOC<sub>6</sub>(3) is not sensitive to the loss of mitochondrial membrane potential. In ordinate: % of cells whose fluorescence indicates the depolarization of mitochondria

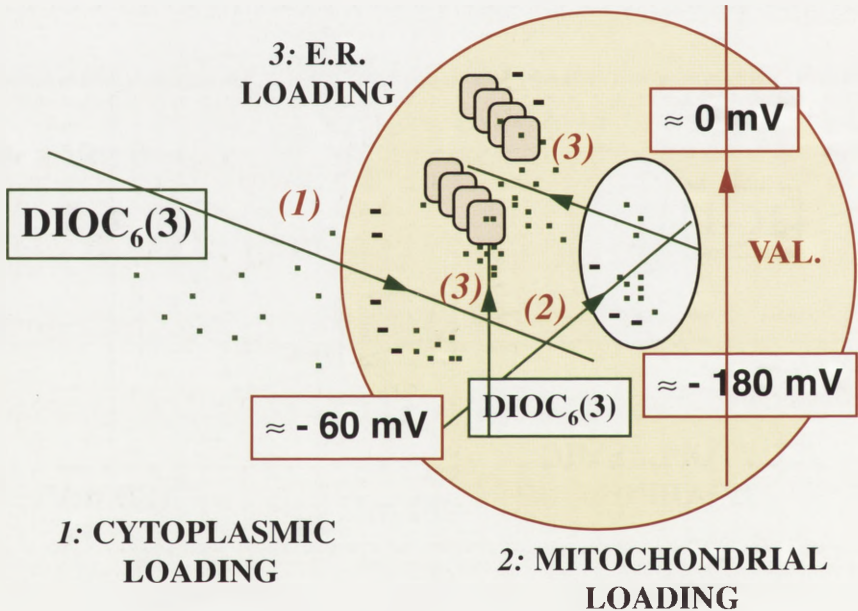


Figure 5. Intracellular distribution of DiOC<sub>6</sub>(3) before and after the depolarization of mitochondria with valinomycin (VAL.). Note that also in this case 3 events can occur: 1) cytoplasmic loading, which is dependent upon plasmamembrane potential; 2) mitochondrial loading, dependent upon  $\Delta\psi$ ; 3) endoplasmic reticulum (E.R.) loading, that theoretically can take place either after the fall in  $\Delta\psi$  or after the cytoplasmic loading. This model can explain the apparent lack of effects of valinomycin on U937 cells stained with this probe, as the fluorescence signal that is produced within the cell is poorly related to  $\Delta\psi$  values



## REFERENCES

- [1] MAFTAH A, PETIT JM, RATINAUD MHAJ, R. 10-N nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **164**: 185–190.
- [2] LOPEZ-MEDIAVILLA C, ORFAO A, GONZALES M, MEDINA JM. Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. *FEBS Lett* 1989; **254**: 115–120.
- [3] COSSARIZZA A, BACCARANI CONTRI M, KALASHNIKOVA G, FRANCESCHI C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 40–45.
- [4] COSSARIZZA A, CECCARELLI D, MASINI A. Functional heterogeneity of isolated mitochondrial population revealed by cytofluorimetric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 84–94.
- [5] HADA H, HONDA C, TANEMURA H. Spectroscopic study on the J-aggregate of cyanine dyes. I. Spectral changes of UV bands concerned with J-aggregate formation. *Photogr Sci Eng* 1977; **21**: 83–91.
- [6] REERS M, SMITH TW, CHEN LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991; **30**: 4480–4486.
- [7] SMILEY ST, REERS M, MOTTOLA-HARTSHORN C, LIN M, CHEN A, SMITH TW, STEELE GD, CHEN LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potential revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3671–3675.
- [8] JOHNSON LV, WALSH ML, CHEN LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**: 990–994.
- [9] DARZYŃKIEWICZ Z, STAIANO-COICO L, MELAMED MR. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 2383–2387.
- [10] PETIT PX, O'CONNOR D, GRUNWALD D, BROWN SC. Analysis of the membrane potential of rat- and mouse-liver mitochondria by flow cytometry and possible applications. *Eur J Biochem* 1990; **194**: 389–397.
- [11] JENSSEN H-L, REDMANN K, MIX E. Flow cytometric estimation of transmembrane potential of macrophages - A comparison with microelectrode measurements. *Cytometry* 1986; **7**: 339–346.
- [12] TERASAKI M, SONG J, WONG JR, WEISS MJ, CHEN BL. Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 1984; **38**: 101–108.
- [13] VAYSSIÈRE JL, PETIT PX, RISLER Y, MIGNOTTE B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11752–11756.
- [14] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, ZANIN C, VAYSSIÈRE J-L, PETIT PX, KROEMER G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*. *J Exp Med* 1995; **181**: 1661–1672.
- [15] ZAMZAMI N, MARCHETTI P, CASTEDO M, DECAUDIN D, MACHO A, HIRSCH T, SUSIN SA, PETIT PX, MIGNOTTE B, KROEMER G. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 1995; **182**: 367–377.

