

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 26, ISSUE 4/1999
(701–880)

Postępy
Biologii
Komórki

Advances
in Cell
Biology

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, cytoszkielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*),
Jerzy KAWIAK (immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),
Wincenty KILARSKI (mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*),

Jacek KUŹNICKI (biologia molekularna, biochemia – molecular biology, biochemie – *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego, 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*).

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

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

Barbara PŁYTYCZ (immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*)

Maciej ZABEL (histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry, immunocytochemistry, hybrydocytochemistry, cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*)

Jan ŻEROMSKI (patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*)

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. 8340 344, fax 8340470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl.

© 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.

W tym Zeszyte Postępów Biologii Komórki

- System naprawy DNA bierze udział w utrzymaniu integralności genomu podlegającego zmianom pod wpływem czynników zewnętrznych i wewnętrznych. U człowieka bezpośrednio w proces naprawy zaangażowane są produkty białkowe ponad 70 genów. Omówienie tego problemu znajdzie Czytelnik na stronie 707.
- Badania doświadczalne i obserwacje kliniczne dostrzegają wielu dowodów świadczących o roli neutrofilii w patogenezie procesu zapalnego rozwijającego się w obszarze niedokrwionym i reperfundowanym serca. W artykule na stronie 731 przedstawiono aktualne informacje na temat udziału w opisywanym zjawisku selektyn, integryn i adhezyn oraz mediatorów uwalnianych w czasie niedokrwienia i reperfuzji serca.
- W ostatnich latach zostały opracowane nowe lub udoskonalone systemy eksperymentalne zapłodnienia *in vitro* z użyciem izolowanych gamet roślin okrytonasiennych. Obecnie mogą być otrzymywane w warunkach *in vitro* zygoty, a w przypadku kukurydzy także płodne rośliny. Techniki te zostały opisane w dwu kolejnych artykułach na stronach 793 i 809.
- Luliberyna, hormon uwalniający lutropinę, jest dekapeptydem syntetyzowanym w podwzgórzu. W artykule na stronie 827 przedstawiono budowę i rolę fizjologiczną receptora luliberyny. Opisano również mutanty tego receptora występujące w niektórych stanach chorobowych. Omówiono też znaczenie analogów luliberyny w terapii.
- Interleukina-15 (IL-15) jest niedawno odkrytą cytokiną przypominającą strukturalnie, ale nie funkcjonalnie interleukinę-2. IL-15 jest produkowana przez różne komórki organizmu, a indukuje proliferację komórek NK, limfocytów T i B oraz monocytów. W artykule na stronie 863 opisano organizację genową IL-15, budowę jej receptora oraz działanie tej cytokiny.

WSPOMNIENIE O PROFESORZE DR HAB. JANIE MICHEJDZIE

Profesor dr hab. Jan Michejda urodził się 28 maja 1927 r. w Poznaniu. W latach wojny ukończył średnią szkołę handlową oraz uczęszczał do tajnego Gimnazjum i Liceum w Krakowie. Egzamin maturalny zdał w 1945 r. W tym samym roku podjął studia na Uniwersytecie Poznańskim, gdzie w 1949 r. uzyskał stopień magistra filozofii w zakresie zoologii. Pracę zawodową podjął jeszcze przed zakończeniem studiów jako młodszy asystent Pracowni Farmakodynamiki na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Poznańskiego. Od 1949 r. był kierownikiem tej Pracowni, przeniesionej w następnych latach do Akademii Medycznej po jej wydzieleniu z U.P. Równocześnie od 1949 r. podjął pracę w Zakładzie Biologii Ogólnej, przekształconym następnie w Katedrę Zoologii Ogólnej Uniwersytetu im. A. Mickiewicza. Konsekwentna i energiczna działalność organizacyjna Prof. Jana Michejdy doprowadziła do powstania w 1963 r. Zakładu Fizjologii Zwierząt oraz w 1965 r. do uruchomienia Pracowni Mikroskopii Elektronowej. W 1969 r. prof. Michejda został przeniesiony



do Zakładu Biochemii, w którym zorganizował Zespół Bioenergetyki, przekształcony w następnych latach w Zakład Bioenergetyki UAM. Zakładem tym kierował do czasu przejścia na emeryturę, a pracował w nim do ostatnich swoich dni.

Swą niezwykle aktywną i bogatą działalność naukową Profesor Jan Michejda rozpoczął jeszcze przed zakończeniem studiów, podejmując w 1947 r. pracę jako młodszy asystent w Pracowni Farmakodynamiki. Jego praca magisterska (1949 r.) dotyczyła zmian zabarwienia *Crangon crangon* (krewetka) pod wpływem hormonów i jonów wapnia. Uzyskane wyniki opublikował w 1950 r – była to pierwsza praca z fizjologii zwierząt wykonana w Uniwersytecie Poznańskim. Zainteresowani procesami metabolicznymi pozostał wierny przez całe swe twórcze życie, a pewnym wyjątkiem była tylko jego praca doktorska pt. *Stratyfikacja chemiczna i faunistyczna źródeł i potoków górskich*. Ten epizod, nieco odbiegający od Jego podstawowych zainteresowań, zaznaczył się jednak obszerną i wartościową publikacją pt. *An analysis of the ecological conditions in springs and streams of the Góry Stołowe*. Na podstawie tej rozprawy w 1951 r., a więc w ciągu zaledwie 2 lat od zakończenia studiów, uzyskał stopień naukowy doktora.

Po uzyskaniu doktoratu powrócił do zagadnień związanych z fizjologią zwierząt. W latach pięćdziesiątych do badań taksonomicznych niektórych grup zwierząt wprowadził analizy biochemiczne, dokonywane w oparciu o bardzo nowoczesne wówczas metody chromatograficzne. Obszarem Jego szczególnie intensywnych i owocnych badań stała się jednak bioenergetyka. W 1957 odbył staż naukowy w Laboratorium Carlsberg w Danii, a opanowane tam metody natychmiast przeniósł do swego macierzystego laboratorium. W krótkim czasie powstał wartościowy cykl publikacji dotyczących charakterystyki enzymów łańcucha oddechowego ameby *Chaos chaos*, ślimaków i niektórych roślin. W 1959 r. prof. Jan Michejda – jako pierwszy polski stypendysta Fundacji Rockefellera w tym ośrodku – odbył staż naukowy w Uniwersytecie Harvarda, podczas którego zajmował się energetyką mitochondriów owadów. Wykazał tu m.in. dojrzewanie energetyczne towarzyszące biogenezie mitochondriów. Osiągnięcia w tej dziedzinie zebrał w rozprawie habilitacyjnej pt. *Zagadnienia fizjologii sarkosomów mięśni skrzydłowych ćmy Hyalophora cecropia*, na podstawie której w 1962 r. uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk przyrodniczych w zakresie fizjologii zwierząt.

W następnych latach problemy bioenergetyczne związane z molekularnymi aspektami funkcjonowania mitochondriów stały się głównym nurtem działalności naukowej Profesora Jana Michejdy. Ich konsekwentny rozwój, prowadzony przy ścisłej współpracy z wieloma ośrodkami zagranicznymi zdecydował, że Prof. Jan Michejda stał się jednym z czołowych polskich biochemików zajmujących się bioenergetyką i regulacją metabolizmu mitochondriów i twórcą swej własnej szkoły o wyraźnie skryształizowanym profilu badawczym.

Dużym osiągnięciem naukowym Prof. Michejdy było odkrycie u ameb i ślimaków dehydrogenazy mleczanowej specyficznej wobec D(-)mleczanu oraz odkrycie i cha-

rakterystyka molekularnych izoform dehydrogenazy jabłczanowej. Wyniki badań dotyczących tych zagadnień zostały opublikowane w czołowych światowych czasopismach biochemicznych. Dalszym ważnym naukowym stwierdzeniem było wykrycie tlenowego metabolizmu energetycznego u organizmu żyjącego w zasadzie w warunkach beztlenowych – u *Trichinella spiralis*.

Duże uznanie w skali światowej przyniosły badania transportu przez błony mitochondrialne. Szczególnie duże osiągnięcia prof. Michejdy dotyczą transportu nukleotydów adenylowych do i z mitochondriów. Stosując do tych badań fragmenty błon sonikowanych mitochondriów, Prof. Michejda wykazał asymetrię przenośnika ADP/ATP, manifestującą się m.in. asymetrią miejsc wiązania atraktylozydu, karboksyatraktylozydu i kwasu bongkrekowego. Wyniki tych badań wniosły wiele nowych informacji dotyczących molekularnych mechanizmów transportu i ustalania się stosunku ATP do ADP po obu stronach błony mitochondrialnej i jego zależności od potencjału błonowego. W dalszych badaniach prof. Michejda wykazał, że działanie przenośnika ADP/ATP wymaga ekspozycji grup –SH i jest hamowane przez nigerycynę. Transport nukleotydów adenylowych prof. Michejda badał podczas licznych naukowych wyjazdów do Centrum Badań Nuklearnych w Grenoble. Wyniki publikował w *Biochimica et Biophysica Acta*, *FEBS Letters* oraz w wydawnictwach zwartych, m.in. w książce *Proton and Calcium Pumps*, wydanej przez Elsevier w 1978 r.

Kolejnym ważnym osiągnięciem Profesora i Jego współpracowników było odkrycie u pierwotniaków alternatywnego toru oddechowego. Do czasu tego odkrycia przyjmowano pogląd, że tor taki i odpowiednia alternatywna oksydaza działają tylko w mitochondriach roślin i grzybów. Alternatywny tor oddechowy rozgałęzia się na poziomie ubichinonu, a przepływ elektronów nie jest sprzężony z wytwarzaniem siły protonomotorycznej i fosforylacją ADP. W pracy, zamieszczonej w jednym z najlepszych na świecie czasopism – *Journal of Biological Chemistry* – której jednym z autorów jest Prof. Michejda, wykazano jak dochodzi do rozdziału strumienia elektronów między cytochromowy i alternatywny tor w mitochondriach ameby.

W ostatnim okresie życia Prof. Michejda znakomicie rozszerzył zakres metod stosowanych w swoim Zakładzie do wyjaśniania molekularnych mechanizmów transportu rozmaitych związków przez błony mitochondrialne o metody oparte na analizie genów i ukierunkowanej mutagenzie. Pasjonował się molekularnymi mechanizmami działania kanałów błonowych i poryn, do badania których w coraz szerszym zakresie wykorzystywał bezporynowe mutanty *Saccharomyces cerevisiae*. Wprowadzenie metod rekombinacyjnej technologii DNA i ich łączenie z już klasycznymi – ale wciąż bardzo nowoczesnymi metodami analizy różnych aspektów funkcjonowania mitochondriów, zaczęło dopiero owocować kolejnymi publikacjami i na pewno będzie dalej owocować w postaci prac Zespołu, którego twórcą był Prof. Michejda.

Naukowy dorobek Prof. Michejdy jest niezwykle bogaty: ogółem obejmuje 191 oryginalnych prac badawczych, monografii i komunikatów naukowych. Znaczny odsetek tych prac był zamieszczony w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym obiegu. Prof. Michejda wielokrotnie bardzo aktywnie uczestniczył w międzynarodowych (ponad 50) i krajowych (ponad 40) konferencjach i sympozjach i był organizatorem niektórych z nich.

Osobny rozdział w twórczości Prof. Michejdy stanowią opracowania akademickich podręczników – był autorem 3 skryptów, współautorem *Biologii XX wieku*, *Podstaw cytofizjologii* i *Cytofizjologii*. Ponadto był tłumaczem lub współtłumaczem i redaktorem naukowym 11 obszernych podręczników akademickich. Korekty 4 ostatnich podręczników (Alberts i in. *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej* oraz 3 podręczniki z serii *Krótkie wykłady* (*Biochemia*, *Biologia molekularna*, *Biologia zwierząt*) wydane przez PWN) dokonał w ostatnich miesiącach swego życia, pracując nawet podczas krótkiego pobytu w szpitalu.

Prof. Michejda był też doskonałym i niestrudzonym popularyzatorem wiedzy: przez wiele lat prowadził wykłady w ramach Towarzystwa Wiedzy Powszechnej, wielokrotnie uczestniczył w wykładach otwartych organizowanych przez UAM. Był wspaniałym wykładowcą. Jego wykłady porywały słuchaczy zarówno bogactwem treści, żywością formy jak i naukową aktualnością. Prowadził także wiele kursowych wykładów dla studentów wszystkich lat studiów i to nie tylko studiów biologicznych. Swą twórczość naukową ściśle wiązał z działalnością dydaktyczną a najnowsze zdobycze wiedzy praktyczne natychmiast wprowadzał do swych wykładów akademickich. Pracę dydaktyczną traktował bardzo odpowiedzialnie, niezależnie od form jej realizacji. Jednakowo poważnie traktował prace polegające na przygotowaniu programów studiów, bezpośrednich informatorów dla kandydatów na studia, czy poważnych i trudnych wykładów monograficznych lub kierowaniu pracami magisterskimi. Był promotorem wielu magistrantów i doktorantów, wielokrotnie recenzował prace doktorskie i habilitacyjne. Był krytykiem wymagającym, ale równocześnie bardzo życzliwym, chętnie udzielał pomocy i porad autorom ocenianych prac. Był członkiem Redakcji kilku czasopism naukowych, w tym także jednym z redaktorów *Postępów Biologii Komórki*.

Prof. Michejda stworzył prawdziwą naukową szkołę bioenergetyki. Ma ogromne zasługi w rozwoju badań naukowych, także poprzez formułowanie tematów projektów badawczych i kierowanie ich realizacją, niestrudzone zabiegi o nowoczesność warsztatu pracy i wyposażenie pracowni w niezbędny sprzęt i aparaturę.

Był wielką indywidualnością o ogromnym czarze osobistym, wspaniałym biologiem, wielkim przyjacielem młodzieży akademickiej. Zmarł w dniu 25 maja 1999r. Jego odejście pozostawia bolesną lukę.

Redakcja *Postępów Biologii Komórki*

Pracownicy Wydziału Biologii
UAM w Poznaniu

NAPRAWA DNA W KOMÓRKACH SSAKÓW

DNA REPAIR IN MAMMALIAN CELLS

Andrzej TRZECIAK, Janusz BŁASIAK

Katedra Genetyki Molekularnej, Uniwersytet Łódzki w Łodzi

Streszczenie: System naprawy DNA bierze udział w utrzymaniu integralności genomu, ulegającego zmianom pod wpływem czynników egzo- i endogennych. U człowieka bezpośrednio w proces naprawy zaangażowane są produkty białkowe ponad 70 genów, które biorą udział w kilku systemach naprawczych. Proces naprawy zazwyczaj obejmuje dwa etapy: wycięcie uszkodzenia i syntezę naprawczą. Tak działają systemy naprawy przez wycinanie zasad, naprawy przez wycinanie nukleotydów, naprawy błędnie sparowanych zasad. Odmiennie przedstawia się działanie systemu naprawy przez bezpośrednią wersję uszkodzenia, w przypadku którego mamy do czynienia jedynie z jednoetapowym procesem, podczas którego zostaje zachowana integralność łańcucha fosfodiesterowego DNA oraz systemu naprawy rekombinacyjnej. Procesy naprawy DNA obserwuje się także w mitochondriach, jednakże z uwagi na fragmentaryczne dane nie zostały one szerzej opisane. Defekty białek uczestniczących bezpośrednio w naprawie DNA i jej regulacji związane są ze zwiększoną podatnością na nowotwory oraz takimi zaburzeniami, jak: zahamowanie wzrostu, postępujące zwyrodnienie układu nerwowego, opóźnienie umysłowe, obniżenie odporności czy przyspieszenie procesu starzenia.

(Postępy Biologii Komórki 1999; 26:707–729.)

Słowa kluczowe: naprawa DNA, uszkodzenia DNA, enzymy naprawcze

Summary: DNA repair system plays an important role in keeping the integrity of genome which undergoes changes caused by exo- and endogenous factors. Protein products of over 70 genes, involving directly in repair, take part in some repair systems in humans. Repair process usually consists of two steps: excision of DNA damage and repair synthesis. On the contrary, direct repair and recombination repair differ from excision repair systems: base excision repair, nucleotide excision repair and mismatch repair. Direct repair is one-step process which maintains the integrity of DNA phosphodiester bonds. DNA repair proceeds also in the mitochondrion, but there is very little information about it. Defects of proteins, which directly participate in the DNA repair and its regulation are linked with cancer predisposition and other diseases like growth retardation, progressive neurological degeneration, mental retardation, immunodeficiency or prematurely aged facies.

(Advances in Cell Biology 1999; 26: 707–729.)

Key words: DNA repair, DNA damage, repair enzymes

Uszkodzenia DNA człowieka mogą być skutkiem ekspozycji na różnorodne substancje występujące w środowisku zewnętrznym lub wewnątrz komórki. Najwięcej uszkodzeń powstaje w procesach endogennych, przede wszystkim jako konsekwencje błędów w replikacji DNA. W czasie średniego życia człowieka ma miejsce około 10^{17} podziałów komórkowych, z których każdy wymaga wprowadzenia we właściwe miejsce 6×10^9 nukleotydów. W ciągu całego życia jest zatem do 6×10^{26} okazji do powstania błędu, mogącego dać początek mutacjom, wynikających jedynie z procesu replikacji. Źródłem uszkodzeń może być także szereg innych procesów endogennych, jak i wiele czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych w środowisku zewnętrznym. Wysoka częstość zmian DNA mogłaby mieć śmiertelne konsekwencje dla organizmu, gdyby nie była kontrolowana przez systemy naprawy DNA.

Naprawa DNA jest jednym z podstawowych mechanizmów ochrony przed mutagennym działaniem związków chemicznych. Proces naprawy składa się przynajmniej z dwóch etapów: wycięcia uszkodzenia i syntezy naprawczej. Wyjątek stanowią jednoetapowy proces naprawy przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia oraz system naprawy przez rekombinację.

W tabeli 1 przedstawione są główne substraty systemów naprawy DNA człowieka, często jednak jedno uszkodzenie może być naprawiane przez kilka systemów. Na przykład heterodimer hMutS α , uczestniczący w naprawie błędnie sparowanych zasad azotowych, wiąże się z O^6 -metyloguaniną oraz adduktami powstałymi w wyniku oddziaływania pochodnych leku przeciwnowotworowego cisplatyny z sekwencją d(GpG) – uszkodzeniami, które są rozpoznawane przez metylotransferazę O^6 -metyloguanina-DNA i system naprawy przez wycinanie nukleotydów [10].

W pracy przedstawiono jedynie systemy naprawcze człowieka i innych ssaków biorące udział w usuwaniu uszkodzeń jądrowego DNA. Naprawę DNA obserwuje się również w mitochondriach, jednakże jest ona znacznie mniej wydajna niż w jądrze i dotychczas została słabo poznana. mtDNA nie koduje żadnego białka zaangażowanego w jego naprawę – wszystkie białka są kodowane w jądrowym DNA, syntetyzowane w cytoplazmie i transportowane do mitochondriów. Najlepiej scharakteryzowanym białkiem mitochondrialnym, które może uczestniczyć w naprawie mtDNA jest endonukleaza G kodowana przez gen *ENDOG* znajdujący się w genomie jądrowym w chromosomie 9q34.1. Ten składający się z 297 aminokwasów enzym preferencyjnie trawi odcinki DNA bogate w cytozyny i guaniny [47]. Wyniki badań przeprowadzonych na oocytach żaby *Xenopus laevis* wskazują na obecność w mitochondriach fotolizy oraz systemu naprawy przez wycinanie nukleotydów [40].

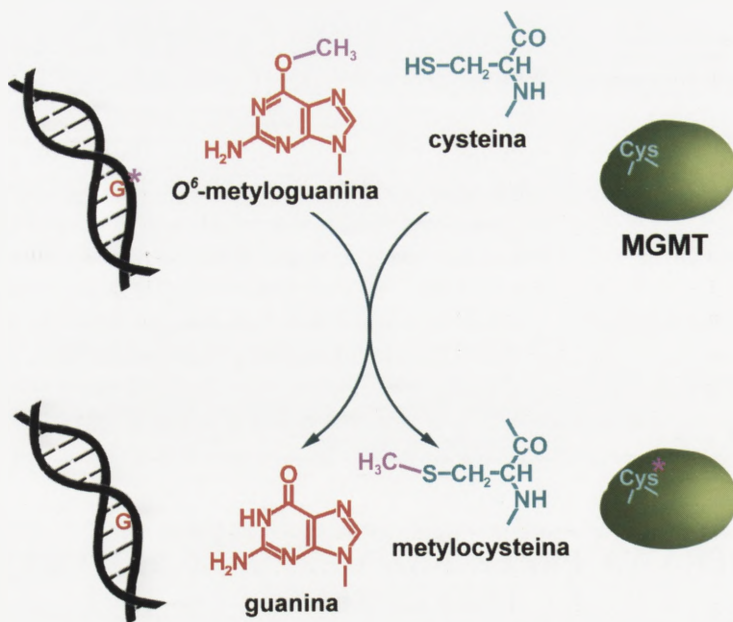
TABELA 1. Systemy naprawy DNA u ssaków

| System naprawy | Substrat |
|---|---|
| przez bezpośrednią rewersję uszkodzenia | alkilowane zasady azotowe, głównie O^6 -metylo-dGua; u niektórych ssaków również fotoprodukty pirymidynowe |
| przez wycinanie zasad azotowych | utlenione zasady azotowe, <i>N</i> -alkilowane puryny, uracyl, hipoksantyna, miejsca AP, pęknięcia jednoniciowe DNA |
| przez wycinanie nukleotydów | objętościowe addukty, fotoprodukty, uszkodzenia wewnątrz- i międzyniciowe zaburzające konformację DNA |
| błędnie sparowanych zasad azotowych | błędy powstałe podczas replikacji, alkilowane zasady azotowe, miejsca błędnego parowania po rekombinacji |
| przez rekombinację | pęknięcia dwuniciowe |

1. NAPRAWA PRZEZ BEZPOŚREDNIĄ REWERSJĘ USZKODZENIA

W bezpośredniej naprawie DNA biorą udział metylotransferaza O^6 -metyloguanina-DNA (MGMT) oraz fotolizy DNA. MGMT jest kodowana przez gen znajdujący się w chromosomie 10q26. U człowieka MGMT jest monomerycznym białkiem o masie 21,7 kDa katalizującym przeniesienie grupy alkilowej z atomu O^6 guaniny DNA na cysteinę znajdującą się w pozycji 145 [53], w wyniku czego ulega ona nieodwracalnej dezaktywacji (rys. 1). Reakcja ta jest stechiometryczna – jedna cząsteczka metylotransferazy usuwa jedną grupę alkilową z DNA. W związku z charakterem przeprowadzanej reakcji białko MGMT jest raczej swoistym akceptorem niż enzymem. Metylotransferaza prokariotów, w przeciwieństwie do ssaków, dokonuje przemieszczenia grup alkilowych z O^4 tyminy oraz z tlenu grupy fosforanowej. Transferaza bakteryjna ma dwie domeny funkcjonalne, C-końcową o masie 19 kDa, która odpowiada białku ssaków i katalizuje reakcje przeniesienia grup z zasad azotowych, oraz drugą – N-końcową (20 kDa), nie mającą odpowiednika u ssaków i odpowiedzialną za reakcje przeniesienia podstawników alkilowych z grup fosforanowych DNA [42].