- [16] MACHO A, CASTEDO M, MARCHETTI P, AGUILAR D, ZAMZAMI N, GIRARD PM, URIEL J, KROEMER G. Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood* 1995; **86**: 2481–2487.
- [17] PETIT PX, LECOEUR H, ZORN E, DAUGUET C, MIGNOTTE B, GOUGEON M-L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol* 1995; **130**: 157–167.
- [18] KROEMER G, PETIT P, ZAMZAMI N, VAYSSIÈRE JL, MIGNOTTE B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; **9**: 1277–1287.
- [19] KROEMER G., ZAMZANI N., SUSIN S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; **18**: 44–51.
- [20] COSSARIZZA A., KALASHNIKOVA G., GRASSILLI E., CHIAPPELLI F., SALVIOLI S., CAPRI M., BARBIERI D., TROIANO L., MONTI D., FRANCESCHI C. Mitochondrial modifications during rat thymocyte apoptosis: a study at the single cell level. *Exp Cell Res* 1994; **214**: 323–330.
- [21] COSSARIZZA A., COOPER E.L., QUAGLINO D., SALVIOLI S., KALACHNIKOVA G., FRANCESCHI C. Mitochondrial mass and membrane potential in coelomocytes from the earthworm *Eisenia foetida*: studies with fluorescent probes in single intact cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **214**: 503–510.
- [22] COSSARIZZA A, FRANCESCHI C, MONTI D, SALVIOLI S, BELLESIA E, RIVABENE R., BIONDO L, GR, TINARI A, MALORNI W. Protective effect of N-acetylcysteine in Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Exp Cell Res* 1995; **220**: 232–240.
- [23] COSSARIZZA A, SALVIOLI S, FRANCESCHINI MG, KALASHNIKOVA G, BARBIERI D, MONTI D, GRASSILLI E, TROPEA F, TROIANO L, FRANCESCHI C. Mitochondria and apoptosis: a cytofluorimetric approach. *Fund Clin Immunol* 1995; **3**: 67–68.
- [24] COSSARIZZA A, MUSSINIC, MONGIARDON, BORGHI V, SABBATINI A, DE RIENZO B, FRANCESCHI C. Mitochondria alterations and dramatic tendency to apoptosis in peripheral blood lymphocytes during acute HIV syndrome. *AIDS* 1997; **11**: 19–26.
- [25] YANG J, LIU X, BHALLA K, KIM CN, IBRADO AM, CAI J, PENG TI, JONES DP, WANG X. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; **275**: 1129–1132.
- [26] KLUCK R.M., BOSSY-WETZEL E., GREEN D.R., NEWMYER D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; **275**: 1132–1136.
- [27] SALVIOLI S, ARDIZZONI A, FRANCESCHI C, COSSARIZZA A. JC-1, but not DiOC<sub>6</sub>(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess in intact cells. Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 1997; **411**: 77–82.
- [28] RICHTER C, SCHWEIZER M, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C. Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 1996; **378**: 107–110.
- [29] GUIDARELLI A, SESTILI P, COSSARIZZA A, FRANCESCHI C, CATTABENI F, CANTONI O. Evidence for dissimilar mechanisms of enhancement of inorganic and organic hydroperoxide cytotoxicity by L-histidine. *J Pharmacol Exp Therap* 1995; **275**: 1575–1582.
- [30] BORELLA P, BARGELLINI A, SALVIOLI S, INCERTI MEDICIC, COSSARIZZA A. The use of non-radioactive chromium as an alternative to <sup>51</sup>Cr in NK assays. *J Immunol Methods* 1995; **186**: 101–110.
- [31] POLLA BS, KANTENGWA S, FRANOIS D, SALVIOLI S, FRANCESCHI C, MARSAC C, COSSARIZZA A. Mitochondria as targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6458–6463.
- [32] POLLA BS, KANTENGWA S, MARIETHOZ E, JACQUIER-SARLIN M, HENNET T, RUSSO-MARIE F, COSSARIZZA A. TNF- $\alpha$  alters mitochondrial membrane potential in

- L929 but not in TNF--resistant L929.12 cells: relationship with the synthesis of heat shock proteins and superoxide dismutase activity. *Free Rad. Res* 25: 125-131, 1996;
- [33] COSSARIZZA A, ORTOLANI C, MUSSINI C, BORGHI V, GUARALDI G, MONGIARDO N, BELLESIA E, FRANCESCHINI MG, DE RIENZO B, FRANCESCHI C. Massive activation of immune cells with an intact T cell repertoire in acute HIV syndrome. *J Infect Dis* 1995; **172**: 105-112.
- [34] COSSARIZZA A, ORTOLANI C, MUSSINI C, GUARALDI G, MONGIARDO N, BORGHI V, BARBIERI D, BELLESIA E, FRANCESCHINI MG, DE RIENZO B, FRANCESCHI C. Lack of selective V deletion in CD4+ or CD8+ T lymphocytes and functional integrity of T cell repertoire during acute HIV syndrome. *AIDS* 1995; **9**: 547-554.
- [35] COSSARIZZA A, ORTOLANI C, MONTI D, FRANCESCHI C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry* 1997; **27**: 297-313.
- [36] SANSONI P, COSSARIZZA A, BRIANTI V, FAGNONI F, SNELLI G, MONTI D, MARCATO A, PASSERI G, ORTOLANI C, FORTI E, FAGIOLO U, PASSERI M, FRANCESCHI C. Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 1993; **80**: 2767-2773.
- [37] FRANCESCHI C, COSSARIZZA A. Introduction: the reshaping of immune system with age. *Int Rev Immunol* 1995; **12**: 1-3.
- [38] FRANCESCHI C, MONTI D, BARBIERI D, S S, NEGRO P, CAPRI M, GUIDO M, AZZI R, P S, PAGANELLI R, FAGIOLO U, BAGGIO G, DONAZZAN S, MARIOTTI S, D'ADDATO S, GADDI A, ORTOLANI C, COSSARIZZA A. Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling? *Int Rev Immunol* 1995; **12**: 57-74.
- [39] COSSARIZZA A, BARBIERI D, LONDEI M. T cell repertoire usage in humans, from newborns to centenarians. *Int Rev Immunol* 1995; **12**: 41-55.
- [40] FRANCESCHI C, MONTI D, SANSONI P, COSSARIZZA A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today* 1995; **16**: 12-16.

*Redaktor prowadzący* – Jerzy Kawiak

*Otrzymano*: 17.07.1997 r.

*Przyjęto*: 20.07.1997 r.

*Adres autora*: via Campi 287, 41100 Modena, Italy

*Email*: [cossariz@unimo.it](mailto:cossariz@unimo.it)



## Sprawozdanie z kursu i konferencji cytometrii, czerwiec 1997

W dniach 10–13 czerwca odbył się kurs praktyczny obrazowania konfokalnego, cytometrii przepływowej i analizy obrazu. Kurs był zorganizowany przez dr Jerzego Dobruckiego w Instytucie Biologii Molekularnej UJ w Krakowie. Wykłady podczas kursu były ogólnie dostępne. Wygłosili je doskonali znawcy tematu:

- F. Brakenhoff – Confocal principle, imaging modes and optimalization of confocal imaging,  
– Confocal contrast modes, photon budgets and real time imaging,  
– New confocal techniques, two photon microscopy.
- A. Cossarizza – Cytometric analysis of mitochondria
- Z. Darżynkiewicz – Cytometric methods of detection of apoptosis and accidental cell death (necrosis).  
– Cytometry of cyclins and CDKs inhibitors in cell cycle analysis.
- J. Dobrucki – Deconvolution of wide field and confocal images
- G. Durack – Instrumental aspects of flow cytometry
- H. Malak – Novel multiphoton and timeresolved fluorescence techniques in microscopy
- N. Opitz – Ratio imaging
- J. Pryjma – Detection of tumor cells in peripheral blood by flow cytometry
- B. Rajwa – Image analysis
- J. P, Robinson – Flow cytometry and confocal microscopy: similar measurement systems but different solutions  
– Internet and cytometry  
– Analysis of flow cytometry data.
- F. Sansonetti – Platelet activation studies by flow cytometry
- J. Watson – Drug resistance assays in flow cytometry
- N. White – Multidimensional confocal microscopy of intct, living tissues.
- G. Valet – Cell function in flow cytometry.

Udział w kursie wzięły 42 osoby, które niewątpliwie zyskały szeroką wiedzę z zakresu analizy obrazu i analizy wyników cytometrii przepływowej.

Zaraz po kursie, w dniach 14–15 czerwca 1997 r. odbyła się w Warszawie **3 Konferencja Cytometrii**. Celem Konferencji była szeroka wymiana doświadczeń między różnymi krajowymi pracowniami posługującymi się cytometrią przepływową. Wykłady dotyczyły:

- P. Błachut – Zastosowanie trójkolorowej fluorescencji w oznaczaniu frakcji limfocytów
- A. Cossarizza – Mitochondrial functionality and the apoptotic process,  
– The immune system in human ageing and longevity
- J. Kawiak – Cytometric assay for IL-3.
- K. Madaliński, – Zastosowanie cytometrii w diagnostyce niedoborów  
J. Michałkiewicz, odporności u dzieci.
- E. Kostecka
- J. M. Witkowski – P-glycoprotein and aging of the T lymphocytes
- B. Żupańska – Application of flow cytometry to transfusion medicine  
and immunohaematology  
– Short report on the activity of the European Working Group  
on clinical cell analysis EWGCCS
- G. Żydowicz – Nowe odczynniki i możliwości cytometrii przepływowej

Przedstawiono ponad 30 posterów, które były dyskutowane. Treść dziesięciu wybranych posterów przedstawili podczas specjalnej sesji:

*G. Hoser, E. Jaruga, P. Kopiński, G. Korczak-Kowalska, T. Motyl, T. Ołdak, K. Piwocka, A. Winnicka.*

Obecnych na konferencji było ok. 50 osób. Wykłady cieszyły się dużym powodzeniem i były dyskutowane do ostatniej chwili. Zgłoszono zamiar zorganizowania następnej konferencji cytometrii w Gdańsku jesienią w 1998 r.

Omawiana konferencja była zorganizowana przez

**Zarząd Polskiego Towarzystwa Cytometrii** wspólnie z **Siecią UNESCO/PAN**, **Komitetem Cytobiologii PAN** i **Komisją Hodowli Komórek i Tkanek PAN**.

## KOMUNIKATY

### Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content bądź Medline.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa  
tel. 34-03-44, fax 3404470

### Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- \* **1.** Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- \* **2.** Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- \* **3.** Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- \* **4.** Preferowane będą prace młodych autorów.
- \* **5.** Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- \* **6.** Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- \* **7.** Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- \* **8.** Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- \* **9.** Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- \* **10.** Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.

## MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF ANGIOGENESIS THE ROLE OF GROWTH FACTORS

(A workshop of the Annual Meeting of European Society for Clinical Investigation  
Cracow, April 16–19, 1998)

- \* **Organizers:** Professor Heinrich M. Schulte,  
dr Amal K. Mukhopadhyay
- \* **Topics to be discussed:** VEGF and related factors: regulation of gene expression, vascularization during foetal growth and metastasis, new therapeutic applications, signal transductions, relevance for reproductive and endocrine tissues etc.
- \* **Information:** **Dr Amal K. Mukhopadhyay**  
Institute for Hormone and Fertility Research  
Grandweg 64, 22429 Hamburg  
Tel.: +49 40 5619080, Fax: +49 40 56190864  
e. mail: mukhopad@uke.uni.hamburg.de

## STYPENDIUM DOKTORANCKIE W USA

Jednoroczne lub dwuletnie stypendia w Centrum Naukowym Kimmela na Uniwersytecie Thomasa Jeffersona w Filadelfii w dziedzinie biologii molekularnej nowotworów. Centrum Rakowe Kimmela (dyr. dr Carlo Croce) skupia naukowców badających molekularne mechanizmy onkogenezy oraz lekarzy wdrażających nowe metody leczenia chorób nowotworowych. Jest to obecnie jeden z przodujących ośrodków w USA w dziedzinie onkologii eksperymentalnej i klinicznej.