Ekspresję metylotransferazy O^6 -metyloguanina-DNA w różnych tkankach prawidłowych i nowotworowych cechuje zróżnicowany poziom. U ludzi, najwyższy poziom aktywności obserwuje się w wątrobie, natomiast najniższy w komórkach prekursorowych szpiku kostnego [16]. Podawanie zwierzętom związków alkilujących zwiększało częstość występowania nowotworów w obszarach charakteryzujących się mniejszą ekspresją metylotransferazy. Myszy pozbawione aktywnej transferazy są wrażliwe na toksyczne działanie związków alkilujących [22, 46, 49], chociaż cechują się podobnym okresem życia jak inne osobniki tego samego gatunku. Eks-



RYSUNEK 1. Reakcja przeniesienia grupy metylowej z O^6 -metyloguaniny na wewnętrzny akceptor katalizowana przez metylotransferazę O^6 -metyloguanina-DNA (MGMT)

presja genu *MGMT* w ludzkich komórkach nowotworowych ulega zmniejszeniu o 20–30%. Jak wiadomo, szereg nowotworów wykazuje oporność na działanie czynników alkilujących stosowanych w chemoterapii. W takich przypadkach można często obserwować zwielokrotnienie kopii genu *MGMT* [46]. Aktywność transferazy w komórkach zarówno prawidłowych jak i nowotworowych zależy od ekspozycji na związki wprowadzające grupy alkilowe do DNA.

Fotolizy DNA usuwają dimery pirymidynowe oraz (6–4)fotoprodukty w wyniku reakcji dwuetapowej. W pierwszym etapie następuje pochłonięcie kwantu światła przez chromofor i przekazanie energii promieniowania grupie prostetycznej enzymu, która inicjuje rozczepienie fotoproduktów pirymidynowych przez przeniesienie elektronu. Produktami działania fotoliz są zasady, które tworzyły elementy składowe fotoproduktów. Również u ssaków stwierdzono obecność fotoliz DNA – u człowieka [52] oraz torbaczy: dydelfa *Monodelphis domestica* i poturu *Potorous tridactylus* [25]. Substratami enzymu występującego u torbaczy są dimery pirymidynowe. U człowieka stwierdzono istnienie homologicznego 586-aminokwasowego białka, kodowanego przez gen *CRY1 (PHLL1)* znajdujący się w chromosomie 12q23-24.1, jednakże nie udało się dotychczas wykryć jego aktywności typowej dla fotoliz [48].

2. NAPRAWA PRZEZ WYCINANIE ZASAD AZOTOWYCH

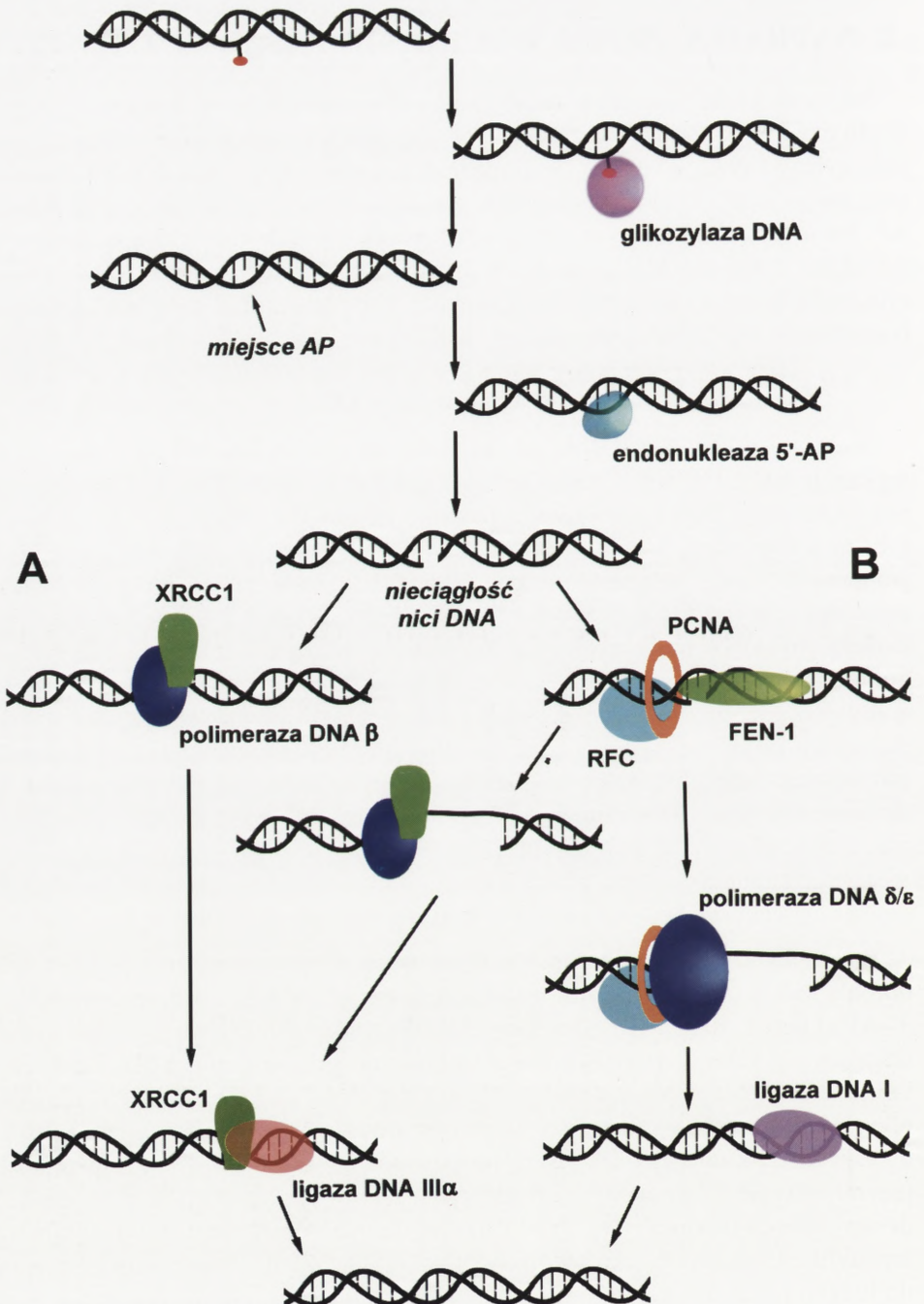
Naprawa przez wycinanie zasad azotowych rozpoczyna się hydrolizą wiązania *N*-glikozydowego pomiędzy zmodyfikowaną zasadą i pierścieniem cukrowym przez glikozylazy DNA, w wyniku czego pozostaje wolne miejsce w łańcuchu, określane jako miejsce AP. Miejsca pozbawione zasad rozpoznawane są przez endonukleazy AP, które przecinają w tym miejscach łańcuch fosfodiesterowy. Po usunięciu pozostałości uszkodzonego nukleotydu przez białka wykazujące aktywność deoksyrybofosfodiesterazy następuje wypełnienie luki przez polimerazy DNA i połączenie fragmentów nici DNA przez ligazy (rys. 2).

2.1. Glikozylazy DNA

Niektóre glikozylazy DNA, jak na przykład glikozylaza NTHL1 (tab. 2) [2], wykazują także aktywność liazy AP związanej ze zdolnością do β -eliminacji, czyli równoczesnego przecięcia wiązania fosfodiesterowego 3' tworzonego przez deoksyrybozę występującą w miejscu AP i utworzenia wiązania podwójnego pomiędzy atomami C² i C³ w obrębie cukru. Glikozylazy są względnie małymi białkami monomerycznymi, które nie wymagają kofaktorów. W tabeli 2 przedstawiono typowe uszkodzenia DNA i glikozylazy człowieka uczestniczące w ich usuwaniu. Poszczególne enzymy różnią się między sobą specyficznością substratową. DNA-glikozylaza uracylowa rozpoznaje i usuwa uracyl i jego analogi: 5-hydroksyuracyl, kwas izodialurowy (5-okso-6-hydroksyuracyl), alloksan (5,6-dioksouracyl) [43]; natomiast glikozylaza 3-metyloadeninowa charakteryzuje się mniejszą specyficznością substratową wycinając 3-alkilopuryny, 7-alkilopuryny, cykliczne addukty etenowe puryn, 8-oksoguaninę, hypoksantynę [29].

2.2. Endonukleazy apurynowe/apirymidynowe

Endonukleazy apurynowe/apirymidynowe są zróżnicowaną grupą enzymów, w obrębie której można wyróżnić endonukleazy 5'-AP (klasa II) oraz endonukleazy 3'-AP (klasa I) działające jako liazy AP. Wszystkie dotychczas poznane enzymy należące do klasy I są połączone z niektórymi glikozylazami DNA (tab. 2). W komórkach ssaków jedyną znaną endonukleazą 5'-AP jest białko HAP1. Katalizuje ono reakcje hydrolizy wiązania 5'-fosfodiesterowego między nukleotydem po stronie 5' uszkodzenia oraz deoksyrybozą pozbawioną zasady azotowej, grupami blokującymi pozycję C³ sąsiedniego nukleotydu, takimi jak: grupa 3'-fosforanowa, 3'-deoksyrybo-5'-fosforanowa czy 3'-fosfoglikoloaldehydowa i nukleotydami ze zmodyfikowaną zasadą azotową, np. p-BQ-dG [17]. Podobne właściwości w stosunku do ludzkiej endonukleazy 5'-AP stwierdzono również w przypadku białek *Escherichia coli*: egzodonukleazy III wykazującej częściową homologię do HAP-1 oraz endonukleazy IV [44]. HAP-1 znane jest także pod synonimem Ref-1, pod którym



RYSUNEK 2. Przebieg naprawy przez wycinanie zasad azotowych; A – szlak podstawowy, B – szlak alternatywny

TABELA 2. Białka człowieka uczestniczące w naprawie DNA przez wycinanie zasad azotowych; w tabeli podano także geny kodujące homologiczne enzymy u *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*

| Enzym | Gen | Lokalizacja w genomie | M. cz. [kDa] (liczba aminokwasów) | Geny <i>E. coli</i> ¹⁾ i <i>S. cerevisiae</i> ²⁾ | Specyficzność substratowa enzymu ludzkiego |
|--|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--|---|
| Glikozylazy DNA | | | | | |
| glikozylaza uracylowa | <i>UNG1</i> | 12q23-24.1 | 25,8 | <i>ung</i> ¹⁾ , <i>ung1</i> ²⁾ | uracyl i jego analogi 5-formylouracyl |
| glikozylaza formylouracylowa ^{b)} | | | | | 5-metylocytozyna |
| glikozylaza 5-metylocytozynowa | <i>AAG/MPG</i> | 16pter-13.3 | 32,9 (298) | <i>tag</i> ¹⁾ , <i>alkA</i> ¹⁾ , <i>mag</i> ²⁾ | 3-metylopuryny, 7-metylopuryny, pewne etylowane zasady, addukty cykliczne |
| glikozylaza 3-metyloadeninowa/alkilowanych zasad azotowych | <i>NTHL1/OCTS3</i> | 16q13.2-13.3 | 34,3 (312) | <i>nth</i> ^{1),d)} , <i>ntg1</i> ²⁾ | puryn pochodne puryn powstałe w wyniku oksydacyjnego nasycenia pierścienia oraz jego fragmentacji, np. glikol tyminy, mocznik |
| glikozylaza usuwająca utlenione pirymidyny ^{b)} | | | | | 7,8-dihydro-8-oksoguanina, wykazuje aktywność deoksurybofosfodiesterazy |
| glikozylaza FaPy/usuwająca utlenione puryny ^{b)} | <i>OGG1/hMMH1</i> | 3p26.2 | 47 (424) | <i>uitM(fpg)</i> ^{1),c),e)} , <i>ogg1</i> ²⁾ , <i>ogg2</i> ²⁾ | adenina sparowana z guanina, 8-oksoguaniną i cytozyną |
| glikozylaza usuwająca niesparowania adeniny ^{b)} | <i>MYH</i> | | 46 (410) | <i>mutY</i> ¹⁾ | tymina sparowana z guaniną, uracyl sparowany z guaniną |
| glikozylaza usuwająca niesparowania tyminy | <i>TDG</i> | 12q24.1 | | <i>mug</i> ¹⁾ | |
| Inne enzymy^{a)} | | | | | |
| endonukleaza AP | <i>HAP1/APEX APE/Ref-1</i> | 14q12 | 35,5 (318) | <i>xth</i> ^{1),f)} | miejsca AP, produkty rozpadu deoksyrybozy blokujące pozycję 3' sąsiedniego nukleotydu, niektóre zmodyfikowane nukleotydy |

^{a)} egzonukleazę FEN-1, XRCC1, polimerazy DNA, PCNA, RFC i ligazy DNA przedstawiono w tabeli 6, ^{b)} glikozylazy DNA z dodatkową aktywnością liazy AP, ^{c)} glikozylazy DNA wykazujące również zdolność do przeprowadzania reakcji β,β -eliminacji, czyli wycięcia deoksurybozy z równoczesnym wprowadzeniem w jej obręb dwóch wiązań podwójnych, ^{d)} koduje endonukleazę III, ^{e)} koduje białko Fpg, czyli glikozylazę formylpirymidynową, ^{f)} koduje egzonukleazę III

opisano inne właściwości tego białka. Endonukleaza HAP-1 redukuje specyficzne pozycje cysteinowe czynnika transkrypcyjnego AP-1 [55], dzięki czemu aktywuje wiązanie kompleksu Fos-Jun do DNA i uczestniczy w przekształcaniu sygnału komórkowego związanego ze stresem oksydacyjnym.

2.3. Końcowe etapy naprawy przez wycinanie zasad azotowych

Końcowe etapy naprawy uszkodzeń obejmują usunięcie grupy 5-deoksyfosforanowej (dRp) utworzonej przez endonukleazę 5'-AP oraz uzupełnienie powstałej luki w nici DNA brakującym nukleotydem. Wycięcia pozostałej grupy dokonują enzymy wykazujące aktywność deoksyrybofosfodiesterazy: polimeraza DNA deoksyrybofosfodiesterazą transferazy nukleotydu, wykazuje również właściwości liazy dRp zlokalizowane w małej N-terminalnej domenie enzymu odpowiedzialnego za usuwanie dRp [31] oraz najprawdopodobniej glikozylaza DNA FaPy (OGG1) [37, 39, 41]. Polimeraza DNA może także oddziaływać z endonukleazą AP [4].

Szlak podstawowy. Proces naprawy przez wycinanie obejmuje zwykle zastąpienie pojedynczego uszkodzonego nukleotydu jego prawidłowym odpowiednikiem, jednakże istnieje drugi szlak naprawy, w którym następuje wprowadzenie w miejscu uszkodzenia 2–10 nukleotydów (rys. 2). Jednonukleotydoma przerwa w nici DNA utworzona przez białka mające właściwości dRpazy lub liazy dRp zostaje wypełniona przez polimerazę DNA β i ligazę DNA III α . W procesie tym bierze udział białko XRCC1. Oddziałuje ono za pośrednictwem części N-końcowej z polimerazą DNA β , natomiast część C-końcowa oddziałuje z ligazą DNA III α [28]. Polimeraza DNA β może także oddziaływać z ligazą DNA I [36].

Szlak alternatywny. Końcowe etapy naprawy DNA przez wycinanie zasad azotowych mogą się także odbywać zgodnie z alternatywnym mechanizmem. W szlaku tym polimerazy DNA β , δ lub ϵ podczas wypełniania luki poruszają się w kierunku 5'→3' w stosunku do wcześniej usuniętego nukleotydu, w wyniku czego powstaje zewnętrzny jednoniciowy DNA, który następnie zostaje usunięta przez enzym DNazę IV (endonukleazę FEN-1) [12]. Białko FEN-1 wykazuje podobieństwo sekwencji aminokwasowej do domeny egzokuleolitycznej 5'→3' polimeraz prokariotycznych i poza uczestnictwem w naprawie DNA pełni również funkcje w syntezie nici opóźnionej DNA podczas replikacji. Alternatywny szlak naprawy wymaga antygeny jądrowego komórek proliferujących (PCNA), co sugeruje udział polimeraz DNA δ i ϵ [14], jednakże ich uczestnictwo w tym rodzaju naprawy budzi wątpliwości, ponieważ PCNA stymuluje także DNazę IV [20].

3. NAPRAWA PRZEZ WYCINANIE NUKLEOTYDÓW

Naprawa DNA przez wycinanie nukleotydów przebiega w dwóch głównych etapach: (i) rozpoznanie i wycięcie uszkodzonego nukleotydu oraz (ii) synteza na-

prawcza nowej nici DNA na matrycy nici komplementarnej i połączenie fragmentów naprawianej nici w wyniku reakcji ligacji. Wyróżnia się dwa szlaki naprawy: podstawowy, w którym uszkodzenia są rozpoznawane przez składniki systemu naprawy, a następnie przez niego naprawiane, a także alternatywny, który zachodzi jako konsekwencja zablokowania transkrypcji.

System naprawy przez wycinanie bierze udział w usuwaniu większości uszkodzeń DNA. Poza fotoproduktami może on usuwać także addukty powstałe po przyłączeniu pochodnych psoralenu do pirymidyn, pochodnych policyklicznych węglowodorów aromatycznych, związków platyny oraz produkty oddziaływania acetyloaminofluorenu z guaniną. *In vitro* substratami są także miejsca AP, O^6 -metyloguanina, N^6 -metyloadenina i błędnie sparowane zasady azotowe [21]. Szybkość usuwania poszczególnych rodzajów uszkodzeń DNA zależy od wywoływanych przez nie zmian w drugorzędowej strukturze DNA. Główny rodzaj uszkodzenia powodowanego przez promieniowanie ultrafioletowe, cyklobutanowe dimery pirymidynowe są usuwane 5–10 razy wolniej w porównaniu z rzadziej występującymi (6–4) fotoproduktami [50], wywołującymi większe zniekształcenia podwójnej helisy DNA [26].

W przypadku wielu defektów naprawy przez wycinanie obserwuje się zwiększoną zachorowalność na nowotwory oraz liczne inne zaburzenia, takie jak: zahamowanie wzrostu i karłowatość, postępujące zwyrodnienie układu nerwowego, opóźnienie umysłowe, zanik wzroku, zmiany skórne. U pacjentów chorych na *xeroderma pigmentosum* (XP) stwierdzono, że częstość występowania raka skóry jest około 1000-krotnie większa niż w pozostałej części populacji [27]. Defekty tego systemu naprawy u ludzi związane są także z innymi zaburzeniami chorobowymi, takimi jak trichotiodystrofia (TTD), syndrom Cockayne'a (CS). W obrębie każdej z jednostek chorobowych wyróżnić można grupy komplementacyjne: od XPA do XPG, od TTD1 do TTD3 i od CSA do CSB. Ponadto u gryzoni zidentyfikowano kilka genów, których mutacje są przyczyną niedoboru naprawy, między innymi geny *ERCC1-6*.

Eukariotyczne białka systemu naprawy przez wycinanie wykazują duży stopień homologii międzygatunkowej. W tabeli 3 przedstawiono białka występujące u człowieka i innych ssaków oraz ich odpowiedniki u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. U prokariotów i *Archea* również istnieją systemy naprawy przez wycinanie, jednakże różnią się one od tych występujących u eukariotów. U *Escherichia coli* funkcje tego systemu pełnią białka *uvrA*, *uvrB* i *uvrC*.

3.1. Szlak podstawowy naprawy przez wycinanie nukleotydów

Szlak podstawowy naprawy przez wycinanie nukleotydów rozpoczyna się od związania się z miejscem uszkodzenia w DNA białka XPA, a często także XPC/hHR23B (rys. 3). XPA jest białkiem, które wiąże się z DNA przez 122-

TABELA 3. Białka człowieka uczestniczące w naprawie DNA przez wycinanie nukleotydów^{a)}, w tabeli podano także geny kodujące homologiczne białka u *Saccharomyces cerevisiae*

| Białko/podjednostka | Gen | Lokalizacja w genomie | M. cz. [kDa] (liczba aminokwasów) | Gen <i>S. cerevisiae</i> | Funkcja |
|---------------------|--|---|--|---|--|
| XPA | XPA | 9q23.3-3.1 | 31 (247) | <i>rad14</i> | preferencyjnie wiąże uszkodzony i jednoniciowy DNA |
| RPA | RPA1 RPA2 RPA3 | 17p13.1 1p35-36.1 7p22-21 | 70 (616) 32 (270) 14 (121) | <i>rfa1</i> <i>rfa2</i> <i>rfa3</i> | 3-podjednostkowe białko wiążące DNA jednoniciowy; wiąże się do XPA |
| XPC | XPC | 3p25 | 106(823) | <i>rad4</i> | preferencyjnie wiąże się do uszkodzonego i jednoniciowego DNA; białko nie jest wymagane w szlaku naprawy DNA sprzężonym z transkrypcją ^{b)} |
| hHR23B | <i>hHR23B</i> | 3p25.1 | 43 | <i>rad23</i> | wiąże się do XPC i stymuluje aktywność |
| XPE | XPE | 11p12-11 | -160 | | wiąże się do uszkodzeń DNA ^{b)} |
| DDB1 | DDB1 | 11q12-13 | 127 (1140) | | tworzy wraz z DDB2 białko heterodimerskie DDB oddziałujące z XPE |
| DDB2 | DDB2 | 11p12-11 | 48 (427) | | tworzy wraz z DDB1 białko heterodimerskie DDB oddziałujące z XPE |
| TFIIH | XPB (ERCC3) XPD (ERCC2) p6 2 (GTF2H1) p4 4 (GTF2H2) p3 4 (GTF2H3) p52(GTF2H4) | 2q21 19q13.2-13.3 11p15.1-14 5q12.2-13.3 6p21.3 | 89 (782) 87 (760) 62 (548) 44,5 (395) 33,9 (303) 52 (462) | <i>ssl2 (rad25)</i> <i>rad3</i> <i>ffb1</i> <i>ssl1</i> <i>ffb2</i> | helikaza DNA 3'-5' helikaza DNA 5'-3' |
| XPG (ERCC5) | XPG | 13q33 | 131 (1170) | <i>rad2</i> | endonukleaza DNA przecinająca DNA po stronie 3' w stosunku do uszkodzenia |
| ERCC1 | ERCC1 | 19q13.2-13.3 | 32,6 (297) | <i>rad10</i> | podjednostka endonukleazy przecinającej DNA po stronie 5' w stosunku do uszkodzenia |
| XPF (ERCC4) | XPF | 16p13.3-13.13 | 104 (905) | <i>rad1</i> | podjednostka endonukleazy przecinającej DNA po stronie 5' w stosunku do uszkodzenia |
| CSA | CSA | 5 | 44 (396) | <i>rad28</i> | bierze udział w szlaku naprawy DNAsprzężonym z transkrypcją |
| CSB (ERCC6) | CSB | 10q11-21 | 168 (1493) | <i>rad26</i> | bierze udział w szlaku naprawy DNA sprzężonym z transkrypcją |

^{a)} polimerazy DNA, RFC, PCNA i ligazy DNA przedstawiono w tabeli 6; ^{b)} nie jest wymagane przy naprawie wszystkich uszkodzeń w szlaku podstawowym naprawy

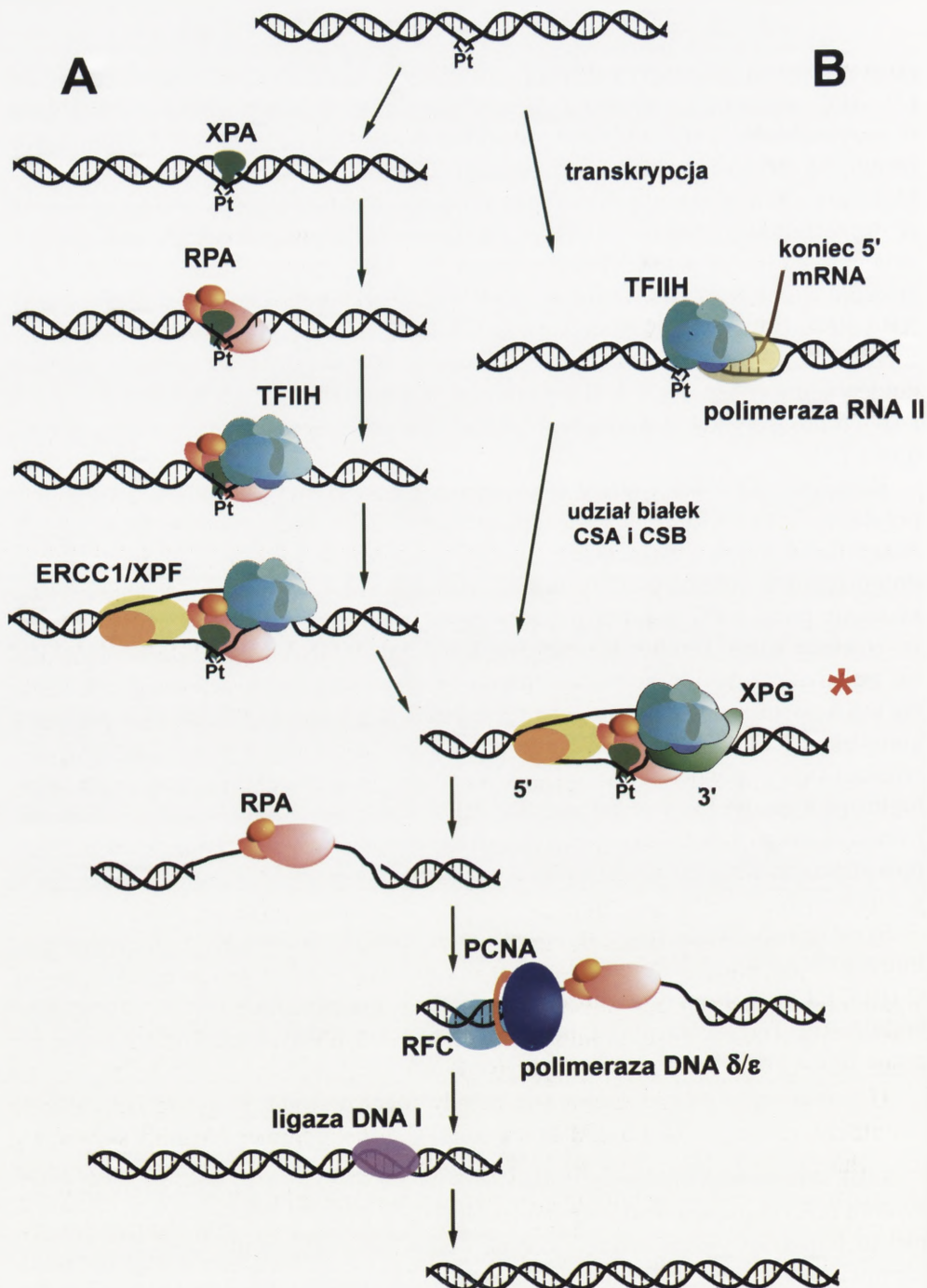
aminokwasową domenę rdzeniową zawierającą motyw palca cynkowego C_4 -Zn [7]. XPC wiąże się po stronie 3' w stosunku do uszkodzenia i nie jest wymagane w przypadkach, kiedy struktura podwójnej helisy DNA uległa poważnemu zaburzeniu, np. w wyniku powstania adduktu. Obecność XPC aktywuje naprawę cyklobutanowych dimerów pirymidynowych powodujących stosunkowo małe zmiany w drugorzędowej strukturze DNA [38]. Innym białkiem pomocniczym odpowiedzialnym za ten etap jest XPE. Związanie się XPA do uszkodzenia ułatwia przyłączenie się białka replikacyjnego A (RPA), w wyniku czego powstaje kompleks XPA-RPA-DNA. Miejsce przylegania heterotrimerycznego białka RPA do DNA wyznacza zawierająca uszkodzenie sekwencję 30-nukleotydową, obejmującą 3–9 nukleotydów położonych w kierunku 3' w stosunku do miejsca modyfikacji DNA i 16–25 nukleotydów w kierunku 5', która następnie zostanie wycięta i zastąpiona nową [32].