Po zakończeniu stypendium możliwe jest kontynuowanie pracy w Zakładzie Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie we współpracy z Uniwersytetem Thomasa Jeffersona.

Kandydaci powinni mieć tytuł doktora oraz własny dorobek naukowy. Życiorys wraz z nazwiskami (+telefony) 3 osób mogących udzielić informacji o kandydacie należy przesyłać do

**dr Tomasza Skórskiego**

Thomas Jefferson University, Kimmel Cancer Center  
BLSB 630, 233 South 10th Street, Philadelphia, PA 19107, USA  
tel. (215) 503-4524, fax (215) 923-0249, E-mail: skorski1@jefflin.tju.edu



## XXVII Konferencja szkoleniowa z zakresu biologii komórki

Uprzejmie zawiadamiamy, że Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego i Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików oraz Redakcja Postępów Biologii Komórki organizują doroczną konferencję szkoleniową na temat:

### **Ultrastruktura i funkcja jądra komórkowego – wybrane zagadnienia,**

która odbędzie się w dniu 13 grudnia (sobota) 1997 r. w Warszawie, w sali wykładowej im. L. Paszkiewicza w Anatomicum Akademii Medycznej przy ul. Chałubińskiego 5. Początek obrad o godz. 10.00.

Oплата za uczestnictwo 5 zł, płatna na miejscu obrad. W ramach opłaty uczestnicy otrzymują suplement 6 PBK zawierający materiały Konferencji.

### **Program konferencji:**

#### **Otwarcie konferencji**

**Wybrane metody badania struktury i funkcji jądra komórkowego** – *Stanisław Orkisz* (Wojskowa Akademia Medyczna, Łódź)

**Funkcjonalna organizacja otoczki jądrowej** – *Jacek Godula* (Instytut Zoologii, UJ)

**Modelowanie DNA w jądrach limfocytów** – *Barbara Płytycz* (Instytut Zoologii UJ)

**Pozachromosomowa amplifikacja rDNA** – *Janusz Kubrakiewicz* (Instytut Zoologiczny, Uniwersytet Wrocławski)

**Sekwencje mikrosatelitarne w genomach roślin** – *Tomasz Sakowicz* (Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin)

**Ciałka jądrowe - organizacja i aktualne poglądy na funkcję** – *Szczepan Biliński, Maja Adamska* (Instytut Zoologii UJ)

#### **Podsumowanie**

Uczestnikom Konferencji zostaną również udostępnione po niższej cenie zeszyty PBK.

*Warszawa, wrzesień 1997 r.*

*Organizatorzy*

## Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

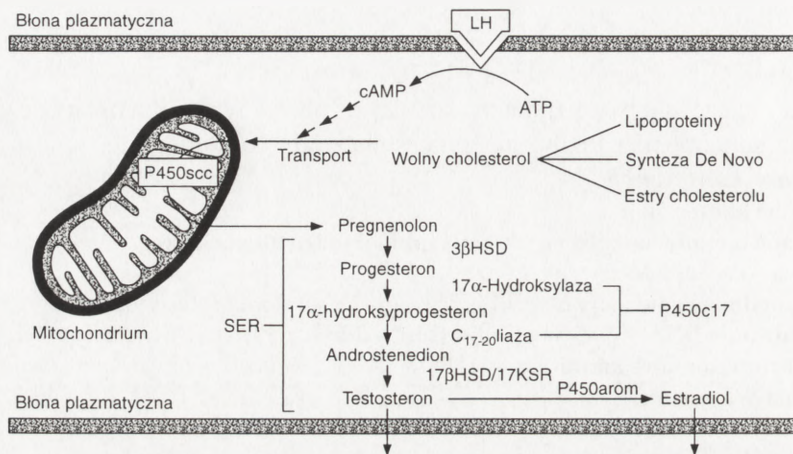
Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	40,00	60,00	80,00	100,00

Zamówienie na odbitki **musi** być złożone wraz z przesłaną korektą pracy.