Kompleks XPA-RPA-DNA wiąże czynnik transkrypcyjny TFIIF, a następnie przyłącza XPG i ERCC1/XPF. Helikazy XPB i XPD, będące składnikami TFIIF, dokonują lokalnego rozwinięcia helisy DNA przy udziale ATP [8]. Taka modyfikacja drugorzędowej struktury DNA ułatwia przecięcie nici zarówno po stronie 3' uszkodzenia przez XPG, jak i po przeciwległej stronie przez kompleks ERCC1/XPF ze względu na to, że obydwie endonukleazy trawią DNA w miejscach zetknięcia się pojedynczej nici z podwójną helisą. W pierwszej kolejności przecinana jest nieć DNA po stronie 3' uszkodzenia, przy czym do aktywności XPG nie jest wymagany kompleks ERCC1/XPF [33]. Wyniki niektórych badań wskazują na obecność niewielkiej ilości strawionych nici DNA po stronie 5' uszkodzenia, przy braku analogicznych modyfikacji po stronie 3' [32]. Ostatecznie 30-nukleotydowy odcinek jednoniciowego DNA wraz z częścią białek kompleksu ulega rozłączeniu z DNA pozostawiając RPA związane z drugą nicią w miejscu wycięcia uszkodzonego oligonukleotydu.

Syntezę naprawczą DNA przeprowadza kompleks replikacyjny złożony z polimeraz DNA δ i/lub ϵ połączonych z kofaktorami: PCNA i czynnikiem replikacyjnym C (RFC). Oba kofaktory uczestniczą w inicjacji syntezy DNA [9]. Po utworzeniu brakującego fragmentu w obrębie naprawianej nici DNA końce nici łączone są przez ligazę, najprawdopodobniej ligazę DNA I [1].

3.2. Szlak sprzężony z transkrypcją

Szlak sprzężony z transkrypcją bierze udział w naprawie uszkodzeń, które blokują syntezę mRNA przeprowadzaną przez polimerazę RNA II. Po zablokowaniu kompleksu transkrypcyjnego wiąże się z nim XPA oraz inne białka uczestniczące w naprawie DNA przez wycinanie nukleotydów. Mechanizm naprawy DNA w szlaku sprzężonym z transkrypcją jest stosunkowo słabo poznany, jednakże wiadomo, że zamiast XPC biorą w nim udział białka CSA i CSB. Białko CSB jest homologiczne



RYSUNEK 3. Przebieg naprawy przez wycinanie nukleotydów; A – szlak podstawowy, B – szlak sprzężony z transkrypcją, * – w szlaku sprzężonym z transkrypcją nie uczestniczy białko XPA

do motywu helikazy konserwatywnej rodziny aktywatorów przekształcania strukturalnego chromatyny podczas transkrypcji, SNF/SW1 [18]. U drożdży holoenzym polimerazy RNA II zawiera stechiometryczne ilości SNF/SW1, kompleksu polipeptydów rozkładających nukleosomy. Aktywność kompleksu SNF/SW1 objawiająca się destabilizowaniem nukleosomów ułatwia wiązanie wielu czynników podczas inicjacji transkrypcji. Przez analogię białko CSB umożliwia białkom naprawczym dostęp do DNA dzięki modyfikowaniu struktury chromatyny. Szlak naprawy sprzężony z transkrypcją jest specyficzny w stosunku do uszkodzeń, takich jak glikol tyminy, znajdujących się w obrębie genów aktywnych transkrypcyjnie na nici stanowiącej matrycę w procesie syntezy mRNA [34].

4. NAPRAWA BŁĘDNIE SPAROWANYCH ZASAD AZOTOWYCH

System naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych bierze udział w usuwaniu błędów replikacyjnych, nie naprawionych przez polimerazy DNA podczas replikacji, błędów w parowaniu zasad powstających podczas rekombinacji DNA, a także w wyniku działania niektórych związków chemicznych. Mutacje w kilku genach kodujących elementy systemu naprawy przez wycinanie, takich jak *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* czy *hMSH6* związane są z występowaniem dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego oraz niektórych innych nowotworów. Ponadto u myszy ze zmutowanym genem *Pms2* stwierdzono nieprawidłowości w koniugacji chromosomów w mejozie, co prowadziło do ich niepłodności [3]. Z kolei u myszy z mutacją w genie *Msh5* obserwowano zmniejszenie rozmiarów jąder oraz całkowity zanik jajników [11].

Mechanizm naprawy błędnie sparowanych zasad u eukariontów nie został jeszcze całkowicie poznany. Jednakże jest on bardzo podobny do szlaku opisanego u *Escherichia coli*. Białkami, które są zaangażowane w naprawę u bakterii są: MutS, MutH, MutL, egzonukleaza VII, egzonukleaza I, helikaza II, białka SSB, polimeraza DNA III oraz ligaza. U człowieka, poza nukleazą FEN-1, polimerazami DNA i ligazami, wśród białek uczestniczących w tym systemie naprawy opisano homologi dwóch białek bakteryjnych: MutS (*hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH4*, *hMSH5*, *GTBP*) oraz MutL (*hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*) (tab. 4).

U człowieka błędnie sparowane zasady rozpoznawane są przez heterodimer *hMutSH α* złożony z białek *hMSH2* i *GTBP* lub heterodimer *hMutS β* składający się z *hMSH2* i *hMSH3* (rys. 4) [15]. Następnie do DNA w obszarze wykrytego uszkodzenia przyłącza się kompleks *hMutL α* złożony z białek *hMLH1* i *hPMS2*. Po endonukleolitycznym przecięciu łańcucha fosfodiesterowego w pobliżu niesparowania następuje egzonukleolityczna degradacja nici DNA przez nukleazę FEN-1 aktywowaną przez PCNA. Powstałą lukę wypełniają polimerazy DNA δ i ϵ i ligaza DNA I [30].

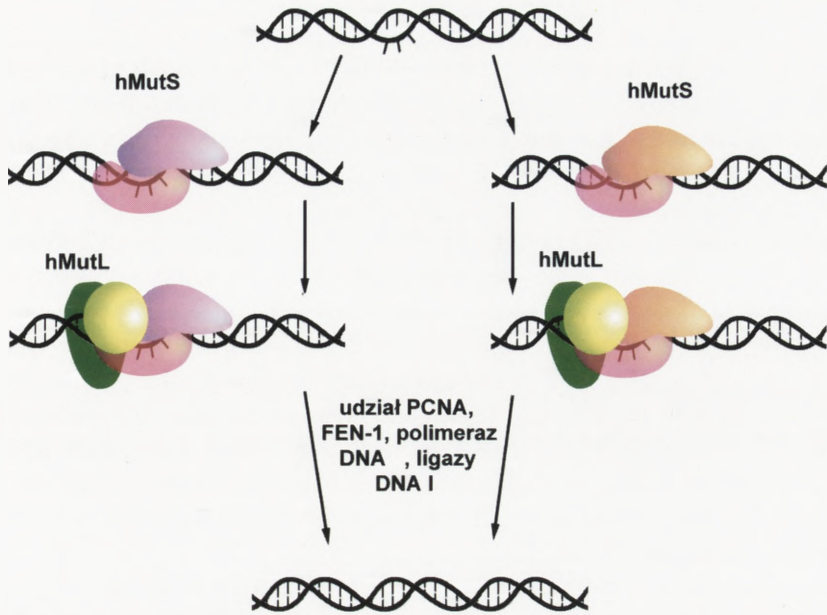
TABELA 4. Ludzkie białka i geny systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych^{a)}, w tabeli podano także geny kodujące homologiczne białka u *Escherichia coli*

| Białko | Gen | Lokalizacja w genomie | M. cz. [kDa] (<i>liczba aminokwasów</i>) | Gen <i>Escherichia coli</i> | Funkcja |
|--------------|--------------|-----------------------|--|-----------------------------|---|
| hMSH2 (FCC2) | <i>hMSH2</i> | 2p22-21 | 105 (934) | <i>mutS</i> | tworzy kompleksy hMutS α i hMutS β rozpoznające uszkodzenia DNA |
| hMSH3 | <i>hMSH3</i> | 5q11-12 | (1137) | <i>mutS</i> | tworzy z hMSH2 heterodimer hMutS β rozpoznający 2–4-nukleotydowe wybrzuszenia powstające podczas poślizgu nici podczas replikacji |
| hMSH4 | <i>hMSH4</i> | 1p31 | (936) | <i>mutS</i> | ? |
| hMSH5 | <i>hMSH5</i> | | (1360) | <i>mutS</i> | ? |
| GTBP (hMSH6) | <i>GTBP</i> | 2p16 | 160 | <i>mutS</i> | tworzy z hMSH2 heterodimer hMutS α wiążący się do par G:T |
| p200 | | | 200 | | wiąże się z parami G:T, udział w naprawie błędnie sparowanych zasad nie jest pewny |
| hMLH1(FCC2) | <i>hMLH1</i> | 3p23-21.3 | 84,6 (756) | <i>mutL</i> | tworzy razem z hPMS2 dimer hMutL α |
| hPMS1 | <i>hPMS1</i> | 2q31-33 | (932) | <i>mutL</i> | ? |
| hPMS2 | <i>hPMS2</i> | 7p22 | 110 (862) | <i>mutL</i> | tworzy razem z hMLH1 dimer hMutL α |

^{a)}nukleazę FEN-1, polimerazy DNA, RFC, PCNA i ligazy DNA przedstawiono w tabeli 6

5. NAPRAWA PRZEZ REKOMBINACJĘ

System ten bierze udział w naprawie pęknięć dwuniciowych. Niekompletna naprawa takich uszkodzeń mogą prowadzić do utraty części chromosomów oraz innych aberracji. U eukariontów wyróżnia się trzy szlaki naprawy pęknięć dwuniciowych: rekombinacji homologicznej, dopasowywania pojedynczych nici DNA oraz rekombinacji niehomologicznej (mechanizm zależny od DNA-PK) [23, 51]. U różnych grup systematycznych przeważa jeden ze sposobów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA – u ssaków naprawa przez rekombinację zależną od DNA-PK, natomiast u *Saccharomyces cerevisiae* przez rekombinację homologiczną. U ssaków stwierdzono również, że w zależności od pozycji w cyklu komórkowym dominują różne mechanizmy naprawy. O ile podczas faz G₁ i wczesnej S przeważa rekombinacja niehomologiczna, to podczas faz późnej S i G₂ większą rolę odgrywa rekombinacja



RYSUNEK 4. Przebieg naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych

homologiczna [45]. Poniżej przedstawione szlaki nie zostały jeszcze dokładnie poznane i przedstawione mechanizmy mają charakter czysto hipotetyczny.

Rekombinacja homologiczna. Jest efektywnym i charakteryzującym się dużą wiernością szlakiem naprawy pęknięć dwuniciowych wykorzystującym do odtworzenia struktury chromosomu jego nieuszkodzony homolog. W pierwszym etapie, po rozpoznaniu przez system naprawczy fragmentu DNA powstałego w wyniku pęknięcia dwuniciowego, jedna z jego nici jest trawiona przez egzonukleazy do wytworzenia jednociowego odcinka zawierającego wolny koniec 3', który następnie jest łączony z nieuszkodzonym chromosomem homologicznym. Na podstawie informacji zawartej w nieuszkodzonym DNA zostaje odtworzony przebieg naprawianej części. U drożdży opisano szereg genów kodujących białka zaangażowane w naprawę podwójnych pęknięć: *rfa1-3* (tab. 3), *rad50-57*, *rad59*, *xrs2*, *mre11* (tab. 5). Homologiczne białka i geny człowieka przedstawiono w tabelach 3 i 5 [35].

Rekombinacja homologiczna, podobnie jak poniżej opisany szlak naprawy przez dopasowywanie pojedynczych nici DNA, jest zapoczątkowywana przez przyłączenie się do końców DNA białka RAD52 oraz najprawdopodobniej MRE11/RAD50 składającego się z 5 podjednostek (tab. 5), co ostatecznie prowadzi do utworzenia dwuniciowych części DNA zakończonych jednociowymi odcinkami tworzącymi kompleksy z RAD52. RAD52 najprawdopodobniej pełni bezpośrednią kontrolę nad egzonukleolityczną aktywnością MRE11/RAD50 [51]. RAD52 odgrywa również

ważną rolę w tworzeniu kompleksu rekombinacyjnego RAD52/RAD51/RPA. Ma ono bowiem domeny oddziałujące z podjednostką RPA2 białka RPA, wiążącego jednoniciowy DNA oraz z czynnikiem RAD51, odpowiedzialnym za wymianę nici pochodzącej z uszkodzonego DNA z homologicznym nieuszkodzonym DNA [33a, 56].

Dopasowywanie pojedynczych nici DNA. Białka naprawcze tego szlaku wykorzystują krótkie sekwencje powtórzone znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie pęknięcia do wzajemnego dopasowania jednoniciowych końców dwóch fragmentów DNA, a następnie do ich połączenia. Nici niehomologicznych odcinków DNA pomiędzy pęknięciami i sekwencjami powtórzonymi mające w obrębie pęknięcia koniec 3' są przemieszczane poza helisę, a następnie usuwane najprawdopodobniej przez kompleks nukleolityczny ERCC1/XP-F biorący także udział w naprawie przez wycinanie nukleotydów (tab. 3). Opisywany szlak naprawy charakteryzuje się zatem małą wiernością ze względu na to, że sekwencje pomiędzy pęknięciem i jednostką powtórzoną są tracone [5, 23, 51, 54].

Rekombinacja niehomologiczna. Najlepiej poznanym składnikiem biorącym udział w rekombinacji niehomologicznej jest kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-PK; tab. 5). Uaktywnia się ona po przyłączeniu do końca dwuniciowej cząsteczki DNA. W skład enzymu wchodzi podjednostki Ku i DNA-PK_{CS}. Ku wiąże się do końców DNA, ma właściwości helikazy zależnej od ATP, odgrywa także najprawdopodobniej rolę we wzajemnym orientowaniu się dwóch fragmentów DNA podczas ligacji. DNA-PK_{CS}, po związaniu się do kompleksu Ku/DNA, fosforyluje *in vitro* takie białka, jak: p53, polimerazę RNA II, czynniki transkrypcyjne, a także przeprowadza autofosforylację wszystkich podjednostek DNA-PK [6, 24]. Niewykluczone, że podjednostki DNA-PK stanowią zrab strukturalny, wokół którego gromadzą się inne czynniki uczestniczące w naprawie pęknięcia helisy DNA, np. homologi drożdżowych białek Sir2p, 3p i 4p, modulujących strukturę chromatyny w pobliżu pęknięcia cząsteczki DNA. Ku i DNA-PK_{CS} odgrywają również pewną rolę w rekombinacji V(D)J [23a]. Innym białkiem, które uczestniczy w rekombinacji niehomologicznej jest XRCC4. Jego funkcje nie zostały jeszcze bliżej określone, jednakże wiadomo, że oddziałuje ono z ligazą IV [13] i Ku.

6. UDZIAŁ POLIMERAZ I LIGAZ DNA W SYSTEMACH NAPRAWCZYCH

Polimerazy i ligazy DNA są grupą enzymów, które uczestniczą we wszystkich systemach naprawy DNA związanych z usuwaniem nukleotydów z uszkodzonych obszarów DNA. Obecnie znanych jest pięć polimeraz DNA występujących u ssaków – cztery jądrowe: α , β , δ , ϵ oraz mitochondrialna γ . Jedynym jądrowym enzymem

TABELA 5. Białka człowieka biorące udział w naprawie DNA przez rekombinację^{a)}; w tabeli podano także geny kodujące homologiczne białka u *Saccharomyces cerevisiae*

| Białko/ podjednostka | Gen | Lokalizacja w genomie | M. cz. [kDa] (liczba amino- kwasów) | Gen <i>S. cere- visiae</i> | Udział w naprawie DNA przez | | |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---|-----------------------------------|--|--|--|
| | | | | | rekombi- nację homolo- giczną | dopaso- wywanie pojedyn- czych nici DNA | rekombi- nację nie homolo- giczną |
| RAD51 (RAD51A) ^{b)} | <i>RAD51</i> (<i>RAD51A</i>) | 15q15.1 | 37,0(339) | <i>rad51</i> | + | | |
| RAD51B ^{b)} | <i>RAD51B</i> (<i>RAD51L1</i>) | 14q23.3-24.1 | (350) | <i>rad51</i> | + | | |
| RAD51C ^{b)} | <i>RAD51C</i> | 17q | (376) | <i>rad51</i> | + | | |
| XRCC2 ^{b)} | <i>XRCC2</i> | 7q36.1 | (280) | <i>rad51</i> | + | | |
| XRCC3 ^{b)} | <i>XRCC3</i> | 14q32.3 | | <i>rad51</i> | + | | |
| RAD52 | <i>RAD52</i> | 12p13-12.2 | (418) | <i>rad52</i> | + | | |
| RAD54 | <i>RAD54</i> | | | <i>rad54</i> | + | | |
| PIR51 | <i>PIR51</i> | 15p13.2-13.1 | (335) | | + | | |
| UBL1 | <i>UBL1</i> | 2q32.2-33 | (101) | | + | | |
| MRE11/RAD50 | | | | | | | |
| RAD50 | <i>RAD50</i> | | | <i>rad50</i> | + | + | + |
| MRE11 | <i>MRE11</i> | 11q21 | (680) | <i>mre11</i> | + | + | + |
| p95 | <i>NBS1</i> ^{c)} | 8q21 | (754) | <i>xrs2</i> | + | + | + |
| p200 | | | | | + | + | + |
| p400 | | | | | + | + | + |
| XRCC4 | <i>XRCC4</i> | 5q13-14 | (334) | | | | + |
| DNA-PK: | | | | | | | |
| Ku | | | | | | | |
| Ku80 | <i>XRCC5</i> (<i>Ku80</i>) | 2q35 | 80(732) | | | | + |
| Ku70 | <i>XRCC6</i> (<i>Ku70</i>) | 22q11-13 | 70(609) | | | | + |
| DNA-PK _{cs} | <i>XRCC7</i> ^{d)} | 8q114 | 60(4127) | | | | + |

^{a)} polimerazy DNA, RFC, PCNA i ligazy DNA przedstawiono w tabeli 6; białka ERCC1, XP-F i RPA omówiono w tabeli 3; ^{b)} homolog bakteryjnego białka RecA; ^{c)} defekt w genie *NBS1* występuje w syndromie pęknięć Nijmegen (NBS); ^{d)} defekt w genie *XRCC7* występuje w syndromie SCID (zespolo poważnego niedoboru odporności)

odpowiedzialnym za syntezę DNA, który jednocześnie nie uczestniczy w jego naprawie, jest polimeraza DNA α . W przypadku trzech wśród pięciu znanych ligaz DNA stwierdzono ich udział w procesach usuwania uszkodzeń. W tabeli 6 przedstawiono polimerazy i ligazy DNA oraz białka pomocnicze biorące udział w naprawie DNA.

Jednonukleotydomowa przerwa w nici DNA wytworzona podczas pierwszych etapów naprawy przez wycinanie zasad azotowych zostaje wypełniona przez polimerazę DNA β i ligazę DNA III α . Pewną rolę w tym procesie odgrywa również białko XRCC1. Oddziałuje ono za pośrednictwem części N-końcowej z polimerazą DNA β , natomiast częścią C-końcową z ligazą DNA III α [28]. W ekstraktach komórkowych wykazujących się brakiem XRCC1 obserwuje się przemieszczenie części nici DNA poza obszar helisy i nadmierne wypełnianie przerw. Polimeraza DNA β może też współdziałać w systemie naprawy przez wycinanie zasad azotowych z ligazą DNA I [36].

Polimerazy DNA δ i/lub ϵ wraz z ich kofaktorami: PCNA i czynnikiem replikacyjnym C (RFC) biorą udział w syntezie naprawczej większości znanych systemów usuwania uszkodzeń DNA (tab. 6). Oba kofaktory uczestniczą w inicjacji syntezy DNA. RFC umieszcza PCNA na matrycy DNA w sposób zależny od ATP, PCNA z kolei zakotwicza koniec 3' nici DNA, z którym następnie może się związać polimeraza DNA [9]. Po syntezie brakującego fragmentu w obrębie naprawianej nici DNA, końce nici są łączone przez ligazę I [1].