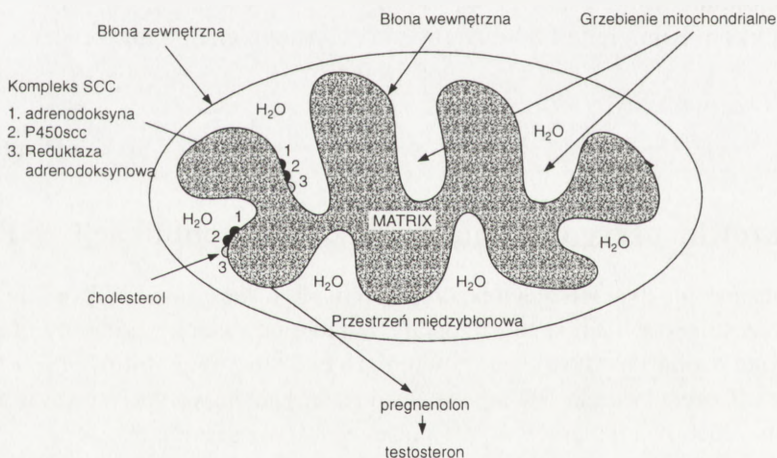
## ERRATA

Sprostowanie do artykułu B. Bilińskiej: Regulacja procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga ssaków. *Rola białka StAR*. *Postępy Biologii Komórki* 1997; 24, 2: 181–202.

Na str. 185 rysunek 1 powinien mieć następującą postać:



Podobnie rysunek 3 na str. 87 powinien być umieszczony w następującej postaci:



Za zaistniałe pomyłki Redakcja serdecznie przeprasza Autora i Czytelników.

## NR 1

W tym Zeszycie	1
CZARNECKA M., HAUS O.: Najczęstsze aberracje strukturalne chromosomów w ostrych białaczkach szpikowych <i>de novo</i>	3
NIKLAS A.: Zastosowanie protoplastów buraka cukrowego ( <i>Beta vulgaris</i> L.) w manipulacjach genetycznych	19
RUPNIEWSKA M., ROŻYŃKOWA D., KUROWSKA M.: Rodzina genów BCL-2	33
BRYŚ M., KRAJEWSKA W. M.: Receptor androgenowy – struktura, funkcja oraz udział w nowotworzeniu gruczolu krokowego	49
SOBKOWIAK A., WIERZBICKI A., TRZECIAK H. W.: Budowa i funkcja receptora lutropiny (LH/hCG)	67
STĘPIEŃ A., JANA B.: Wpływ cytokin na funkcjonowanie ciała żółtego	83
Komunikaty	95
Errata i wskazówki przygotowania rysunków	96

## Nr 2

W tym Zeszycie	97
LEHMANN P.: Molekularne podstawy odporności roślin na choroby – Struktura i funkcja roślinnych genów odporności	99
BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK E., ZALEWSKA A.: Mastocyty i fibroblasty – Obojętni sąsiedzi czy przyjaźni partnerzy?	127
WÓJCIK C.: Udział cząsteczek adhezyjnych w wybranych procesach rozwojowych	145
WOJDA A.: Inaktywacja chromosomu X (aktualne doniesienia)	173
BILIŃSKA B.: Regulacja procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga ssaków – Rola białka StAR	183
MIDRO A. T.: Wpływ nosicielstwa translokacji chromosomowych wzajemnych na potomstwo człowieka	203
KILIAŃSKA Z., SZYMCZYK P.: Niskocząsteczkowe jąderkowe RNA (snoRNA) – Właściwości i funkcje	227
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Komórki grzebienia nerwowego I. Powstawanie i migracja	259
BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA Z.: Komórki grzebienia nerwowego II. Różnicowanie	279
Komunikaty	299
Wskazówki przygotowania rysunków	

## Nr 3

W tym Zeszytcie	301
ŻBIKOWSKA H.M.: Metabolizm selenu w komórce i organizmie człowieka	303
ŻBIKOWSKA H.M.: Antykarcynogenne działanie selenu	315
WIDŁAK P.: Struktura nukleosomowa chromatyny a naprawa DNA	325
FERTAK A., KILARSKI W.: Połączenia szczelinowe	339
BIELEWSKI K., KOWALCZYK-ZIOMEK G., KONECKI J., GŁOWACKA M.: Białka surfaktantu	375
MALESZEWSKI S., KOZŁOWSKA-SZERENOS B.: Karboksylaza/oksygenaza ryboluzo-1,5-bisfosforanu – Kluczowy enzym fotosyntezy i oddychania – Ostatnia dekada badań	387
Komunikaty	399
Wskazówki przygotowania rysunków	400

## Nr 4

W tym Zeszytcie	401
KUŹNIAK E.: Wykorzystanie kultur <i>in vitro</i> w badaniach reakcji obronnych roślin na stres biotyczny	403
GLIŃSKI Z., JAROSZ J.: Postępy w poznaniu struktury i funkcji polipeptydów odpornościowych owadów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym	417
BIELIŃSKA B.: Molekularne podłoże zespołów Pradera-Willego i Angelmana a mechanizmy rodzicielskiego piętnowania genomu u człowieka	435
TERLIKOWSKI S., SULKOWSKI S.: Czynniki martwicy nowotworów-alfa w komórkach żeńskiego układu rozrodczego	449
JACKOWSKI G.: Molekularna budowa błony tylakoidowej	469
SZYMCZYK P., KILIAŃSKA Z.: Białka zaangażowane w proces obróbki pre-rRNA	491
PAŚNIK J.: Endogenne peptydy opioidowe: nowe cytokiny?	519
KORDAN W., STRZEŻEK J.: Biochemiczne mechanizmy regulacji ruchu plemników ssaków	543
ROLIŃSKI J.: Apoptoza w układzie odpornościowym – rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2	561
COSSARIZZA A., SALVIOLI S., FRANCESCHI C.: Analysis of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) with fluorescent probes	575
Sprawozdanie z kursu i konferencji cytometrii, czerwiec 1997	587
Komunikaty	589
Wskazówki przygotowania rysunków	591
Errata	592





## 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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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

3) listy do redakcji ( do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać 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. Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach i rysunków na dyskietce (wskazówki na s. 591) przyspieszy publikację. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy w pracy i domowy 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, informacje o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. 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. I, rys. I itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Prowadzenie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] 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 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 niezminionej 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 doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik na s. 4 okł.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania: Dołączono 2 kopie maszynopisu,

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została

tabel i rycin. **tak nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli- pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**

kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postępach Biologii Komórki" przechodzi na własność reda- **tak nie**

kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **podpis**

## TREŚĆ

W tym Zeszycie	401
KUŹNIAK E.: Wykorzystanie kultur in vitro w badaniach reakcji obronnych roślin na stres biotyczny	403
GLIŃSKI Z., JAROSZ J.: Postępy w poznaniu struktury i funkcji polipeptydów odpornościowych owadów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym	417
BIELIŃSKA B.: Molekularne podłoże zespołów Pradera-Willego i Angelmana a mechanizmy rodzicielskiego piętnowania genomu u człowieka	435
TERLIKOWSKI S., SULKOWSKI S.: Czynniki martwicy nowotworów -alfa w komórkach żeńskiego układu rozrodczego	449
JACKOWSKI G.: Molekularna budowa błony tylakoidowej	469
SZYMCZYK P., KILIAŃSKA Z.: Białka zaangażowane w proces obróbki pre-rRNA	491
PAŚNIK J.: Endogenne peptydy opioidowe: nowe cytokiny?	519
KORDAN W., STRZEŻEK J.: Biochemiczne mechanizmy regulacji ruchu plemników ssaków	543
ROLIŃSKI J.: Apoptoza w układzie odpornościowym – rola Fas, bcl-2 i interleukiny 2	561
COSSARIZZA A., SALVIOLI S., FRANCESCHI C.: Analysis of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) with fluorescent probes	575
Sprawozdanie z kursu i konferencji cytometrii, czerwiec 1997	587
Komunikaty	589
Wskazówki przygotowania rysunków	591
Errata	592

## Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

*Prenumerata na rok 1998*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1998 na konto:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 1998:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 60 zł,  
a dla odbiorców indywidualnych 20 zł.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

**Indeks 369705**