Polimerazy DNA podczas replikacji niejednokrotnie napotykają uszkodzenia na niciach pełniących funkcję matryc. W takich przypadkach enzymy wbudowują na przeciw zmienionego miejsca połączenia omijające. Na przykład polimeraza DNA δ z grasicy cieleccej wbudowuje zasady naprzeciw 30% cyklobutanowych dimerów pirymidynowych w reakcji promowanej przez PCNA. W przypadku uszkodzonych zasad zmienionych lub uszkodzonych takie połączenia omijające mogą być mutagenne. Polimeraza β grasicy jest zdolna do tworzenia połączeń omijających na przeciw adduktów tworzonych przez cisplatynę w procesie wysoce mutagennym, w którym zachodzą pojedyncze delecje nukleotydów [19].

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach dokonał się znaczny postęp w poznaniu mechanizmów naprawy DNA. Dzięki możliwości szybkiego sekwencjonowania oraz analizy sekwencji DNA pochodzących od różnych organizmów stało się możliwe wykrycie i poznanie struktury oraz funkcji wielu białek systemu naprawy ssaków. Wiedza o tych procesach, ich regulacji oraz o różnych czynnikach wpływających na ich aktywność i wydajność pozwoli w przyszłości na skuteczniejsze zapobieganie wielu chorobom związanym z niedostateczną naprawą uszkodzeń DNA, prowadzącą w konsekwencji do mutacji, niestabilności genomu oraz chorób nowotworowych. Z drugiej strony

TABELA 6. Polimerazy DNA, ligazy DNA oraz białka pomocnicze człowieka biorące udział w naprawie DNA; w tabeli podano także geny kodujące homologiczne białka u *Saccharomyces cerevisiae*

| Białko/ podjednostka | Gen | Lokalizacja w genomie | M. cz. [kDa] | Gen S. (liczba ami- no- kwa- sów) | Udział w systemie naprawy: | | | |
|---|--------------|--------------------------|-----------------|---|-----------------------------------|---|---|---|
| | | | | | przez wyci- nianie zasad | przez wyci- nianie nukle- oty- dów | błęd- nie sparo- nych zasad | przez reko- mbi- nację ^{a)} |
| FEN-1/DNaza IV | <i>FEN1</i> | 11q12 | 42,6 (380) | | + | | + | |
| XRCC1 | <i>XRCC1</i> | 19q13.2 | ~69 (633) | | + | | | |
| PCNA | <i>PCNA</i> | 20p12 | 29 (261) | <i>pol30</i> | + | + | + | |
| RFC | | | | | | | | |
| RFC140(RFC1) | <i>RFC1</i> | 4p14-13 | 130 (1148) | <i>cdc44</i> | + | + | + | |
| RFC40(RFC2) | <i>RFC2</i> | 7q11.23 | 39 | <i>scrfc4</i> | + | + | + | |
| RFC38(RFC3) | <i>RFC3</i> | 13q12.3-13 | 41 | <i>scrfc5</i> | + | + | + | |
| RFC37(RFC4) | <i>RFC4</i> | 3q27 | 39,7 (363) | <i>scrfc2</i> | + | + | + | |
| RFC36(RFC5) | <i>RFC5</i> | 12q24.2-24.3 | 39 | <i>scrfc3</i> | + | + | + | |
| polimeraza DNA, β^b | <i>POLB</i> | 8p12-11 | 38,1 (335) | <i>pol4</i> | + | | | |
| polimeraza DNA δ^b katalityczna | <i>POLD1</i> | 19q13.3-13.4 | 124 (1107) | <i>pol3</i> | + | + | + | |
| mała | <i>POLD2</i> | | 51,3 (469) | | + | + | + | |
| polimeraza DNA ϵ katalityczna | <i>POLE</i> | 12q24.3 | 261 (2285) | <i>pol2</i> | + | + | + | |
| mała | <i>DPE2</i> | 14q13-q21 | 59 (526) | | + | + | + | |
| ligaza DNA I | <i>LIG1</i> | 19q13.2-13.3 | 125 (919) | <i>cdc9</i> | + | + | + | + |
| ligaza DNA III α | <i>LIG3</i> | 17 | 103 (922) | brak? | + | | | |
| ligaza DNA IV | <i>LIG4</i> | 13q22-34 | 96 (817) | brak? | | | | + |

^{a)} białka wymienione w tabeli mogą brać udział również w naprawie rekombinacyjnej, jednakże brak jest na ten temat danych; ^{b)} wstawia nukleotyd do syntetyzowanej nici, gdy na matrycy DNA wystąpi uszkodzenie

mutacje związane z genami naprawy, zwłaszcza ich zwielokrotnienie w komórkach rakowych przyczyniają się do nieskuteczności chemoterapii nowotworów. Pogłębienie wiedzy o funkcjonowaniu systemów naprawy DNA u człowieka może pozwolić na opracowanie nowych leków przeciwnowotworowych, a zwłaszcza inhibitorów enzymów naprawy odpowiedzialnych za oporność niektórych rodzajów nowotworów na leczenie.

LITERATURA

- [1] ABOUSSEKHRA A, BIGGERSTAFF M, SHIVJI MKK, VILPO JA, MONCOLLIN V, PODUST VN, PROTIC VN, HUBSCHER U, EGLY JM, WOOD RD. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 1995; **80**: 859–868.
- [2] ASPINWALL R, ROTHWELL DG, ROLDAN-ARJONA T, ANSELMINO C, WARD CJ, CHEADLE JP, SAMPSON JR, LINDAHL T, HARRIS PC, HICKSON ID. Cloning and characterisation of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; **94**: 109–114.
- [3] BAKER SM, BRONNER CE, ZHANG L, PLUG AW, ROBATZEK M, WARREN G, ELLIOT EA, YU J, ASHLEY T, ARNHEIM N, FLAVELL RA, LISKAY RM. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 1995; **82**: 309–319.
- [4] BENNETT RAO, WILSON III DM, WONG D, DEMPLE B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase- in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7166–7169.
- [5] CARROLL D. Homologous genetic recombination in *Xenopus*: mechanism and implications for gene manipulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996; **54**: 101–125.
- [6] CHAN DW, YE R, VEILLETTE CJ, LEES-MILLER SP. DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* 1999; **38**: 1819–1828.
- [7] CLEAVER JE, STATES JC. The DNA damage-recognition problem in human and other eukaryotic cells: the XPA damage binding protein. *Biochem J* 1997; **328**: 1–12.
- [8] COIN F, MARINONI J-C, RODOLFO C, FRIBOURG S, PEDRINI AM, EGLY JM. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interactions between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nature Genet* 1998; **20**: 184–188.
- [9] CULLMANN G, FIEN K, KOBAYASHI R, STILLMAN B. Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 4661–4671.
- [10] DUCKETT DR, DRUMMOND JT, MURCHIE AI, REARDON JT, SANCAR A, LILLEY DM, MODRICH P. Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 6443–6447.
- [11] JEDELMANN W, COHEN PE, KNEITZ B, WILAND N, LIA M, HEYER J, KOLONDER R, POLLARD JW, KUCHERLAPATIR. Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nature Genet* 1999; **21**: 123–127.
- [12] FRANK G, QIU J, SOMSOUK M, WENG Y, SOMSOUK L, NOLAN JP, SHEN B. Partial functional deficiency of E160D flap endonuclease-1 mutant *in vitro* and *in vivo* is due to defective cleavage of DNA substrates. *J Biol Chem* 1998; **273**: 33064–33072.
- [13] FRANK KM, GEKIGUCHI JM, SEIDL KJ, SWAT W, RATHBUN GA, CHENG HL, DAVIDSON L, KANGALOO L, ALT FW. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature* 1998; **396**: 173–177.

- [14] FROSINA G, FORTINI P, ROSSI O, CARROZZINO F, RASPAGLIO G, COX LS, LANE DP, ABBONDANDOLO A, DOGLIOTTI E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 9573–9578.
- [15] GENSCHEL J, LITTMAN SJ, DRUMMOND JT, MODRICH P. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* 1998; **273**: 19895–19901.
- [16] GERSON SL, PHILLIPS W, KASTAN M, DUMENCO LL, DONOVAN C. Human CD34+ hematopoietic progenitors have low, cytokine-unresponsive O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and are sensitive to O6-benzylguanine plus BCNU. *Blood* 1996; **88**: 1646–1655.
- [17] HANG B, CHENNA A, FRAENKEL-CONRAT H, SINGER B. An unusual mechanism for major human AP endonuclease involving 5' cleavage of DNA containing a benzene-derived exocyclic adduct in the absence of an AP site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 13737–13741.
- [18] HENNING KA, LI L, IYER N, McDANIEL LD, REAGAN MS, LEGERSKI R, SCHULTZ RA, STEFANINI M, LEHMANN AR, MAYNE LV, FRIEDBERG EC. The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CBS protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIF. *Cell* 1995; **82**: 555–564.
- [19] HOFFMANN JS, PILLAIRE MJ, GARCIA e STEFANIA D, LAPALU S, VILLANI G. *In vitro* bypass replication of the cisplatin-d(GpG) lesion by calf thymus DNA polymerase and human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase is highly mutagenic. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15386–15392.
- [20] HOSFIELD DJ, MOL CD, SHEN B, TAINER JA. Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity. *Cell* 1998; **95**: 135–146.
- [21] HUANG JC, HSU DS, KAZANTSEV A, SANCAR A. Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12213–12217.
- [22] IWAKUMA T, SAKUMI K, NAKATSURU Y, KAWATE H, IGARASHI H, SHIRAIISHI A, TSUZUKI T, ISHIKAWA T, SEKIGUCHI M. High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1631–1635.
- [23] JEGGO PA. DNA-PK: at cross-roads of biochemistry and genetics. *Mutat Res* 1997; **384**: 1–14.
- [23a] JEGGO PA. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res* 1998; **150**: S80–S91.
- [24] JIN S, WEAVER DT. Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *EMBO J* 1997; **16**: 6874–6885.
- [25] KATO T Jr, TODO T, AYAKI H, ISHIZAKI K, MORITA T, MITRA S, IKENAGA M. Cloning of a murine DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic Acid Res* 1994; **22**: 4119–4124.
- [26] KIM J-K, PATEL D, CHOI B. Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6–4) adduct in DNA duplex decamers: implications in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol* 1995; **62**: 44–50.
- [27] KRAEMER KH, LEE MM, ANDREWS AD, LAMBERT WC. The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 1018–1021.
- [28] KUBOTA Y, NASH RA, KLUNGLAND A, SCHÄR P, BARNES DE, LINDAHL T. Reconstruction of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 1996; **15**: 6662–6670.
- [29] LAU A, SCHARER OD, SAMSON L, VERDINE GL, ELLENBERGER T. Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. *Cell* 1998; **95**: 249–258.

- [30] LONGLEY MJ, PIERCE AJ, MODRICH P. DNA polymerase α is required for human mismatch repair *in vitro*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10917–10921.
- [31] MATSUMOTO Y, KIM K, KATZ DS, FENG JA. Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry* 1998; **37**: 6456–6464.
- [32] MOGGS JG, YAREMA KJ, ESSIGMANN JM, WOOD RD. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of 1,3-interstrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem* 1996; **271**: 7177–7186.
- [33] MU D, HSU DS, SANCAR A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1996; **271**: 8285–8294.
- [33a] NEW JH, SUGIYAMA T, ZAITSEVA E, KOWALCZYKOWSKI SC. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* 1998; **391**: 407–410.
- [34] NOUSPIKEL T, LALLE P, LEADON SA, COOPER PK, CLARKSON SG. A common mutational pattern in Cockayne syndrome patients from xeroderma pigmentosum group G: implications for second XPG functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3116–3121.
- [35] OMIM – online Mendelian Inheritance in Man (John Hoppkins University), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>.
- [36] PRASAD R, SINGHAL RK, SRIVASTAVA DK, MOLINA JT, TOMPKINSON AE, WILSON SH. Specific interaction of DNA polymerase and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16000–16007.
- [37] PRICE A, LINDAHL T. Enzymatic release of 5-terminal deoxyribose phosphate residues from damaged DNA in human cells. *Biochemistry* 1991; **30**: 8631–8637.
- [38] REARDON JT, MU D, SANCAR A. Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1996; **271**: 19451–19456.
- [39] ROSENQUIST TA, ZHARKOV DO, GROLLMAN AP. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 7429–7434.
- [40] RYOJIM, KATAYAMA H, FUSAMAE H, MATSUDA A, SAKAI F, UTANO H. Repair of DNA damage in a mitochondrial lysate of *Xenopus laevis* oocytes. *Nucleic Acid Res* 1996; **24**: 4057–4062.
- [41] SANDIGURSKY M, YACOUN A, KELLEY MR, XU Y, FRANKLIN WA, DEUTCH WA. The yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) contains a DNA deoxyribophosphodiesterase (dRPase) activity. *Nucleic Acid Res* 1997; **25**: 4557–4561.
- [42] SAGET BM, SHEVELL DE, WALKER GC. Alteration of lysine 178 in the hinge region of the *Escherichia coli* ada protein interferes with activation of ada, but not alka, transcription. *J Bacteriol* 1995; **177**: 1268–1274.
- [43] SAVVA R, McAULEY-HECHT K, BROWN T, PEARL L. The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase. *Nature* 1995; **373**: 487–493.
- [44] SINGER B, HANG B. What structural features determine repair enzyme specificity and mechanism in chemically modified DNA? *Chem Res Toxicol* 1997; **10**: 713–732.
- [45] TAKATA M, SASAKI MS, SONODA E, MORRISON C, HASHIMOTO M, UTSUMI H, YAMAGUCHI-IWAI Y, SHINOHARA A, TAKEDA S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* 1998; **17**: 5497–5508.
- [46] TANO K, DUNN WC, DARROUDI F, SHIOTA S, PRESTON RJ, NATARAJAN AT, MITRA S. Amplification of the DNA repair gene *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase associated with resistance to alkylating drugs in a mammalian cell line. *J Biol Chem* 1997; **272**: 13250–13254.
- [47] TIRANTI V, ROSSI E, RUIZ-CARRILLO A, ROSSI G, ROCCHI M, DIDONATO S, ZUFFARDI O, ZEVIANI M. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TFC6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three

- human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* 1995; **25**, 559–564.
- [48] TODO T, TSUJI H, OTOSHI E, HITOMI K, KIM ST, IKENAGA M. Characterization of a human homolog of (6-4) photolyase. *Mutat Res* 1997; **384**: 195–204.
- [49] TSUZUKI T, SAKUMI K, SHIRAIISHI A, KAWATE H, IGARASHI H, IWAKUMA T, TOMINAGA Y, ZHANG S, SHIMIZU S, ISHIKAWA T i inni. Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 1215–1220.
- [50] TUNG BS, MCGREGOR WG, WANG YC, MAHER VM, McCORMICK JJ. Comparison of the rate of excision of the human HPRT gene of normal and xeroderma pigmentosum variant cells. *Mutat Res* 1996; **362**: 65–74.
- [51] VAN DYCK E, STASIAK AZ, STASIAK A, WEST SC. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 1999; **398**: 728–731.
- [52] Van der SPEK PJ, KOBAYASHI K, BOOTSMAN D, TAKAO M, EKER APM, YASUI A. Cloning, tissue expression, and mapping of a human photolyase homolog with similarity to plant blue-light receptors. *Genomics* 1996; **37**: 177–182.
- [53] von WRONSKI MA, SHIOTA S, TANO K, MITRA K, BIGNER D, BRENT TP. Structural and immunological comparison of indigenous human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase with that encoded by a cloned cDNA. *J Biol Chem* 1991; **266**: 1064–1070.
- [54] WEEDA G, DONKER I, de WIT J, MORREAU H, JANSSENS R, VISSERS CJ, NIGG A, van STEEG H, BOOTSMAN D, HOEIJMAKERS JHJ. Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol* 1997; **7**: 427–439.
- [55] XANTHOUDAKIS S, SMEYNE RJ, WALLACE JD, CURRAN T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 8919–8923.
- [56] YU Z, CHEN J, FORD BN, BRACKLEY ME, GLICKMAN BW. Human DNA repair systems: An overview. *Environ Mol Mutagen* 1999; **33**: 3–20.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 06.04. 1999 r.

Przyjęto: 22.06. 1999 r.

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

e-mail: janusz@biol.uni.lodz.pl

ROLA NEUTROFILI W PATOGENEZIE ZAPALENIA NIEDOKRWIONEGO I REPERFUNDOWANEGO SERCA

INFLAMMATORY ROLE OF NEUTROPHILS IN ISCHEMIC AND REPERFUSED HEART

Elżbieta CZARNOWSKA

Zakład Patologii, Instytut Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie

Streszczenie: Badania doświadczalne i obserwacje kliniczne dostarczają wielu dowodów świadczących o roli granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilii) w patogenezie procesu zapalnego rozwijającego się w obszarze niedokrwionym i reperfundowanym serca. Proces ten wymaga udziału mediatorów aktywujących i kierujących neutrofile do obszaru ryzyka oraz aktywacji molekuł adhezyjnych występujących na neutrofilach i śródbłónkach. W artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat procesów zachodzących przy udziale molekuł adhezyjnych: selektyn, integryn i adhezyn oraz mediatorów uwalnianych w czasie niedokrwienia i reperfuzji serca przez leukocyty (wolne rodniki tlenowe, leukotrien B₄, cytokiny, enzymy proteolityczne) i śródbłonki naczyniowe (tlenek azotu, prostacyklina, czynnik aktywujący płytki, interleukina-8).

(Postępy Biologii Komórki 1999; 26: 731–746)

Słowa kluczowe: neutrofile, adhezja, niedokrwienie-reperfuzja serca, zapalenie

Summary: A number of studies have demonstrated that myocardial ischemia-reperfusion injury is an acute inflammatory process in which leukocytes (80% neutrophils) are involved by accumulating at the site of ischemia injury. This process requires signals and pro-inflammatory molecules to direct neutrophils to the site of ischemia, and cell adhesion molecules to contact them with the endothelium. This review summarises current knowledge on the leukocyte cell adhesion cascade, including the role of selectins, integrins and intercellular adhesion molecules. The role of factors released from neutrophils (including oxygen free radicals, lipooxygenase products, cytokines and proteolytic enzymes) and from the endothelium (nitric oxide, prostacyclin, platelet activating factor, IL-8) is also discussed.

(Advances in Cell Biology 1999; 26: 731–746)

Key words: neutrophils, cell adhesion, myocardial ischemia-reperfusion, inflammation

WSTĘP

Ważną dziedziną kardiologii, w której granulocyty odgrywają patogenną rolę, jest uszkodzenie serca wywołane niedokrwieniem serca, występującym przy obniżonym przepływie krwi lub całkowitym braku przepływu przez naczynia oraz reperfuzją, czyli przywróceniem krążenia krwi w obszarze niedokrwionym. Reperfuzja może wystąpić spontanicznie (ustąpienie bólu wieńcowego, skurczu tętnicy wieńcowej lub samoistne udrożnienie naczynia wieńcowego) albo na skutek działań terapeutycznych (leczenie fibrynolityczne, angioplastyka i chirurgia naczyń wieńcowych, operacje kardiologiczne z zatrzymaniem krążenia wieńcowego). Jest procesem, który ratując jedne komórki inne uszkadza nieodwracalnie, co w znacznym stopniu mniejsza korzyści wynikające z przywrócenia przepływu krwi przez naczynia. Rozważa się wiele mechanizmów, które są przyczyną tego zjawiska, a wśród nich związane z napływem leukocytów do obszaru ryzyka. Wiadomo, że zmniejszenie o 20% przepływu krwi przez naczynie wieńcowe powoduje powstanie w mięśniu sercowym nacieku zapalnego.

W naczyniach mikrokrążenia (naczynia włosowate, żyłki i tętniczki) jak i w tkance okołonaczyniowej gromadzą się leukocyty, których 80% stanowią granulocyty obojętnochłonne (neutrofile) [11]. Neutrofile mając zdolność wykrywania gradientu chemotaktycznego wędrują do obszaru ryzyka, gdzie dochodzi do interakcji śródbłonek-neutrofil [61]. Reperfuzja nasila migrację neutrofilów, co prowadzi do ostrego zapalenia niedokrwionego obszaru mięśnia sercowego oraz strefy graniczącej z tkanką, która nie była niedokrwiona [10]. Badania doświadczalne dynamiki tego procesu wskazują, że po 1 godz. niedokrwienia i 3 godz. reperfuzji występuje martwica (nekroza) tkanki mięśnia sercowego [22]. Te obserwacje znajdują potwierdzenie w badaniach klinicznych ludzi [44]. Czynniki inicjującymi zapalenie niedokrwionego/reperfundowanego serca są: aktywacja dopełniacza, działanie czynników chemotaktycznych oraz aktywacja cząstek adhezyjnych na śródbłoncek i neutrofilach. Pojawiają się one już w czasie niedokrwienia. Konsekwencją ich działania są kolejno: marginacja neutrofilów w łożysku naczyniowym, toczenie się ich po powierzchni śródbłonek, następnie przyleganie i migracja przez śródbłonek naczyniowy do przestrzeni okołonaczyniowej. Wydaje się, że mechanizmy przylegania leukocytów do śródbłonek naczyniowych są najbardziej nasilone w naczyniach włosowatych [53]. Ostatecznym celem ataku neutrofilów są kardiocyty [14]. Poniżej przedstawiono stan aktualnej wiedzy na temat mechanizmów kierujących tymi procesami w czasie niedokrwienia i reperfuzji serca.

CZYNNIKI INICJUJĄCE PROCES ZAPALNY W NIEDOKRWIENIU I REPERFUZJI SERCA

1.1 Aktywacja dopełniacza

Wiadomo, że układ dopełniacza stanowi grupa około 20 współdziałających ze sobą składników surowicy występujących w postaci proenzymów, których biologiczna funkcja ujawnia się po ich aktywacji. Istnieją dwie drogi aktywacji: klasyczna i alternatywna (różniące się, m.in. mechanizmami aktywacji wczesnych składników), które łączą się na poziomie składnika C3. W czasie aktywacji składników powstają liczne fragmenty i kompleksy biorące udział m.in. w zwiększeniu przepuszczalności naczyń (C2), chemotaksji monocytów i fagocytów (C3a, C5a), adhezji tych komórek (C3b, C3d, C4B). Schemat aktywacji układu dopełniacza w sercu przedstawił w art. przeglądowym Kilgore i wsp. (1994) [29].

Znaczenie układu dopełniacza w reperfuzyjnym uszkodzeniu serca zasugerowano na początku lat siedemdziesiątych, a korelację między lokalizacją cząsteczek C1q (wczesny składnik klasycznej drogi aktywacji dopełniacza) w niedokrwionym obszarze a akumulacją neutrofilii w tym obszarze potwierdzono w późniejszych badaniach [54]. Cząsteczki C1q mają miejsca wiążące immunoglobulinę (klasy IgG lub IgM) i regiony wiążące się w obecności jonów wapnia z 2 podskładowymi kompleksu C1, których aktywacja prowadzi do wytworzenia esterazy C1 działającej na naturalne składowe dopełniacza C4 i C2. Reperfuzja serca aktywuje cząsteczki C1q na kardiocytach i na śródbłónkach czemu towarzyszy ekspresja P-selektyny i adhezyny ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) [5]. W czasie reperfuzji rośnie poziom zarówno anafilatoksyn (którymi są fragmenty C3a i C5a powstające dzięki działaniu konwertaz na odpowiednie prekursorzy), jak i kompleksu atakującego błony komórkowe (*membrane attack complex* – MAC, który jest funkcjonalną jednostką zbudowaną z 5 składników dopełniacza: C5b-C9), które stymulują ekspresję cząstek adhezyjnych zarówno na neutrofilach, jak i na śródbłónkach [29]. Składnik C5a (składnik powstający wraz z C5b, po trawieniu składnika C5 w ostatnim etapie zarówno klasycznej jak i alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza) inicjuje agregację neutrofilii i wzmacnia ich adhezję do śródbłonka [54]. Natomiast wbudowanie kompleksu C5b-9 (makromolekularny kompleks białkowy powstający przez połączenie aktywowanego C5b z C6, C7, C8 i C9, gdzie C8 jest głównym składnikiem litycznym wzmacnianym przez C9) w błonę komórkową neutrofila powoduje uwolnienie wolnych rodników tlenowych lub enzymów degradujących substancje pozakomórkowe [39]. Działanie fragmentów C3a, C4a i C5a na śródbłonki powoduje wzrost ich przepuszczalności, a działanie C3b aktywację ICAM-1 [29]. Znaczenie anafilatoksyn i kompleksu atakującego błony komórkowe w aktywacji niektórych procesów zachodzących w czasie niedokrwienia/reperfuzji serca przedstawia tabela 1.

TABELA 1. Efekt działania anafilatoksyn i kompleksu atakującego błony komórkowe na neutrofile i śródbłónki naczyniowe w czasie niedokrwienia/reperfuzyj serca. PAF – czynnik aktywujący płytki, WRT – wolne rodniki tlenowe, oznacza nasilenie procesu

| Składnik układu dopełniacza | Neutrofile | Śródbłónki |
|--|---|--|
| Anafilatoksyny (C3a, C5a, C4a) | ↑chemotaksja ↑agregacja ↑adhezja ↑uwalnianie WRT ↑uwalnianie enzymów proteolitycznych | ↑przepuszczalność naczyń mikrokrążenia ↑synteza PAF |
| Kompleks atakujący błony komórkowe (MAC) (C5b-9) | ↑uwalnianie cytokin ↑uwalnianie WRT ↑uwalnianie enzymów proteolitycznych | ↑ekspresja P-selektyny ↑uwalnianie cytokin |

Mechanizm aktywacji układu dopełniacza, pomimo wielu badań nie jest do końca poznany chociaż wiadomo, że niedokrwione kardiocyty i mitochondria izolowane z niedokrwionych kardiocytów mają zdolność jego aktywacji. Wolne rodniki tlenowe biorą w udział w tym mechanizmie. Ich rola polega na aktywacji przemiany C5 w funkcjonalnie aktywny C5b oraz C3 w C3b. Hamowanie układu dopełniacza przez stosowanie inhibitorów proteaz biorących udział w powstawaniu poszczególnych jego składników lub zmiatacza wolnych rodników tlenowych (np. N-(2-mercapto-propionym)-glicyna) chroni serce przed infiltracją neutrofilii.

1.2 Chemotaksja neutrofilii

Chemotaksja neutrofilii jest wywołana czynnikami chemotaktycznymi, takimi jak składnik dopełniacza C5a, Interlukina-8 (IL-8), transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β) i n-formylowane oligopeptydy (fMLP). Neutrofile mają dla nich specyficzne glikoproteinowe receptory wbudowane w błonę komórkową [1]. Receptory te, zależnie od stanu pobudzenia komórki, mogą wykazywać różny stopień powinowactwa dla czynników chemotaktycznych. Wiadomo jednak, że połączenie czynnika chemotaktycznego z receptorem neutrofila wzmacnia jego aktywację. Prawdopodobnie receptory dla określonych czynników chemotaktycznych odpowiadają za konkretne przemiany w neutrofilu. Wiadomo, że jeden z podtypów receptora dla fMLP pośredniczy w oddziaływaniu na elementy cytoszkieletu komórki, co prowadzi do zmiany kształtu neutrofila, ułatwiającej jego adhezję i migrację przez śródbłónki [64].

1.3 Aktywacja molekuł adhezyjnych

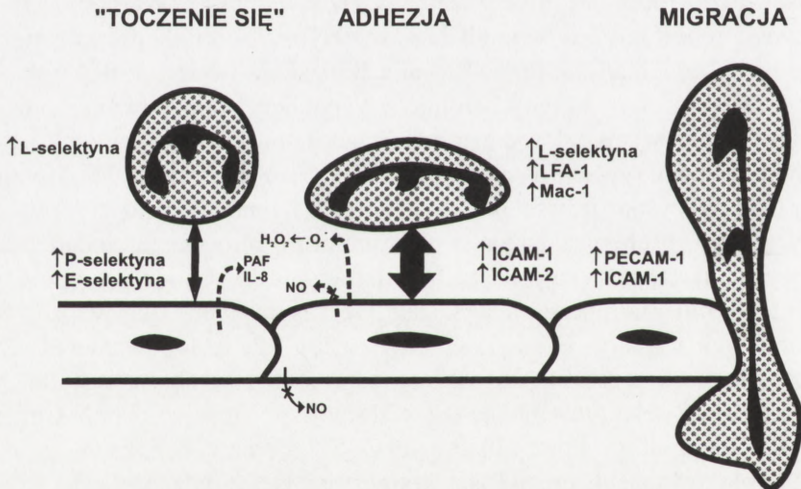
1.3. A. „Toczenie się” i adhezja neutrofilii do śródbłonek

W pierwszej fazie kontaktu neutrofilii z komórkami śródbłoneka naczyniowego istotną rolę odgrywają śródbłonkowe selektyny E, P i wykazująca ekspresję na neutrofilach L-selektyna. Ich połączenie z określonymi cząsteczkami zlokalizowanymi na neutrofilach lub śródbłoneku jest nietrwałe i powoduje, że neutrofile zwalniają swoją wędrówkę i zaczynają „toczyć się” (*rolling*) po powierzchni śródbłoneka naczyniowego. Interakcja śródbłonek–neutrofil jest zapoczątkowywana przez P-selektynę [46], która w nieaktywowanych śródbłonekach jest przechowywana w ziarnistościach cytoplazmatycznych Weibel-Palada przesuwanych w ciągu 10–20 minut na powierzchnię komórki w czasie niedokrwienia i reperfuzji pod wpływem działania trombiny lub wolnych rodników tlenowych [37]. Natomiast E-selektyna jest w czasie reperfuzji syntetyzowana przez śródbłoneki *de novo*, przez co nie odgrywa roli w pierwszych dwóch godzinach reperfuzji [34]. Może ona być uwalniana z powierzchni komórek śródbłoneka i krążyć w formie rozpuszczonej w osoczu krwi obwodowej. Ligand (określona cząsteczka adhezyjna) dla niej występuje na neutrofilach przejściowo przez 2–8 godzin od aktywacji zapalenia. W tym okresie kieruje ona neutrofile do miejsc, gdzie toczy się proces zapalny (tzw. *homing*). Wiadomo, że istotną rolę w czasie reperfuzji odgrywa także L-selektyna, której ekspresja zwiększa się w czasie niedokrwienia/reperfuzji. Badania Bengstona i wsp. (1996) wskazują, że aktywacja receptora L-selektyny koreluje z wybuchem oddechowym neutrofilii [2]. Mechanizm tej aktywacji, jak wskazują doświadczenia z zastosowaniem sulfatydów miałyby polegać na aktywacji oksydazy NADPH przez zależną od Ca^{2+} fosforylację tyrozyny [23]. Wszystkie trzy selektyny rozpoznają ligand oligosacharydowy – Sialyl Lewis X (SLe(X)), chociaż każda z nich preferuje inny węglowodan. Ekspresja SLe(X) występuje także na kardiocytach [58]. Badania doświadczalne na zwierzęcym modelu niedokrwienia/reperfuzji wykazały, że zastosowanie zarówno przeciwciał monoklonalnych na anty- P lub L-selektyna [20], jak i blokowanie SLe(X) [59] zmniejsza migrację neutrofilii do obszaru zagrożonego i obszar zawału. Wydaje się, że ekspresję P-selektyny można także zmniejszyć stosując N,N,N-trimetylsfingozyny (TMS) – inhibitor kinazy białkowej C [57]. Badania Gibbsa i wsp. wykazały ponadto, że blokowanie ekspresji P-selektyny zmniejsza osadzanie się na śródbłoneku aktywnych składowych układu dopełniacza w czasie reperfuzji [18]. Obecnie wiadomo, że selektyny odgrywają istotną rolę przez cały okres reperfuzji [15].

Po okresie „toczenia się” neutrofile, dzięki $\beta 2$ -integrynom zaczynają przylegać do śródbłoneka (adhezja). Integryny te są glikoproteinami o wspólnym łańcuchu β (CD18) i różnej podjednostce α (CD11a, CD11b, CD11c), wykazującymi słabą ekspresję w warunkach prawidłowych. Łączą się one z odpowiednimi molekułami adhezyjnymi na śródbłonekach – ICAM należącymi do rodziny immunoglobulin.

Integryna CD11a/CD18 (LFA-1) łączy się z ICAM-1 i ICAM-2, CD11b/CD18 (Mac-1) tylko z ICAM-1, a CD11c/CD18 z niezbyt dobrze poznany receptorem, natomiast nie łączy się z ICAM-1. Schemat interakcji neutrofil – śródbłonek naczyniowy w czasie toczenia się i przylegania neutrofilów do śródbłonka naczyniowego przedstawia (rys. 1).

Wiadomo, że LFA-1 nie zmienia swojej ekspresji pod wpływem czynników zapalenia [14]. Natomiast pod wpływem zadziałania czynników stymulujących następuje aktywacja molekuł Mac-1, umieszczonych na błonie komórkowej oraz translokacja dodatkowych molekuł zlokalizowanych we wtórnych ziarnistościach neutrofila [63]. Ich ekspresja może być zmniejszana działaniem dysmutazy nadtlenkowej (SOD) lub katalazy [17,60]. Wydaje się, że Mac-1 jest integryną, która odgrywa najważniejszą rolę w trwałym przyleganiu neutrofilów do śródbłonka [32]. Ekspresja receptora dla integryn – ICAM-1 nasila się pod wpływem cytokin [64]. Obserwacje porównawcze ekspresji P-selektyny, E-selektyny i ICAM-1 po różnym czasie reperfuzji wykazały, że spadkowi ekspresji P-selektyny towarzyszy wzrost ICAM-1 [72], co może świadczyć o kolejności procesów zachodzących przy udziale cząstek adhezyjnych. W doświadczeniach z blokowaniem łańcucha CD18 [68], P-selektyny lub ICAM-1 [31] obserwowano mniejszą migrację neutrofilów do obszaru



RYСУNEK 1. Schemat interakcji neutrofil – śródbłonek zachodzących w czasie toczenia się i adhezji neutrofilów do śródbłonka naczyniowego i ich migracji przez ścianę naczyń kapilarnych. Warunki zaistniałe w czasie niedokrwienia/reperfuzji powodują aktywację śródbłonek naczyniowych, która wyraża się podwyższoną ekspresją P-selektyny i ICAM-1, co przyczynia się do marginacji i toczenia się neutrofilów po ścianie naczyń. Aktywowane śródbłonek uwalniają szereg czynników, jak np. IL-8 i PAF, które działają jako czynniki chemotaktyczne i aktywujące neutrofile. W czasie reperfuzji śródbłonek wykazują obniżoną syntezę i uwalnianie NO, co dodatkowo wzmacnia przyleganie neutrofilów do śródbłonek. Interakcja śródbłonka naczyniowego z neutrofilami powoduje podwyższenie na neutrofilach ekspresji L-selektyny i B₂ integryn (CD11a/CD18 (LFA-1) i CD11b/CD18 (Mac-1)) biorących udział w ich adhezji do śródbłonka i przechodzeniu do tkanki okołonaczyniowej. Adhezywną aktywnie uczestniczącą w przechodzeniu neutrofilów przez śródbłonek naczyniowy jest także PECAM-1

niedokrwionego/ reperfundowanego i mniejszy obszar uszkodzonego mięśnia sercowego. Natomiast badania z zastosowaniem podwójnej terapii, z użyciem przeciwciał anti-P-selektyna i anti-ICAM-1 wykazały, że nie chroni ona serca bardziej niż przeciwciała podane pojedynczo [31]. U chorych po zabiegach angioplastyki naczyń wieńcowych z ponownym zamknięciem naczyń wieńcowych, obserwuje się zwiększoną ekspresję integryny CD11b/CD18, co koreluje ze zjawiskiem zatkania naczyń przez neutrofile [24,41].

1.3.B. Migracja neutrofilii przez ścianę naczyń mikrokrążenia

Badania doświadczalne wykazały, że migracja neutrofilii przez śródbłoki naczyniowe zachodzi nawet wtedy, gdy zostanie zatrzymany przepływ płynu perfuzyjnego zawierającego granulocyty [65]. Wychodzenie neutrofilii odbywa się w miejscu „rozklejonego” połączenia międzykomórkowego śródbłonka. Istotną rolę w tym procesie odgrywają L-selektyna i integryna – LFA-1, wykazujące ekspresję na powierzchni neutrofilii. L-selektyna zapoczątkowuje przechodzenie neutrofilii przez śródbłonek. Następnie dochodzi do aktywacji integryn i związania LFA-1 z ICAM-1 na śródbłonku naczyniowym [67]. Proces ten odgrywa kluczową rolę w uszkodzeniu serca w czasie reperfuzji. Wydaje się, że do procesu migracji neutrofilii wystarcza słaba ekspresja ICAM-1, występująca na nieaktywowanych śródbłonekach [16]. Badania Mullera i wsp (1993) wskazują także na aktywny udział PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) w tym procesie [42]. Adhezyna ta jest zlokalizowana głównie w miejscu połączenia komórkowego śródbłonek, a około 15% także na powierzchni śródbłonek. Wydaje się, że ten rosnący gradient rozmieszczenia PECAM-1 od powierzchni komórki do połączenia międzykomórkowego odgrywa ważną rolę w mechanizmie przechodzenia neutrofilii przez śródbłonek naczyniowy. PECAM-1 wykazujący ekspresję na śródbłonekach łączy się z PECAM obecnym na leukocytach. Udział molekuł adhezyjnych podczas migracji neutrofilii przez śródbłonek naczyń przedstawia (rys. 1).

Zastosowanie terapii ochronnej, w doświadczeniach na zwierzętach, z użyciem przeciwciał anti-L-selektyna, anti-ICAM-1 lub anti-PECAM-1 zmniejsza obszar zawału o około 50% [20].

1.3.C. Adhezja neutrofilii do kardiocytów

Badania *in vitro* wskazują na adhezję neutrofilii do kardiocytów poprzez mechanizm zależny od CD18. Jednak dla ich cytotoksycznego oddziaływania na kardiocyty niezbędna jest aktywacja ICAM-1 na kardiocytach i Mac-1 na neutrofilach [30]. ICAM-1 na kardiocytach może być aktywowany działaniem cytokin. Doświadczenia z zastosowaniem 2',7'dichlorofluoresceiny (DCFH) wykazały, że adhezja neutrofilii do kardiocytów wywołuje niemal natychmiastową aktywację oksydazy NADPH i uwolnienie anionorodnika ponadtlenkowego, który indukuje

ekspresję dodatkowych cząstek ICAM-1 na powierzchni kardiocytów [14]. Zastosowanie chelatora jonów żelaza – desferalu lub zmiatacza rodnika hydroksylowego – DMTU chroni kardiocyty przed uszkodzeniem, chociaż nie wpływa na przyleganie neutrofile.

2. MEDIATORY ZAPALENIA

Zarówno neutrofile, jak i śródbłonki naczyniowe produkują i uwalniają w czasie niedokrwienia/reperfuzji wiele czynników biorących udział w rozwoju zapalenia mięśnia sercowego, modyfikując ekspresję receptorów znajdujących na powierzchni komórek śródbłonka i granulocytów.

2.1 Czynniki uwalniane przez neutrofile

Neutrofile produkują i uwalniają czynniki biorące udział w procesach związanych z adhezją i wychodzeniem neutrofile z naczyń do tkanki śródmiąższowej oraz wpływających na toczący się proces zapalny. Należą do nich wolne rodniki tlenowe (WRT), enzymy proteolityczne, leukotrien B_4 (LTB_4), czynnik martwicy nowotworów α ($TNF-\alpha$), transformujący czynnik wzrostu β ($TGF-\beta$).

Wiadomo, że uwolnienie WRT (wybuch oddechowy) jest zależne od aktywności w neutrofile NADPH-oksydazy stymulowanej takimi czynnikami, jak: czynniki chemotaktyczne, nienasycone kwasy tłuszczowe i estry forbolu [23]. Uwalniane przez neutrofile w czasie reperfuzji aktywne formy tlenu działają bezpośrednio cytotoksycznie na substancję pozakomórkową i komórki śródbłonka oraz modyfikują funkcje śródbłonka [48,62]. Efekt ten jest wywołany ich reakcją z lipidami błony komórkowej i kwasami nukleinowymi jądra komórkowego. Wiadomo, że nadtlenek wodoru stymuluje przyleganie leukocytów do śródbłonka po przez aktywację ICAM-1 i CD18 [19]. WRT stymulują także ekspresję P-selektyny i produkcję czynnika aktywującego płytki (PAF) i LTB_4 oraz hamują syntezę tlenu azotu przez śródbłonek. Zmiatacze wolnych rodników, takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i katalaza, zmniejszają migrację neutrofile z łożyska naczyniowego do tkanki [17,60].

W czasie reperfuzji neutrofile są źródłem tlenu azotu, który reagując z anionorodnikiem ponadtlenkowym jest przyczyną powstawania toksycznego ponadtlenku azotynu ($ONOO^*$) i rodnika hydroksylowego (OH) [7].

Ważną rolę w uszkodzeniu serca odgrywają także enzymy proteolityczne uwalniane przez neutrofile, które trawią zarówno białka powierzchniowe błony komórkowej, jak i błony podstawnej śródbłonek, co przyczynia się do wzrostu ich przepuszczalności i ułatwia wychodzenie neutrofile z łożyska naczyniowego do

tkanki śródmiąższowej [73]. Działanie cytotoksycznych enzymów jak elastazy, β -glukuronidazy i N-acetyl- β -glukosaminidazy powiększa uszkodzenia w obszarze niedokrwionym. Granulocytaarne proteazy modyfikują także uwalnianie przez śródbłonek prostacykliny (PGI_2) [36].

W obszarze niedokrwionym serca rośnie również poziom LTB_4 uwalnianego przez neutrofile [6]. Działa on jako czynnik chemotaktyczny [52] oraz stymulator produkcji cytokin [6]. W czasie reperfuzji współdziałając synergistycznie z tromboksanem A_2 powoduje obkurczenie naczyń wieńcowych [35], a wzmagany działaniem przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP) zwiększa uwalnianie rodnika ponadtlenkowego i ekspresję CD11b [3].

Neutrofile są także źródłem cytokiny-TNF- α , która wzmagą migrację granulocytów w czasie reakcji zapalnej i odgrywa ważną rolę w preaktywacji neutrofilii, powodując wzmożoną odpowiedź na bodziec stymulujący w postaci zwiększonej adhezji do śródbłonka, diapedezji i wybuchu tlenowego [47]. Czynnik ten hamuje także uwalnianie tlenu azotu (NO).

W czasie niedokrwienia i reperfuzji czynnik wzrostowy – TGF- β produkowany, m.in. przez granulocyty zwiększa na powierzchni śródbłonek ekspresję molekuł ICAM-1, ale zmniejsza E-selektyny [27] oraz stymuluje rozszerzenie naczyń wieńcowych, zmniejszając w nich przy tym poziom anionorodnika ponadtlenkowego [33]. Obserwacje kliniczne wskazują na znaczenie diagnostyczne poziomu tego czynnika w ocenie zapalenia mięśnia sercowego [66].

2.2 Czynniki uwalniane przez śródbłoneki

Śródbłoneki produkują i uwalniają wiele mediatorów działających na neutrofile. Należą do nich: czynnik aktywujący płytki (PAF), tlenek azotu (NO), prostacyklina (PGI_2), endoteliny-1 (ET-1), interleukina-8 (IL-8).

PAF jest uważany za jeden z ważniejszych czynników chemotaktycznych występujących w czasie reperfuzji serca, który sprzyja adhezji neutrofilii do śródbłonek poprzez aktywację ekspresji CD11b/CD18 i ich agregacji [38]. Z badań doświadczalnych wynika, że zablokowanie tego czynnika na chwilę przed niedokrwieniem chroni serce przed obniżeniem wykładników hemodynamicznych przepływu krwi w czasie reperfuzji [51,56].

Innym ważnym elementem niedokrwionego i reperfuzyjnego uszkodzenia serca jest obniżona synteza tlenu azotu przez śródbłoneki naczyniowe [43,50]. Wiadomo, że tlenek azotu hamuje adhezję neutrofilii i płytek do śródbłonka oraz ma silne działanie rozkurczające mięśnie gładkie naczyń [34]. Gwałtownemu spadkowi syntezy tlenu azotu w 2,5–5 minucie reperfuzji towarzyszy adhezja neutrofilii [70]. Wiadomo, że hamowanie syntezy tlenu azotu w czasie reperfuzji jest zależne od obecności anionorodnika ponadtlenkowego [12]. Doświadczenia prowadzone na izolowanych sercach, polegające na blokowaniu śródbłonnej syntazy NO wy-

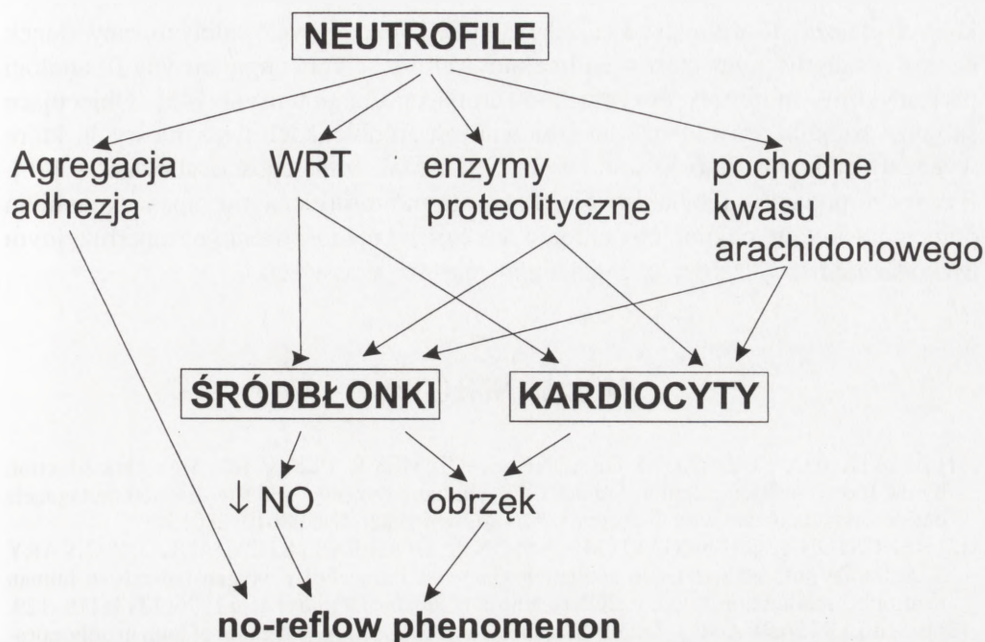
kazały, że spadkowi syntezy NO towarzyszy podwyższona ekspresja P-selektyny na śródbłonkach naczyniowych [8] oraz większe uszkodzenie funkcji serca na skutek oddziaływania neutrofilii [55]. Natomiast podanie NO zapobiega aktywacji molekuł adhezyjnych, np. ICAM-1 i sekrecji cytokin zapalnych [9].

Chemokina, która ma znaczące działanie chemotaktyczne dla neutrofilii i prozapalne w sercu jest IL-8. Badania doświadczalne wskazują, że jest ona uwalniana w czasie reperfuzji dwufazowo [26], chociaż obserwacje chorych z zawałem serca nie wykazały jej obecności w osoczu krwi obwodowej [61].

W czasie reperfuzji, w obszarze niedokrwionym i reperfundowanym rośnie także poziom ET-1 [71]. Jest ona produkowana głównie przez śródbłonki naczyniowe, chociaż wiadomo, że także przez komórki mięśniówki gładkiej i kardiocyty. Na śródbłonkach występuje receptor ET-1 typu ET_B , którego aktywacja w prawidłowym sercu wywołuje uwolnienie tlenu azotu i/lub prostacykliny. W sercu reperfundowanym obserwuje się mniejsze rozszerzenie naczyń w odpowiedzi na aktywację tego receptora [69] pomimo, że w obszarze niedokrwionym i reperfundowanym wzrasta liczba miejsc wiążących ET-1 [37]. Przypuszcza się, że jest to wynikiem rozregulowanego działania receptora ET_A . W efekcie ET-1 wykazuje w czasie reperfuzji działanie obkurczające naczynia oraz nasilające odczyn zapalny [75]. Wykazano także, że aktywuje ona neutrofile i ich agregację oraz pobudza je do syntezy anionorodnika ponadtlenkowego. Uwalnianie endoteliny jest stymulowane różnymi mediatorami jak trombina, $TNF-\alpha$, $TGF-\beta$, interleukina-1, angiotensyna II i bradykinina [49].

3. ODDZIAŁYWANIE MECHANICZNE NEUTROFILII

Zjawiskiem, które towarzyszy reperfuzji jest pogorszenie przepływu krwi w obszarze niedokrwionym, tzw. *no-reflow phenomenon* [40]. Jego przyczyną są: ograniczenie przepływu krwi przez agregujące i/lub przylegające do ścian naczyń mikrokrążenia neutrofile, obkurczenie naczyń oraz obrzęk śródbłonek, tkanki okołonaczyniowej i kardiocytów [4]. Obkurczenie naczyń jest spowodowane z jednej strony działaniem uwalnianego przez neutrofile LTB_4 , a z drugiej spadkiem syntezy śródbłonekowego tlenu azotu. Obrzęk tkanki mięśnia sercowego powstaje na skutek działania czynników uwalnianych przez neutrofile. W obszarze, w którym występuje *no-reflow phenomenon*, obserwuje się wzrost uwalniania ET-1, co dodatkowo nasila obkurczenie naczyń [28]. Wczesne wykrycie zjawiska *no-reflow phenomenon* i określenie jego zasięgu ma ogromne znaczenie kliniczne [21,25]. Udział czynników powodujących powstawanie w obszarze zagrożonym serca zjawiska *no-reflow phenomenon* przedstawia rysunek 2.



RYSUNEK 2. Schemat współdziałania czynników powodujących utrudnienie przepływu krwi w obszarze ryzyka (*no-reflow phenomenon*) w przebiegu niedokrwienia/reperfuzji serca. Zjawisko to jest wynikiem agregacji i przylegania neutrofilów do śródbłonnka naczyniowego oraz działania czynników uwalnianych przez neutrofile, powodujących uszkodzenie struktury i funkcji śródbłonnków naczyniowych i kardiocytów w obszarze niedokrwionym/reperfundowanym mięśnia sercowego. WRT – wolne rodniki tlenowe

4. PODSUMOWANIE

Zarówno wyniki badań doświadczalnych na zwierzętach i izolowanych komórkach serca, jak i obserwacje kliniczne pacjentów z chorobą niedokrwieniową serca, po zawale, po zabiegach angioplastyki naczyń wieńcowych wskazują na udział neutrofilów w patologii zmian występujących w czasie niedokrwienia i reperfuzji serca. Poznanie mechanizmów interakcji śródbłonnka-neutrofile oraz roli uwalnianych w czasie niedokrwienia mediatorów, stymulujących aktywację neutrofilów być może pozwoli w przyszłości skutecznie chronić serce przed skutkami niedokrwienia i reperfuzji. Mimo korzystnych, w doświadczeniach na zwierzętach, efektów stosowania przeciwciał monoklonalnych, blokujących ekspresję molekuł adhezyjnych nie można ich wykorzystać w terapii ludzi z uwagi na wiele nierozwiązanych nadal problemów, a przede wszystkim możliwość immunizacji pacjentów [74]. Obecnie opierając się na obserwacjach, że niedokrwienemu/reperfuzyjnemu uszkodzeniu funkcji śródbłonnka towarzyszy m.in. hamowanie syntezy i uwalniania tlenu azotu oraz prostacykliny, u ludzi stosuje się leki poprawiające hemodynamikę krążenia krwi, do

których należą: L-arginina (związek, z którego może być syntetyzowany tlenek azotu), antagoniści receptorów endotelinowych i receptora angiotensyny II, analogi prostacykliny, inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę [45]. Obiecujące są także badania prowadzone na izolowanych śródbłónkach naczyńiowych, które wykazały całkowite hamowanie ekspresji ICAM-1 w obecności salicylanów [76]. Być może podanie salicylanów przed zabiegami chirurgicznymi, np. wykonaniem pomostów aortalnych mogłoby chronić serce przed niedokrwiennym/reperfuzyjnym uszkodzeniem związanym z zapaleniem mięśnia sercowego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMATRUDA TT, DRAGAS-GRAONIC S, HOLMES R, PEREZ HD. Signal transduction by the formyl peptide receptor. Studies using chimeric receptors and site-directed mutagenesis define a novel domain with G-proteins. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28010–28013.
- [2] BENGSTON T, GRENEGARD M, OLSSON A, SJOGREN F, STENDAHL O, ZALVARY S. Sulfatide-induced L-selectin activation generates intracellular oxygen radicals in human neutrophil: modulation by extracellular adenosine. *Biochem Biophys Acta* 1996; **1313**: 119–129.
- [3] BISELLI R, FARRACE S, DE SIMONE C, FATTOROSSO A. Potention of human polymorphonuclear leukocyte activation by atrial natriuretic peptide. *Inflammation* 1996; **20**(1): 33–42.
- [4] BOYLE EM, POHLMAN TH, CORNEJO CJ, VERRIER ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: Ischemia-reperfusion. *Ann Thoracic Surg* 1996; **62**(6): 1868–1875.
- [5] BUERKE M, PRUFER D, DAHM M, OELERT H, MEYER J, DARIUS H. Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharm Exp Ther* 1998; **286**: 429–438.
- [6] CROOKS SW, STOCKLEY RA. Leukotriene B4. *Int J Bioch Cell Biol* 1998; **30**: 173–178.
- [7] DARLEY-USMAR V, WHITE R. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for the cardiovascular disease. *Exp Physiol* 1997; **82**: 305–316.
- [8] DAVENPECK KL, STEEBER DA, TEDDER TF, BOCHNER BS: P- and L-selectin mediate distinct but overlapping functions in endotoxin-induced leukocyte-endothelial interactions in the rat mesenteric microcirculation. 1997; **159**: 1977–1986.
- [9] De CATERINA R, LIBBY P, PENG HB, THANNICKAL VJ, RAJAVASHISTH TB, GIMBRONE MA, SHIN WS, LIAO JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; **96**: 60–68.
- [10] DHEIN S, SCHOTT M, GOTTWALD E, MULLER A, KLAUS W. The contribution of neutrophils to reperfusion arrhythmia and a possible role for antiadhesive pharmacological substances. *Cardiovasc Res* 1995; **30**: 881–888.
- [11] DREYER WJ, SMITH CW, MICHAEL LH, WEST MS, SMITH CW, ROHLEIN R, ROSSEN RD, ANDERSON DC, ENTMAN ML. Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. *Circulation* 1991; **84**: 400–411.
- [12] EGDELL RM, SIMINIAC T, SHERIDAN DJ. Modulation of neutrophil activity by nitric oxide during acute myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1994; **89**: 499–509.
- [13] ENTMAN ML, YOUKER K, SHOJI T, KUKIELKA G, SHAPPELL SB. Neutrophil induced oxidative injury of cardiac myocytes. A compartmented system requiring CD11b/CD18-ICAM-1 adherence. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1335–1345

- [14] ENTMAN ML, SMITH CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994; **28**: 1301-1311
- [15] FLYNN DM, BUDA AJ, JEFFORS PR, LEFER DJ. A sialyl Lewis(x)-containing carbohydrate reduces infarct size: role of selectins in myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol* 1996; **271**(5 Pt 2): H2086-H2096.
- [16] FURIE MB, TACINCO MCA, SMITH CW. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration *in vitro*. *Blood* 1991; **78**: 2613-2621.
- [17] FRATICELLI A, SERRANO CVJ, BOCHNER BS, CAPOGROSSI MC, ZWEIER JL. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. *Biochem Biophys Acta* 1996; **1310**: 251-259.
- [18] GIBBS S.A., WEISER MR, KOBZIK L, VALERI CR, SHEPRO D, HECHTMAN HB. P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement. *Surgery* 1996; **119**(6): 652-656.
- [19] GRISHAM MB, GRANGER DN, LEFER DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radical Biol Med* 1998; **25**(4-5): 404-433.
- [20] GUMINA RJ, NEWMAN PJ, KENNY D, WARLTIER DC, GROSS GJ. The leukocyte cell adhesion cascade and its role in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 1997; **92**: 201-213.
- [21] HAMADA S, NAKAMURA S, SUGIURA T, MURAKAMIT, FUJIMOTO T, WATANABE J, BADEN M, HATADA K, IWASAKA T. Early detection of the no-reflow phenomenon in reperfused acute myocardial infarction using technetium-99m tetrofosmin imaging. *Eur J Nuclear Med*. 1999; **26**(3): 208-214.
- [22] HAWKINS HK, ENTMAN ML, ZHU JY, YOUKER KA, BERENS K, DORE M, SMITH CW. Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody. *Am J Pathol* 1996; **148**(6): 1957-1969.
- [23] HENDERSON LM, CHAPPEL JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1996; **1273**: 87-107.
- [24] INOUE T, SAKAI Y, HOSHI K, YAGUCHI I, FUJITO T, MOROOKA S. Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation* 1998; **97**(25): 2511-2518.
- [25] ITO H, IWAKURA K. Assessing the relation between coronary reflow and myocardial reflow. *Am J Cardiol* 1998; **81**(12A): 8G-12G.
- [26] IVEY CL, WILLIAMS FM, COLLINS PD, JOSE PJ, WILLIAMS TJ. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8. *J Clin Invest* 1995; **95**: 2720-2728.
- [27] KANG YH, BRUMMEL SE, LEE CH. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on lipopolysaccharide induction of endothelial adhesion molecules. *Shock* 1996; **6**: 118-125.
- [28] KELLY RF, HURSEY TL, SCHAEER GL, PIOTROWSKI MJ, DEE SV, PARRILLO JE, HOLLENBERG SM. Cardiac endothelin release and infarct size, myocardial blood flow, and ventricular function in canine infarction and reperfusion. *J Invest Med* 1996; **44**(9): 575-582.
- [29] KILGORE KS, FRIEDRICH GS, HOMEISTER JW, LUCCHESI BR. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994; **28**: 437-444.
- [30] KUKIELKA GL, MANNING HK, MICHAEL LH. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) synthesis in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1504-1516.
- [31] LEFER DJ, FLYNN DM, ANDERSON DC, BUDA AJ. Combined inhibition of P-selectin and ICAM-1 reduces myocardial injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; **271**: H2421-H2429.

- [32] LEFER AM, LEFER DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996; **32**: 743–751.
- [33] LEFER AM, TSAO P, AOKI N, PALLADINO MA. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science* 1990; **249**: 61–64.
- [34] LEFER AM, WEYRICH AS, BUERKE M. Role selectins, a new family of adhesion molecules in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994; **28**: 289–294.
- [35] LEHR HA, GUHLMANN A, NOLTE D, KEPPLER D, MESSMER K. Leukotriens as mediator in ischemia-reperfusion injury in microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 1991; **87**: 2036–2041.
- [36] LeROY EC, AGER A, GORDON JL. Effects of neutrophil elastase and other proteases on porcine aortic endothelial prostaglandin I₂ production, adenine nucleotide release, and responses to vasoactive agents. *J Clin Invest* 1984; **74**: 1003–1010.
- [37] LIU J, CHEN R, CASLEY DJ, NAYLER WG. Ischemia and reperfusion increases 125 I-labelled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. *Am J Physiol* 1990; **258**: H829–H835.
- [38] LOUCKS EB, SYMERSKY P, QAYUMI AK. Platelet-activating factor antagonism: a new concept in management of regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg* 1997; **10**: 321–338.
- [39] LUCCHESI BR. Complement, neutrophil and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Arzneimittel-Forschung* 1994; **44(3A)**: 420–432.
- [40] MEISEL SR, SHAPIRO H, RADNAY J, NEUMANN Y, KHASKIA AR, GRUENER N, PAUZNER H, DAVID D. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecule LFA-1 and Mac-1 and their ligand ICAM-1 and VLA-4 throughout the acute phase of myocardial infarction: possible implications for leukocyte aggregation and microvascular plugging. *J Am Coll Cardiol* 1998; **31(1)**: 120–125.
- [41] MICKELSON JK, LAKKIS NM, VILLARREAL-LEVY G, HUGHES BJ, SMITH CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for current disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; **28**: 345–353.
- [42] MULLER WA, WEIGEL S.A., XIAOHUI D, PHILIPS DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes 1993; **178**: 449–460.
- [43] NONAMI Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jap Circ J* 1997; **61(2)**: 119–132.
- [44] NEUMANN FJ, OTT I, GAWAZ M, RICHARDT G, HOLZAPFEL H, JOCHUM M, SCHOMIG A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; **92(4)**: 748–755.
- [45] OPOLSKI G, FILIPIAK KJ. Modyfikacja mediatorów śródbłonkowych w praktyce klinicznej. *Kardiologia Pol* 1998; **48(suppl 2)**: 87–92.
- [46] PALAZZO AJ, JONES SP, ANDERSON DC, GRANGER DN, LEFER DJ. Coronary endothelial P-selectin in pathogenesis of myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1998; **275**: H1865–H1872.
- [47] PAŚNIK J, BUKOWSKI P, PIETRUSZYŃSKI R. Rola niektórych receptorów i szlaków transdukcji sygnału w preaktywacji neutrofila przez TNF- α . *Post Biol Kom* 1999; **26(1)**: 181–199.
- [48] PATRICK DA, MOORE EE, MOORE FA, BARNETT CC, SILIMAN CC. Lipid mediators up-regulate CD11b and prime for concordant superoxide and elastase release in human neutrophils. *J Trauma* 1997; **43(2)**: 297–302.
- [49] PERNOW J, WANG Q-D. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997; **33**: 518–526.
- [50] PILECKI T. Rola endogenego nitratu (EDRF) w warunkach fizjologii i patologii układu krążenia. *Post Nauk Med* 1997; **8**: 203–207.

- [51] QAYUMI AK, ENGLISH JC, GODIN DV, ANSLEY DM, LOUCKAS EB, LEE JU, KIM CW. The role of platelet-activating factor in regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thoracic Surg* 1998; **65**(6): 1690–1697.
- [52] RIBEIRO RA, SOUZA-FILHO MV, SOUZA MH, OLIVEIRA SH, COSTA CH, CUNHA FQ, FERREIRA HS. Role resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. *Int Arch Allerg Immunol* 1997; **112**: 27–35.
- [53] RITTER LS, WILSON DS, WILLIAMS SK, COPELAND JG, MCDONAGH PF. Early in reperfusion following myocardial ischemia, leukocyte activation is necessary for venular adhesion but not capillary retention. *Microcirculation* 1995; **2**(4): 315–327.
- [54] ROSSEN RD, MICHAEL LH, HAWKINS HK, YOUKER K, DREYER WJ, BAUGHN RE, ENTMAN ML. Cardioliipin-protein complex and initiation of complement activation after coronary occlusion. *Circ Res* 1994; **75**: 546–555.
- [55] SATO H, ZHAO ZQ, JORDAN JE, TODD JC, RILEY RD, TAFT CS, HAMMON JW, LI P, MA X, VINTEN-JOHANSEN J. Basal nitric oxide express endogenous cardioprotection during reperfusion by inhibition of neutrophil-mediated damage after surgical revascularization. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1997; **113**: 399–409.
- [56] SAWA Y, SCHAPER J, ROTH M, NAGASAWA K, BALLAGI G, BLEESE N, SCHAPER W. Platelet-activating factor role in reperfusion injury in myocardium. Efficacy of platelet-activating factor antagonist (CV-3988) as compared with leukocyte-depleted reperfusion. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1994; **108**(5): 953–959.
- [57] SCALIA R, MUROHARA T, DELYANI JA, NOSSULI TO, LEFER AM. Myocardial protection by N,N,N-trimethylsphingosine in ischemia reperfusion injury is mediated by inhibition of P-selectin. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**(3): 317–324.
- [58] SEKO Y, ENOKAWA Y, TAMATANI T, KANNAGI R, YAGITA H, OKAMURA K, YAZAKI Y. Induction of sialyl Lewis(X) on the surface of cultured rat vascular endothelial cells and cardiac myocytes by hypoxia/reoxygenated *in vitro*. *J Pathol* 1996; **180**(3): 300–304.
- [59] SEKO Y, ENOKAWA Y, TAMATANI T, KANNAGI R, YAGITA H, OKAMURA K, YAZAKI Y. Expression of sialyl Lewis(X) in rat heart with ischaemia/reperfusion and reduction of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody against sialyl Lewis(X). *J Pathol* 1996; **180**(3): 305–310.
- [60] SERRANO CVJ, MIKHAIL EA, WANG P, NOBLE B, KUPPUSAMY P, ZWEIER JL. Superoxide and hydrogen peroxide induce CD18-mediated adhesion in the postischemic heart. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1316**: 191–202.
- [61] SIMINIĄK T, BALIŃSKI M. Interakcje śródbłonek naczyniowy-granulocyty-plytki krwi w patogenezie choroby niedokrwiennej serca. *Kardiologia Pol* 1998; **48**(Suppl 2): 81–86.
- [62] SIMINIĄK T, FLORES NA, SHERIDAN DJ. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995; **16**: 160–170.
- [63] SIMMS HH, DAMICO R. Subcellular location of neutrophil opsonic receptors is altered by exogenous reactive oxygen species. *Cell Immunol* 1995; **166**: 71–82.
- [64] SMITH CW, ROTHLEIN R, HUGHES BJ, MARISCALCO MM, SCHMALSTIEG FC, ANDERSON DC. recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. *J Clin Invest* 1988; **82**: 1746–1756.
- [65] SMITH JA. Neutrophils, host defence, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukocyte Biol* 1994; **56**: 672–686.
- [66] STOISER B, KNAPP S, THALHAMMER F, LOCKER GJ, KOFLER J, HOLLENSTEIN U, STAUDINGER T, WILFING A, FRASS M, BURGMANN H. Time course of immunological markers in patient with systemic inflammatory response syndrome: evaluation of sCD14, sVCAM-1, sELAM-1, MIP-1 alpha and TGF-beta2. *Eur J Clin Invest* 1998; **28**(8): 672–678.

- [67] TAMIYA Y, YMAMOTO N, UEDE T. Protective effect of monoclonal antibodies against LFA-1 and ICAM-1 on myocardial reperfusion injury following global ischemia in rat heart. *Immunopharmacol* 1995; **29**: 53–63.
- [68] THIAGARAJAN RR, WINN RK, HARLAN JM. The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia reperfusion injury. *Thrombosis Haemostasis* 1997; **78**: 310–314.
- [69] THOMPSON M, WESTWICK J, WOODWARD B. Responses to endothelin-1, -2 and 3 and sarafotoxin 6c after ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart: role of vasodilator loss. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **25**: 156–162.
- [70] TSAO PS, AOKI N, LEFER DJ, JOHNSON G, LEFER AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990; **82**: 1402–1412.
- [71] WANG Q-D, HEMSEN A, LI X-S, LUNDBERG JM, URIDA Y, PERNOW J. Local overflow and enhanced tissue content of endothelin following myocardial ischaemia and reperfusion in the pig: modulation by L-arginine. *Cardiovasc Res* 1995; **29**: 44–49.
- [72] WEYRICH AS, BUERKE M, ALBERTINE KH, LEFER AM. Time course of coronary vascular endothelial adhesion molecule expression during reperfusion of the ischemic feline myocardium. *J Leukocyte Biol* 1995; **57**: 45–55.
- [73] WYSOCKI H. Molekuły adhezyjne w chorobach układu krążenia. *Kardiolog Pol* 1998; **48**: 522–526.
- [74] WILLIAMS FM. Neutrophils and myocardial reperfusion injury. *Pharm Therap* 1996; **72**: 1–12.
- [75] VITOLA JW., FORMAN MB, HOLSINGER JP, KAWANA M, ATKINSON JB, QUERTERMOUS T, JACKSON EK, MURRAY JJ. Role of endothelin in rabbit model of acute myocardial infarction: effects of receptor antagonists *J Cardiovasc Pharm* 1996; **28(6)**: 774–783.
- [76] ZUND G, DZUS AL., PRETRE R, NIEDERHAUSER U, VOGT P, TURINA M. Endothelial cell injury in cardiac surgery: salicylate may be protective by reduction expression of endothelial adhesion molecules. *Eur J Cardio Thoracic Surg* 1998; **13(3)**: 293–297.

Redaktor prowadzący – W. Kilarski

Otrzymano: 06.04. 1999 r.

Przyjęto: 28.06. 1999 r.

Adres autora: Al. Dzieci Polskich 20, 04-736 Warszawa

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI MIKROCYSTYN PRODUKOWANYCH PRZEZ SINICE, METODY ICH DEGRADACJI I CHEMICZNEJ MODYFIKACJI

**STRUCTURE AND PROPERTIES OF MICROCYSTINS
PRODUCED BY CYANOBACTERIA, METHODS
OF THEIR DEGRADATION AND DERIVATIZATION**

Piotr GAJDEK

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin,
Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie: W pracy omówiono aktualny stan badań na temat hepatotoksycznych cyklicznych heptapeptydów – mikrocystin, produkowanych przez wiele gatunków sinic, a w szczególności przedstawiono ich budowę chemiczną w powiązaniu z toksycznością i hamowaniem aktywności fosfataz białkowych, ich właściwości fizykochemiczne i biodegradację, metody ich degradacji i chemicznej modyfikacji.
(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 747–757)

Słowa kluczowe: sinice, hepatotoksyny, mikrocystyny, degradacja, proces uzdatniania wody, derywatywacja, hamowanie aktywności fosfataz białkowych

Summary: The current stage of research on hepatotoxic cyclic heptapeptides – microcystins, produced by many species of cyanobacteria has been reviewed, in particular their chemical structure – toxicity and protein phosphatase inhibition relationships, their physicochemical properties and biodegradation, methods of their degradation and derivatization.
(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 747–757)

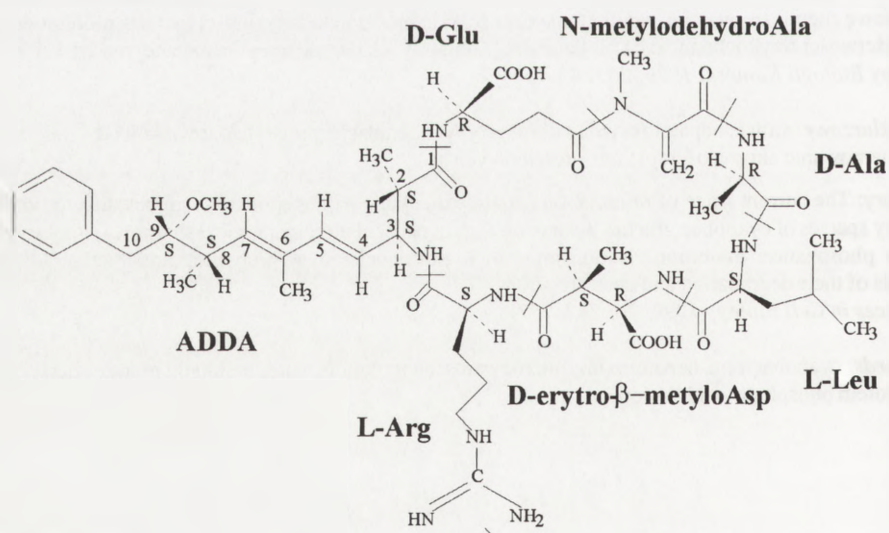
Key words: cyanobacteria, hepatotoxins, microcystins, degradation, water treatment process, derivatization, protein phosphatase inhibition

1. WSTĘP

Detergenty i nawozy sztuczne eutrofizują zbiorniki wodne powodując bujny rozwój organizmów żywych. Wiele gatunków sinic (cyjanobakterii) tworzących zakwity w eutroficznych wodach zarówno morskich, jak i słodkich produkuje toksyny jako metabolity wtórne. Są to cytotoksyny, neurotoksyny, hepatotoksyny oraz dermatotoksyny [2, 3, 24, 26, 27]. Najczęściej spotykanymi hepatotoksynami są cykliczne hepta- i pentapeptydy, odpowiednio mikrocystyny i nodularyny. Mikrocystyny są produkowane przez gatunki z rodzajów *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Hapalosiphon*, oraz *Nostoc*. Obecnie scharakteryzowano około 60 wytworzonych przez sinice mikrocystyn, z których najbardziej znaną jest mikrocystyna-LR (rys. 1).

Inne naturalnie występujące mikrocystyny różnią się głównie obecnością innych L-aminokwasów (m.in. alaniny, tyrozyny, N-metyloseryny, fenyloalaniny, tryptofanu) w miejscach L-leucyny i L-argininy, a także stopniem zmetylowania (kwas β -metyloasparaginowy bywa zastąpiony przez kwas D-asparaginowy, a N-metylodehydroalanina przez dehydroalaninę), czasem występuje inny izomer geometryczny przy szóstym węglu w ADDA albo kwas glutaminowy jest zestryfikowany [20]. Inna struktura cząsteczek implikuje niekiedy mniejsze właściwości toksyczne albo zupełnie brak toksyczności [18].

ADDA = kwas (2S,3S,8S,9S)-3-amino-10-fenyl-9-metoksy-2,6,8-trimetylodekano-4(E),6(E)-dienowy



RYSUNEK 1. Mikrocystyna-LR

Toksyny sinic spowodowały liczne letalne zatrucia zwierząt domowych i dzikożyjących [3]. Zanotowano tylko jeden przypadek śmiertelnego zatrucia ludzi - około 50 pacjentów poddano hospitalizacji w centrum hemodializy w Brazylii [8], gdy toksyna dostawała się bezpośrednio do krwiobiegu pacjentów podczas wykonywania dializy przy użyciu wody zawierającej mikrocytyny. Ostatnio wykazano, że mikrocytyna-LR jest rozkładana przez trypsynę do nietoksycznego kwasu (2S,3S,8S)-3-amino-10-fenyl-2,6,8-trimetylodeka-4(E),6(E)-dienowego (demetoksy-ADDA) i aminokwasów [28], co może być kluczem do wyjaśnienia braku ewidencji śmiertelnych wypadków zatrucia ludzi przez toksyny wprowadzone do ich układu pokarmowego. Dawka letalna LD₅₀ (mysz, iniekcja dootrzewnowa) wynosi dla mikrocytyny-LR około 50 µg/kg wagi ciała [2], a więc jest około 200 razy mniejsza niż dla cyjanku sodu [32, 33]. Toksyna dostaje się do krwi na skutek działania przenośników żółciowych, a następnie jest transportowana do hepatocytów. Na skutek zmian w filamentach pośrednich i mikrofilamentach następuje zniszczenie wewnętrznej struktury wątroby, krwotok wewnątrzwątrobowy, a następnie śmierć [3]. Dawki nanogramowe czy nawet pikogramowe przyjmowane przez organizmy wielokrotnie są przyczyną nowotworów wątroby, gdyż hepatotoksyny są inhibitorami fosfataz białkowych typu 1 i 2A [4], podobnie jak kwas okadowy, kalikulin, tautomycyna i kantarydyna. Efekt hamowania aktywności fosfataz białkowych przez mikrocytyny zostaje osiągnięty najprawdopodobniej przez oddziaływanie N-metylodehydoalaniny z resztą cysteinową Cys-273 białka enzymatycznego. Na podstawie dotychczasowych badań można przypuszczać, że określony heptapeptyd jest inhibitorem fosfatazy białkowej, jeżeli spełnione są trzy warunki: cykliczna struktura, dwie wolne grupy karboksylowe oraz sztywny łańcuch lipofilowy (zawierający wiązania podwójne). Obecność dehydroaminokwasu nie jest niezbędna [16]. Postuluje się również, że jedynie tworzenie przez toksynę stabilnych kompleksów z fosfatazą białkową ma znaczenie w wywoływaniu nowotworu wątroby przez mikrocytynę [34].

Pytanie o przyczynę produkcji toksyn przez sinice pozostaje nadal otwarte. Produkcja toksyn nie wydaje się być wywołana przez czynniki stresowe, ponieważ ich maksymalne ilości są produkowane wtedy, gdy warunki środowiskowe są optymalne dla wzrostu sinic [27]. Sinice rosną najlepiej i tworzą zakwity z reguły wczesną wiosną (marzec) lub późnym latem (sierpień), kiedy spełnione są następujące warunki: temperatura wody waha się w granicach 15–30°C, jej pH wynosi 6–9, woda zawiera duże ilości azotu i fosforu a pogoda jest prawie bezwietrzna [3]. Liza starzejących się komórek sinic umożliwia uwalnianie toksyny do środowiska. W przypadku 50-dniowych kultur większość mikrocytyny-LR syntetyzowanej przez gatunek *Microcystis aeruginosa* występuje w wodzie stanowiącej środowisko życia tego gatunku sinic [21].

Zakwity sinicowe w zbiornikach wodnych stanowią poważny problem [31] szczególnie dla wielkich aglomeracji. Również w Polsce prowadzi się badania nad to-

ksyczością występujących w naszym kraju zakwitów sinicowych w zbiornikach wody pitnej. Na przykład badania w Sulejowskim Zbiorniku Zaporowym zaopatrującym w wodę pitną miasto Łódź wykazały, że latem 1993 roku zawartość mikrocystryny-LR w zakwicie sinicowym wahała się w przedziale 40–117 $\mu\text{g/g}$ suchej masy fitoplanktonu [32].

2. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE MIKROCYSTYN ROZPUSZCZONYCH W WODZIE

Mikrocystryny mają grupy polarne - karboksylowe, aminowe oraz amidowe. Jonizacja ich grup karboksylowych zachodzi przy pH 3.3–3.4. W wodach naturalnych występują one zazwyczaj w formie obojętnej lub anionowej. Są łatwo rozpuszczalne w wodzie (rozpuszczalność wyższa niż 1g/l). Na skutek obecności grup polarnych pozostają w fazie wodnej i tylko w kilku procentach są adsorbowane przez osady denne oraz zawieszono cząstki stałe [21]. Widma absorpcyjne roztworów wodnych mikrocystryny w zakresie nadfioletu wykazują charakterystyczne pasmo z maksimum przy 238–239 nm związane ze sprzężonym układem wiązań podwójnych w ADDA. Jedynie w przypadku związku zawierającego tryptofan pojawia się drugie, wyższe maksimum przy 222 nm [14]. Komputerowe modelowania trójwymiarowej struktury mikrocystryny-LR wykazały, że pierścień makrolaktamowy stabilizuje bardziej elastyczny łańcuch boczny stanowiący strukturalną część ADDA, który może nawet przyjmować kształt litery „U”. Grupa fenylowa znajduje się wówczas w pobliżu sprzężonego układu wiązań podwójnych [13].

3. ZACHOWANIE MIKROCYSTYN ROZPUSZCZONYCH W WODZIE W RÓŻNYCH WARUNKACH pH I TEMPERATURY

Mikrocystryny są bardzo trwale chemicznie, praktycznie nie reagują z kwasami, zasadami, ani nie można ich rozłożyć przez zagotowanie zawierającej je wody. W warunkach naturalnych musi upłynąć wiele tygodni, aby ich rozkład mógł być zauważalny. Temperatura wody w japońskich jeziorach w czasie lata wynosi zwykle 25–30°C, przy równoczesnej wartości pH 9–10. W warunkach podobnych (pH 9, 21–30°C, ciemność, warunki sterylne) po około 84 dniach 50% mikrocystryny-LR zostaje rozłożone do nietoksycznych liniowych peptydów poprzez hydrolizę N-metylodehydoalaniny. Przy podobnych wartościach pH, ale w temperaturze 40°C, czas połowicznego rozkładu wynosi 70 dni. Z kolei przy pH równym 1 i w

temperaturze 40°C czas ten ulega skróceniu do 21 dni. Natomiast przy pH równym 5 lub 7 toksyna praktycznie nie ulega rozkładowi nawet w temperaturze 40°C [6].

4. BIODEGRADACJA ORAZ PROCESY PRZYŚPIESZAJĄCE ROZKŁAD MIKROCYSTYN W WARUNKACH NATURALNYCH

Biodegradacja ma znacznie większy udział w naturalnej detoksykacji mikrocystyn niż rozkład termiczny przy odpowiednim pH. W ciemności i w warunkach aerobowych 42 dnia od momentu wyłączenia światła prawie wszystkie komórki *Microcystis aeruginosa* zostają rozłożone przez bakterie heterotroficzne. W tym eksperymencie po upływie 35 do 40 dni od momentu wyłączenia światła odnotowano maksymalne stężenie mikrocystyn w wodzie, co oznacza ustalenie się stanu równowagi pomiędzy uwalnianiem toksyn przez komórki, a biodegradacją toksyn. Z kolei po upływie 55 do 65 dni od momentu wyłączenia światła stężenie mikrocystyn spadło w tym eksperymencie do połowy maksymalnej wartości [39]. Mikrocystyny-LR nie rozkładają bakterie *Citrobacter*, *Enterobacter* i *Klebsiella*, zaś jest ona rozkładana przez alkaliczną proteazę wydzielaną przez gatunek *Pseudomonas aeruginosa* do demetoksy-ADDA, który nie jest inhibitorem fosfataz proteinowych [30]. Obserwowano degradację toksyny przez bakterie *Sphingomonas*. Najpierw zostaje rozerwane wiązanie pomiędzy ADDA i arginina. W wyniku tego procesu powstaje liniowa acyklo-mikrocystyna-LR (NH₂-ADDA-Glu-N-metylodehydroAla-Ala-Leu-β-metyloAsp-Arg-OH), następnie liniowy tetrapeptyd NH₂-ADDA-Glu-N-metylodehydroAla-Ala-OH, a na koniec peptydy o mniejszej masie cząsteczkowej i aminokwasy [1]. W wodach jezior udział w biodegradacji komórek sinicowych oprócz bakterii mają również cyjanofagi, pierwotniaki i grzyby [39].

Pod wpływem światła słonecznego w obecności różnych barwników wyekstrahowanych z sinic (chlorofili, karotenoidów, fikobilin), a także czystego chlorofilu a oraz czystego β-karotenu, następuje przyśpieszenie procesu rozkładu toksyn, a także pojawia się odwracalna izomeryzacja mikrocystyny-LR do jej izomeru geometrycznego 6(Z)-ADDA-mikrocystyny-LR (który jest o wiele mniej toksyczny, jak wykazuje test hamowania aktywności fosfatazy proteinowej), prawdopodobnie w wyniku fotochemicznej reakcji fotosensybilizowanej. Największe szybkości rozkładu i izomeryzacji zaobserwowano w obecności fikocyjanin. Wyniki otrzymane za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczonego połączonego ze spektrometrem masowym sugerują mechanizm reakcji w której stanem przejściowym jest związek z przyłączonymi grupami hydroksylowymi do sprzężonego układu wiązań

podwójnych w ADDA. Połowa początkowej ilości toksyny zostaje w tym eksperymencie rozłożona po 10 dniach [35].

5. METODY USUWANIA MIKROCYSTYN W PROCESACH UZDATNIANIA WODY

Konwencjonalne metody uzdatniania wody obejmujące takie procesy jednostkowe jak flokulacja, koagulacja i filtracja piaskowa okazują się niewystarczające do całkowitego usunięcia mikrocytyn, podczas gdy adsorpcja na węglu aktywnym, zarówno granulowanym (GAC), jak i proszkowanym (PAC) są bardziej efektywne ale jednak również nie usuwają toksyn całkowicie, co można wykazać przy pomocy czułego testu hamowania aktywności fosfatazy proteinowej [12], który daje również informację o rakotwórczości. Adsorpcję na węglu aktywnym można zastąpić przez ozonowanie, który to proces może być uznany za bardziej ekonomiczny [7]. Niektóre informacje literaturowe wskazują, że można otrzymać z łusek nasion drzewa tropikalnego *Moringa oleifera* węgiel aktywny, zarówno proszkowany jak i granulowany, o bardzo dobrych właściwościach sorpcyjnych, pozwalający zredukować stężenie mikrocytyny-LR lub jej ekwiwalentów do wartości niższej od 1 µg/l (wartość ustalona przez Światową Organizację Zdrowia). Ta metoda otrzymywania węgla aktywnego może znaleźć zastosowanie szczególnie w ubogich krajach rozwijających się [38].

6. METODY DEGRADACJI

a) Ozonoliza. Ozonoliza sprzężonego układu wiązań podwójnych w ADDA (roztwór metanolowy toksyny, strumień O_3/O_2 przepuszczany przez 5-10 min) daje nietoksyczne produkty, m.in. kwas 4-fenyl-3-metoksy-2-metylomastowy [5]. Skuteczną dawką ozonu jest 1–1,5 mg/l [10]. Dawka ta jest uzależniona od stężenia rozpuszczonego węgla organicznego (DOC) w uzdatnianej wodzie [19].

b) Chlorowanie. Chlor rozkłada mikrocytynę-LR jeżeli zastosuje się odpowiednio dużą dawkę (najmniej 0,5 mg/l przez 30 min, pH < 8). Rozkład toksyny zależy od pH. Odczynniki chlorujące, takie jak: podchloryn sodu i wapnia, nie są tak efektywne przy dużych dawkach na skutek podwyższenia pH [19]. Według innej grupy badawczej mikrocytyna-LR zostaje rozłożona w wyniku chlorowania za pomocą podchlorynu sodu. Wykryto wiele produktów chlorowania, z których jeden został oznaczony jako dihydroksymikrocytyna-LR, utworzona poprzez jon chloroniowy w miejscu sprzężonego układu wiązań podwójnych w ADDA. Dihy-

droksymikrocystyna-LR ulega następnie hydrolizie. Innymi produktami mogą być jej izomery [36]. Chlorowanie wody może doprowadzić do powstania substancji karcenogennych. Znacznie korzystniejszy jest więc proces uzdatniania wody bez chlorowania, ale z zastosowaniem innej metody [37], na przykład naświetlania promieniowaniem nadfioletowym (UV) lub metody fotokatalitycznej.

c) Naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym. Gdy roztwór wodny mikrocystyny-LR jest naświetlany promieniowaniem nadfioletowym (UV) przy długościach fal zbliżonych do maksimum absorpcji, rozkład fotolityczny zależy od intensywności promieniowania. Przy intensywności $2550 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ toksyna zostaje całkowicie rozłożona w ciągu 10 min, z kolei przy $147 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ po tym samym czasie zostaje rozłożona tylko połowa jej początkowej ilości. Naświetlając promieniowaniem o niższym natężeniu można zaobserwować izomeryzację, której mechanizm jest jednak inny niż pod wpływem światła słonecznego w obecności barwników wyekstrahowanych z sinic. Wykryto kilka produktów, między innymi izomery geometryczne 6(Z)-ADDA-mikrocystynę-LR, 4(Z)-ADDA-mikrocystynę-LR, oraz prawdopodobnie 4(Z),6(Z)-ADDA-mikrocystynę-LR [37]. Badania fotolizy przez inną grupę badawczą (bufor fosforanowy pH 7, $130 \mu\text{W}$ przy 250 nm, 0°C) doprowadziły do wykrycia innego produktu rozkładu, a mianowicie (tricyklo-ADDA)-mikrocystyny-LR, gdzie tricyklo-ADDA jest kwasem (2S,3S,1'R,3'S,4'S, 5'R,6'R,7'R)-3-amino-5-(4',6'-dimetylo-3'-metoksytricyklo[5.4.0.0^{1,5}]undeka-8'10'-dien-6'-yl)-2-metylo-4(E)-pęntenowym, utworzonej przez addycję [2+2] między pierścieniem benzenowym a podwójnym wiązaniem przy szóstym i siódmym węglu w ADDA. Związek ten zostaje utworzony z mikrocystyny-LR w sposób odwracalny, a następnie rozłożony pod wpływem światła nadfioletowego. Fakt ten sugeruje, że fotolityczny rozkład toksyny zachodzi poprzez (tricyklo-ADDA)-mikrocystynę-LR [9].

d) Metoda fotokatalityczna. Naświetlano roztwór wodny mikrocystyny-LR (pH 4, 33°C) w obecności powietrza i katalizatora TiO_2 lampą ksenonową (280 W, 330–450 nm). Stężenia toksyny (μmole) użyte w reakcji rozkładu metodą fotokatalityczną były o wiele większe od stężeń spotykanych w warunkach naturalnych (nmole lub pmole). W przypadku roztworu o najwyższym stężeniu ($200 \mu\text{mol}/\text{l}$) toksyna była praktycznie niewykrywalna metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej po 40 min od rozpoczęcia reakcji. 50% toksyny zostało zaadsorbowane na powierzchni katalizatora w wyniku procesu ciemniowej adsorpcji jeszcze przed rozpoczęciem naświetlania. Nie zaobserwowano degradacji w przypadku próbek naświetlanych bez TiO_2 [23]. Proces nie zachodził w atmosferze azotu. Wyniki sugerują mechanizm reakcji przez atak rodnika hydroksylowego wytworzonego na powierzchni fotokatalizatora [22], który ma większe właściwości utleniające niż wiele związków powszechnie używanych do dezynfekcji wody, takich jak: ozon, nadtlenek wodoru, kwas podchloryny lub chlor. Wykryto około siedmiu produktów rozkładu fotokatalitycznego metodą analizy ich widm w nadfiolecie oraz widm

masowych. Początkową reakcją jest dihydroksylacja jednego z wiązań podwójnych w ADDA. Następnie dochodzi do rozerwania wiązania podwójnego pomiędzy szóstym i siódmym węglem w ADDA, lub wiązania podwójnego pomiędzy czwartym i piątym węglem. W przeciwieństwie do innych prostszych związków organicznych poddanych utlenianiu fotokatalitycznemu stwierdzono jedynie około 10% mineralizację mikrocystyny-LR. Potwierdzono testem na larwach *Artemia salina*, że fotokatalitycznemu rozkładowi mikrocystyn towarzyszy obniżenie toksyczności [15].

e) **Reakcja z chlorem żelaza (III)**. Chlorek żelaza (III) jest stosowany w procesie flokulacji przy uzdatnianiu wody. Wykazano, że reakcja z tym odczynnikiem prowadzi do powstania demetoksy-ADDA i aminokwasów. 20% toksyny zostaje rozłożone po 30 min przy pH 7,0. Reakcja rozkładu zachodzi w szerokim zakresie pH [29].

7. METODY CHEMICZNEJ MODYFIKACJI (DERYWATYZACJI)

a) **Reakcja z borowodorkiem sodu**. Reakcja z borowodorkiem sodu prowadzi do uwodornienia mikrocystyny w miejscu N-metylodehydroalaniny do dwu dihydromikrocystyn zawierających diastereoizomeryczne N-metyloalaniny. Wykazują one podobną zdolność do hamowania aktywności fosfatazy proteinowej jak sama mikrocystyna [16], chociaż nie tworzą z tym enzymem wiązania kowalencyjnego [4].

b) **Hydrogenacja katalityczna**. W wyniku hydrogenacji katalitycznej otrzymuje się związek, w którym uwodornione zostają wiązania podwójne zarówno w ADDA, jak i w N-metylodehydroalaninie. Nie wykazuje on aktywności jako hepatotoksyna [17], ponieważ wtedy uwodorniony lipofilowy łańcuch boczny stanowiący strukturalną część ADDA ma bardziej elastyczną strukturę uniemożliwiającą hamowanie aktywności fosfatazy proteinowej [16].

c) **Estryfikacja**. W wyniku reakcji estryfikacji w temperaturze pokojowej mikrocystyna-LR przekształca się w ester monometylowy w miejscu grupy karboksylowej kwasu glutaminowego, a także w związek w którym obie wolne grupy karboksylowe są zestryfikowane [11]. Powstałe w tej reakcji związki nie są inhibitorami fosfatazy proteinowej i nie tworzą z nią wiązania kowalencyjnego [4].

d) **Utlenianie metodą Lemieux**. Utlenianie metodą Lemieux za pomocą mieszaniny nadmanganianu potasu i metanadrodanu sodu daje kwas 4-fenilo-3-metoksy-2-metylomastłowy. Reakcja ta może być stosowana do oznaczania mikrocystyn związanych kowalencyjnie *in vivo* [40], lub do mikrooznaczeń całkowitej zawartości mikrocystyn w zakwitach sinicowych [25].

8. PODSUMOWANIE

Pomimo dużej ilości prac badawczych oraz wielu opracowanych metod degradacji i chemicznej modyfikacji, toksyny sinic stanowią wciąż poważne zagrożenie, szczególnie wtedy gdy znajdują się one w zbiornikach wody pitnej. Potrzebne są dalsze badania w celu opracowania ulepszonej metody uzdatniania wody, która pozwoliłaby na usunięcie śladowych ilości toksyn.

LITERATURA

- [1] BOURNE DG, JONES GJ, BLAKELEY RL, JONES A, NEGRI AP, RIDDLES P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Appl Environ Microbiol* 1996; **62**, **11**: 4086–4094.
- [2] CARMICHAEL WW. The cyanotoxins. *Adv Botanical Res* 1997; **27**: 211–256.
- [3] CARMICHAEL WW. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American* 1994; **270**, **1**: 78–86.
- [4] CRAIG M, LUU HA, McCREADY TL, WILLIAMS D, ANDERSEN RJ, HOLMES CFB. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. *Biochem Cell Biol* 1996; **74**: 569–578.
- [5] HARADA K-I, MURATA H, QIANG Z, SUZUKI M, KONDO F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon* 1996; **34**, **6**: 701–710.
- [6] HARADA K-I, TSUJI K, WATANABE MF, KONDO F. Stability of microcystins from cyanobacteria – III. Effect of pH and temperature. *Phycologia* 1996; **35**, **6** suppl: 83–88.
- [7] HIMBERG K, KEIJOLA A-M, HIISVIRTA L, PYYSALO H, SIVONEN K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: a laboratory study. *Water Res* 1989; **23**, **8**: 979–984.
- [8] JOCHIMSEN EM, CARMICHAEL WW, JISI AN, CARDO DM, COOKSON ST, HOLMES CEM, de C ANTUNES MB, de M FILHO DA, LYRA TM, BARRETO VST, AZEVEDO SMFO, JARVIS WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New Engl J Med* 1998; **338**, **13**: 873–878.
- [9] KAYA K, SANO T. A photodetoxification mechanism of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by ultraviolet irradiation. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**, **3**: 159–163.
- [10] KEIJOLA AM, HIMBERG K, ESALA AL, SIVONEN K, HIISVIRTA L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicol Assess* 1988; **3**: 643–656.
- [11] KRISHNAMURTHY T, SZAFRANIEC L, HUNT DF, SHABANOWITZ J, JATES JR, HAUER CR, CARMICHAEL WW, SKULBERG O, CODD GA, MISSLER S. Structural characterisation of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 770–774.
- [12] LAMBERT TW, HOLMES CFB, HRUDEY SE. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Res* 1996; **30**, **6**: 1411–1422.
- [13] LANARAS T, COOK CM, ERIKSSON JE, MERILUOTO JAO, HOTOKKA M. Computer modelling of the 3-dimensional structures of the cyanobacterial hepatotoxins microcystin-LR and nodularin. *Toxicon* 1991; **29**: 901–906.
- [14] LAWTON LA, EDWARDS C, BEATTIE KA, PLEASANCE S, DEAR GJ, CODD GA. Isolation and characterisation of microcystins from laboratory cultures and environmental

- samples of *Microcystis aeruginosa* and from an associated animal toxicosis. *Nat Toxins* 1995; **3**: 50–57.
- [15] LAWTON LA, ROBERTSON PKJ, CORNISH BJPA, JASPARS M. Detoxification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) using TiO₂ photocatalytic oxidation. *Environ Sci Technol* 1999; **33**: 771–775.
- [16] MEHROTRA AP, WEBSTER KL, GANI D. Design and preparation of serine-threonine protein phosphatase inhibitors based upon the nodularin and microcystin toxin structures: Part 1. Evaluation of key inhibitory features and synthesis of a rationally stripped-down nodularin macrocycle. *J Chem Soc Perkin Trans* 1997; **1**: 2495–2511.
- [17] NAMIKOSHI M, RINEHART KL, DAHLEM AM, BEASLEY VR, CARMICHAEL WW. Total synthesis of ADDA, the unique C₂₀ amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Lett* 1989; **30**, **33**: 4349–4352.
- [18] NAMIKOSHI M, RINEHART KL, SAKAIR, STOTTS RR, DAHLEM AM, BEASLEY VR, CARMICHAEL WW, EVANS WR. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer Lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J Org Chem* 1992; **57**: 866–872.
- [19] NICHOLSON BC, ROSITANO J, BURCH MD. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Water Res* 1994; **28**, **6**: 1297–1303.
- [20] RINEHART KL, NAMIKOSHI M, CHOI BW. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol* 1994; **6**: 159–176.
- [21] RIVASSEAU C, MARTINS S, HENNION M-C. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; **799**: 155–169.
- [22] ROBERTSON PKJ, LAWTON LA, CORNISH BJPA, JASPARS M. Processes influencing the destruction of microcystin-LR by TiO₂ photocatalysis. *J Photochem Photobiol A Chem* 1998; **116**: 215–219.
- [23] ROBERTSON PKJ, LAWTON LA, MÜNCH B, ROUZADE J. Destruction of cyanobacterial toxins by semiconductor photocatalysis. *J Chem Soc Chem Commun* 1997; **4**: 393–394.
- [24] ROGALSKA-KUPIEC M, BOCHNIA T. Toksyny syntetyzowane przez sinice. *Wiad Botan* 1998; **42**, **1**: 11–19.
- [25] SANO T, NOHARA K, SHIRAIISHI F, KAYA K. A method for micro-determination of total microcystin content in water-blooms of cyanobacteria (blue-green algae). *Int J Environ Anal Chem* 1992; **49**: 163–170.
- [26] SIVONEN K. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia* 1996; **35**, **6** supl: 12–24.
- [27] SIVONEN K. Toxins produced by cyanobacteria. [w] Miraglia M, van Egmond H, Brera C, Gilbert J [red.] *Mycotoxins and Phycotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety* 1998; 547–568.
- [28] TAKENAKA S. Formation of 3-amino-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4E,6E-dienoic acid from microcystin-LR by the treatment with various proteases, and its detection in mouse liver. *Chemosphere* 1998; **36**, **10**: 2277–2282.
- [29] TAKENAKA S, TANAKA Y. Decomposition of cyanobacterial microcystins by iron(III) chloride. *Chemosphere* 1995; **30**: 1–8.
- [30] TAKENAKA S, WATANABE MF. Microcystin-LR degradation by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *Chemosphere* 1997; **34**, **4**: 749–757.
- [31] TARCZYŃSKA M, IZYDORCZYK K, ZALEWSKI M. Zakwity sinic w Zb. Jeziorsko – przyczyny i konsekwencje. [w] Ginkowska G [red.] Raport o stanie środowiska w województwie sieradzkim w latach 1995–96. 1997; 145–151. Biblioteka Monitoringu Środowiska, PIOŚ, Sieradz
- [32] TARCZYŃSKA M, ZALEWSKI M. Toksyczność zakwitów sinicowych jako wynik eutrofizacji zbiorników wodnych. *Gosp. Wod.* 1995; **4**, **556**: 83–87.

- [33] TARCZYŃSKA M, ZALEWSKI M. Toksyczność zakwitów sinicowych w eutroficznych zbiornikach. [w] Zalewski M [red.] Zintegrowana strategia ochrony i zagospodarowania ekosystemów wodnych. Biblioteka Monitoringu Środowiska, PIOŚ, Uniwersytet Łódzki. 1994; 79–89.
- [34] TOIVOLA DM, ERIKSSON JE, BRAUTIGAN DL. Identification of protein phosphatase 2A as the primary target for microcystin-LR in rat liver homogenates. *FEBS Lett* 1994; **344**: 175–180.
- [35] TSUJI K, NAITO S, KONDO F, ISHIKAWA N, WATANABE MF, SUZUKI M, HARADA K-I. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environ Sci Technol* 1994; **28**, **1**: 173–177.
- [36] TSUJI K, WATANUKI T, KONDO F, WATANABE MF, NAKAZAWA H, SUZUKI M, UCHIDA H, HARADA K-I. Stability of microcystins from cyanobacteria – IV. Effect of chlorination on decomposition. *Toxicon* 1997; **35**, **7**: 1033–1041.
- [37] TSUJI K, WATANUKI T, KONDO F, WATANABE MF, SUZUKI S, NAKAZAWA H, SUZUKI M, UCHIDA H, HARADA K-I. Stability of microcystins from cyanobacteria – II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. *Toxicon* 1995; **33**, **12**: 1619–1631.
- [38] WARHURST AM, RAGGETT SL, McCONNACHIE GL, POLLARD SJT, CHIPOFYA V, CODD GA. Adsorption of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by a low-cost activated carbon from the seed husks of the pantropical tree, *Moringa oleifera*. *Sci Total Environ* 1997; **207**: 207–211.
- [39] WATANABE MF, TSUJI K, WATANABE Y, HARADA K-I, SUZUKI M. Release of heptapeptide toxin (microcystin) during the decomposition process of *Microcystis aeruginosa*. *Nat Toxins* 1992; **1**: 48–53
- [40] WILLIAMS DE, CRAIG M, DAWE SC, KENT ML, HOLMES CFB, ANDERSEN RJ. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and *Dungeness* crab larvae. *Chem Res Toxicol* 1997; **10**, **4**: 463–469.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 17.04. 1999 r.

Przyjęto: 28.06. 1999 r.

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

CHEMOKINY PŁYTEK KRWI

CHEMOKINES OF BLOOD PLATELETS

Tomasz Michał ZIELIŃSKI, Barbara WACHOWICZ

Katedra Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi

Streszczenie: W pracy przedstawiono obecne poglądy na budowę, klasyfikację i biologiczne znaczenie chemokin. Scharakteryzowano molekularne podłoże interakcji chemokin z receptorami oraz związek między budową a aktywnością chemokin. Opisano udział chemokin w procesach fizjologicznych i patologicznych. Szczególną uwagę poświęcono chemokinom pochodzącym z płytek krwi. Opisano udział tych chemokin w chemotaksji, procesach zapalnych, hematopoezie, angiogenezie i gojeniu ran. Zwrócono uwagę na możliwość uczestniczenia płytkowych chemokin w patogenezie niektórych chorób.

(Postępy Biologii Komórki 1999; 26: 759–779)

Słowa kluczowe: chemokiny, receptory chemokinowe, płytki krwi

Summary: In this paper the current views on chemokines, their classification, structure and biological significance are presented. The molecular mechanism of interactions of chemokines with their specific receptors and the relationships between structure and activity of chemokines have been characterized. Special attention is focused on the chemokines derived from blood platelets. The role of chemokines in physiological and pathological processes, including chemotaxis, inflammation, hematopoiesis, angiogenesis and wound healing is discussed. The possible role of blood platelet-derived chemokines in pathogenesis of some diseases is also presented.

(Advances in Cell Biology 1999; 26: 759–779)

Key words: chemokines, chemokine receptors, blood platelets

Wykaz stosowanych skrótów: **Ala** – alanina, **Arg** – arginina, **Asn** – asparagina, **β -TG** – β -tromboglobulina, **Ba** – bazofile, **bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, **BFU - E** (ang. *burst forming unit-erythroid*) – jednostka koloniotwórcza prekursorów erytrocytów, **CD** (ang. *cluster of differentiation*) – marker różnicowania, **CFU-GM** (ang. *colony forming unit-granulocyte, macrophage*) – prekursorowa jednostka koloniotwórcza granulocytów-makrofagów, **CTAP III** – peptyd aktywujący tkanki łącznej III, **DARC** – antygen Duffy – receptor chemokin, **DC** – komórka dendrytyczna, **DC-CK1** – chemokina komórek dendrytycznych I, **E** – eozynofile, **ELC** (ang. *Epstein-Barr virus-induced gene ligand chemokine*) – chemokina ELC, **ELR** – kwas glutaminowy/leucyna/arginina, **ENA-78** – pocho-

dzący z komórek śródbłonna peptyd aktywujący neutrofile, **F** – fibroblasty, **GCP** – białko chemotaktyczne granulocytów, **GROs** – czynniki wzrostu czerniaka, **HCC-1** (ang. *hemofiltrate CC chemokine*) – chemokina HCC-1, **I-309** – chemokina i-309, **IL** – interleukina, **Ile** – izoleucyna, **IP-10** – białko indukowane przez interferon γ , **I-TAC** (ang. *interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) – chemokina I-TAC, **LARC** (ang. *liver and activation-regulated chemokine*) – chemokina LARC, **Leu** – leucyna, **LIX** – chemokina CXC indukowana przez lipopolisacharyd, **Liz** – lizyna, **M** – monocyty, **MAP** (ang. *mitogen-activated protein*) – kinaza aktywowana przez mitogen, **MCPs** – białka chemotaktyczne wobec monocytów, **MDC** – chemokina pochodząca z makrofagów, **MIG** – monokina indukowana przez interferon γ , **MIPs** – zapalne proteiny makrofagów, **N** – neutrofile, **NAP-2** – peptyd aktywujący neutrofile, **NKC** – naturalna komórka cytotoksyczna, **PARC** (ang. *pulmonary and activation-regulated chemokine*) – chemokina PARC, **PBP** – zasadowe białko płytek, **PF4** – płytkowy czynnik 4, **Pro** – prolina, **RANTES** (ang. *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) – chemokina RANTES, **SDF-1** – czynnik pochodzący z komórek podścieliska, **T** – limfocyty T, **TARC** (ang. *thymus and activation-regulated chemokine*) – chemokina TARC, **TECK** (ang. *thymus-expressed chemokine*) – chemokina TECK, **TEM** – przezśródbłonkowa migracja eozynofilów, **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β , **TNF** (ang. *tumor necrosis factor*) – czynnik martwicy nowotworów, **Val** – walina, **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu, **VLA** (ang. *very late antigen*) – antygen późnej odpowiedzi.

1. WPROWADZENIE

Podstawową rolą płytek krwi, najmniejszych, upostaciowanych elementów krwi, powstających w wyniku rozpadu i fragmentacji cytoplazmy megakariocytów, jest ich udział w procesie hemostazy. Aktywacja płytek krwi oznacza m.in. zmianę kształtu płytek, adhezję, agregację oraz sekrecję biologicznie czynnych związków z ziarnistości płytek, co prowadzi do utworzenia czopu hemostatycznego. Płytki krwi uczestniczą także w wielu procesach patologicznych, w tym również w procesie zapalnym. Po pierwsze, płytki krwi mogą być aktywowane przez patogeny, tj. niektóre bakterie, wirusy, grzyby [39, 45, 74]. Po drugie, na powierzchni zaktywowanych płytek ulega ekspozycji selektyna P, biorąca udział w początkowych stadiach migracji leukocytów przez ścianę naczynia i odpowiedzialna za interakcję płytek z leukocytami [40]. Po trzecie, z ziarnistości zaktywowanych płytek krwi uwalniane są substancje biologicznie aktywne w procesie zapalnym. Z ziarnistości gęstych uwalniane są klasyczne mediatory zapalenia: histamina i serotonina. Szczególną rolę przypisuje się także cytokinom uwalnianym z α -ziarnistości: czynnikom wzrostowym oraz chemokinom. Płytkowe chemokiny są zgromadzone w ziarnistościach α płytek i nie są wytwarzane *de novo*.

2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA CYTOKIN

Cytokiny są niskocząsteczkowymi białkami lub peptydami pełniącymi rolę międzykomórkowych mediatorów i odgrywającymi kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy w organizmie. Regulują procesy wzrostu i różnicowania wielu typów komórek. Biorą udział w odpowiedzi immunologicznej ustroju i jej regulacji, w

procesach odnowy tkanek, hematopoezy, gojenia ran, angiogenezy, transformacji nowotworowej i w wielu innych. Działają w sposób parakrynnny lub autokrynnny umożliwiając przesyłanie określonych sygnałów komórkom docelowym i wywołując w nich odpowiedź polegającą zwykle na regulacji ekspresji genów w tych komórkach, czego dalszym efektem są określone zmiany w komórkach. Charakterystycznymi cechami większości cytokin są:

- a) ich lokalne działanie
- b) brak konstytutywnej ekspresji
- c) spełnianie więcej niż jednej funkcji (efekt działania cytokiny zależy od rodzaju komórki docelowej i od rodzaju występujących na jej powierzchni receptorów).

W zależności od pełnionych przez nie funkcji, cytokiny można podzielić na: interferony, interleukiny, czynniki wzrostu, czynniki martwicy nowotworów i czynniki chemotaktyczne [55]. Ze względu na podobieństwa struktury trzeciorzędowej do cytokin zalicza się rodziny: hematopoetyń, interleukiny 1 (IL-1), czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor* – TNF), transformującego czynnika wzrostu α (ang. *transforming growth factor* α – TGF- α), transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) i chemokin [23].

3. Chemokiny jako rodzina cytokin

Chemokiny są rodziną cytokin wykazującą aktywność chemotaktyczną, o masie cząsteczkowej od 8 do 12 kDa i 20–70% homologii sekwencji aminokwasowej. Łańcuchy polipeptydowe chemokin zawierają cztery konserwatywne cysteiny tworzące wewnątrzcząsteczkowe wiązania disulfidowe (wyjątkiem jest limfotaktyna zawierająca 2 cysteiny). Charakteryzują się znacznym podobieństwem struktury trzeciorzędowej, która odróżnia je od pozostałych cytokin. W strukturze tej można wyróżnić: N-terminalną pętlę, 3 antyrównoległe fragmenty o strukturze β , połączone przez pętle, oraz odcinek C-końcowy mający strukturę α -helikalną [9, 20, 68]. Cechą charakterystyczną wszystkich chemokin jest ich zdolność do wywoływania ukierunkowanej migracji komórek (chemotaksji). Jednak, w przeciwieństwie do klasycznych chemoatraktantów (tj. np. leukotrienu B₄, czy fragmentu C5a kompleksu), chemokiny działają chemotaktycznie tylko na komórki mające określone receptory na powierzchni [9, 20, 63]. Chemokiny nie stanowią jednorodnej rodziny cytokin. Ze względu na określoną pozycję reszt cysteinowych można je podzielić na cztery główne podrodziny [42], zestawione w tabeli 1:

a) podrodzina CXC (chemokiny α). W łańcuchach polipeptydowych jej przedstawicieli dwie pierwsze cysteiny, licząc od N-końca, są rozdzielone przez pojedyncze aminokwasy. Geny dla tych chemokin są zgrupowane na chromosomie 4; zbudowane są z 4 eksonów i 3 intronów (wyjątkiem są geny dla płytkowego

TABELA 1. Podział chemokin na rodziny, uwzględniający pozycje konserwatywnych cystein w łańcuchu polipeptydowym, typ wykorzystywanych receptorów oraz rodzaje komórek docelowych

| Rodzina | Nazwa | | Receptor | Komórki docelowe | |
|--|--|---|--------------------------------------|--|----------|
| | skrót | (w języku angielskim) | | | |
| CC | MCPs: MCP-1, -2 MCP-3, -4 MCP-5 | monocyte chemoattractant proteins | CCR2 CCR1,2,3 | M, T, Ba, NKC, DC M, T, Ba, E, NKC, DC M, T, Ba, NKC, DC | |
| | RANTES | regulated upon activation normal T cell expressed and secreted | CCR1,3,5 CCR3 | M, T, Ba, E, NKC, DC E, Ba, DC | |
| | Eotaksyna-1 | eotaxin-1 | CCR1,5 CCR5 | E, M, T, DC, NKC M, T, DC, NKC | |
| | MIPs: MIP-1 α MIP-1 β ELC(MIP-3 α) | macrophage inflammatory proteins (Epstein-Barr virus-induced gene 1) ligandchemokine | CCR7 CCR8 | T M | |
| | I-309 | thymus and activation-regulated chemokine | CCR4 | T, DC | |
| | TARC | thymus and activation-regulated chemokine | CCR6 | DC | |
| | LARC(MIP-3 β) | liver and activation-regulated chemokine | ? | T, DC | |
| | MDC | macrophage-derived chemokine | ? | M, DC | |
| | TECK | thymus-expressed chemokine | ? | M | |
| | HCC-1 | hemofiltrate CC chemokine | ? | T | |
| | PARC | pulmonary and activation-regulated chemokine | ? | T | |
| | SLC | secondary lymphoid-tissue chemokine | ? | T | |
| | DC-CK1 | dendritic-cell chemokine 1 | ? | T | |
| | CXC 1)ELR- CXC | IL-8 | interleukin-8 | CXCR1,2 | N, M, Ba |
| GCP-2 | | granulocyte chemotactic protein-2 | CXCR1,2 | N | |
| GRO- α , - β , - γ | | growth-regulated oncogenes | CXCR2 | N | |
| ENA-78 | | epithelial cell derived neutrophil activated peptide | CXCR2 | N | |
| LIX | | lipopolysaccharide induced CXC chemokine | CXCR2 | N | |
| PBP ¹ : CTAPIII | | connective tissue activating peptide III | CXCR2 | N, F | |
| β -TG | | b-tromboglobulin | CXCR2 | N, F | |
| NAP-2 | | neutrophil activating protein-2 | CXCR2 | N, Ba | |
| 2)ELR CXC | | MIG | monokine induced by interferon gamma | CXCR3 | T, NKC |

TABELA 1. cd.

| Rodzina | Nazwa | | Receptor | Komórki docelowe |
|--------------------------|--------------|---|---------------------|------------------|
| | skrót | (w języku angielskim) | | |
| CXC cd. | IP-10 | interferon-inducible protein 10 | CXCR3 | T, NKC |
| | I-TAC | interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant | CXCR3 | T, NKC |
| | PF4 | platelet factor 4 | ? | M, T, Ba, F |
| | SDF-1 | stromal-cell-derived factor 1 | CXCR4 | M, T, DC |
| C | Limfotaktyna | lymphotactin | ? | T |
| CXXC (CX ₃ C) | Fraktalkina | fractalkine | CX ₂ CR1 | M, T, NKC |

Objaśnienia skrótów: M – monocyty, T – limfocyty T, Ba – bazofile, NKC – naturalne komórki cytotoksyczne, DC – komórki dendrytyczne, E – eozynofile, N – neutrofile, F – fibroblasty; ¹PBP (zasadowe białko płytek) ulega rozszczepieniu proteolitycznemu dając pochodne: CTAP III – peptyd aktywujący tkanki łącznej, β -TG – β -tromboglobulinę i NAP-2-peptyd aktywujący neutrofile

czynnika 4 i zasadowego białka płytek, zawierające 3 eksony) [63]. Białka CXC działają chemotaktycznie głównie na neutrofile, ale mogą także działać na monocyty, limfocyty T, komórki NK i inne typy komórek. Do tej podrodziny należą m. in. Interleukina 8 (IL-8), białko indukowane przez interferon gamma (IP-10, ang. *interferon γ -inducible protein*), czynniki wzrostu czerniaka (GRO- α , β i γ , ang. *growth related oncogenes*), PF4 (ang. *platelet factor 4*), PBP (ang. *platelet basic protein*), białko chemotaktyczne granulocytów 2 (GCP-2, ang. *granulocyte chemoattractant protein*) i czynniki pochodzące z komórek podścieliska (SDF-1 i -1, ang. *stromal cell-derived factor*).

b) podrodzina CC (chemokiny β). Cechą charakterystyczną białek tej podrodziny jest ułożenie dwóch pierwszych cystein łańcucha polipeptydowego obok siebie. Geny podrodziny są zgrupowane na chromosomie 17 i zawierają 3 eksony. Chemokiny wywołują migrację głównie monocytów i limfocytów T, ale także eozynofiliów, komórek NK czy bazofilów. Do tej podrodziny zalicza się m.in. chemokinę RANTES (ang. *regulated upon activation normal T cells expressed and secreted*), zapalne białka makrofagów (MIP-1 α i -1 β , ang. *macrophage inflammatory proteins*), białka chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1, 2, 3 i 4, ang. *monocyte chemoattractant proteins*), eotaksynę, I-309 i inne [9, 42, 63].

c) podrodzina C. Jednym z jej przedstawicieli jest limfotaktyna, działająca jako chemoatraktant limfocytów T CD4; jej gen znajduje się na ludzkim chromosomie 1. Limfotaktyna zawiera tylko dwie cysteiny w łańcuchu polipeptydowym [33, 42, 63].

d) podrodzina CX₃C (CXXXXC). Jedynym znanym przedstawicielem tej podrodziny jest neurotaktyna (fraktalkina), integralna glikoproteina błon komórkowych, będąca cząsteczką adhezyjną dla monocytów i limfocytów T. Jej gen znajduje się na chromosomie 16. Pierwsze dwie cysteiny łańcucha polipeptydowego neurotaktyny rozdzielają trzy aminokwasy [56, 66].

Rodzina chemokin zawiera ponad 40 znanych przedstawicieli i wciąż odkrywani są nowi. W większości typów komórek ekspresja chemokin zachodzi *de novo*, po ich stymulacji przez zapalne cytokiny (np. IL-1, TNF- α), obce antygeny czy czynniki wywołujące uszkodzenie tkanek [33, 42]. Niekiedy chemokiny mogą występować jako mediatory zgromadzone w ziarnistościach komórek (w płytkach krwi).

3.1. Aktywność chemokin

Większość chemokin, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, tworzy dimery [8, 15, 20], jednak struktura dimeru nie wydaje się być konieczna do osiągnięcia przez nie pełnej aktywności. Aktywność chemotaktyczną wykazują IL-8, MIP-1 α , NAP-2 i MCP-1 w formie monomeru [4, 15, 50, 52, 76]. O ile trzeciorzędowa struktura chemokin jest podobna, dimery utworzone w wyniku niekowalencyjnych interakcji regionów N-terminalnych monomerów różnią się między sobą w poszczególnych podrodzinach [20]. Dimer IL-8 jest globularny, podczas gdy dimer MCP-1 jest wydłużony i cylindryczny. Aktywność biologiczna chemokin podrodziny CXC i CC jest uzależniona od obecności określonych sekwencji w ich cząsteczkach. Dla tych pierwszych, krytycznym dla ich rozpoznawania przez neutrofile, jest motyw ELR (Glu-Leu-Arg), poprzedzający pierwszą cysteinę w łańcuchu polipeptydowym [8, 18, 19, 76]. Chemokiny nie zawierające motywu ELR (np. PF4, IP-10) nie wywołują migracji neutrofilów [8]. Przy użyciu syntetycznych analogów chemokin wykazano, że motyw ELR nie jest jednak jedynym, wymaganym dla interakcji chemokin z receptorami (syntetyczne polipeptydy posiadające ten motyw nie są aktywne). Dodatkowymi regionami rozpoznawanymi przez receptory są także odcinek zawierający pozycje aminokwasów od 18 do 22, fragment łańcucha polipeptydowego w okolicy trzeciej cysteiny (pozycje 30–35) oraz 2 aminokwasy między tymi odcinkami (Leu²⁵ i Val²⁷ w IL-8) [18, 19, 48]. Dla aktywności podrodziny chemokin CXC olbrzymie znaczenie ma również obecność wszystkich czterech cystein, warunkująca istnienie prawidłowej konformacji łańcucha polipeptydowego [1]. Natomiast największe znaczenie dla specyficznego rozpoznawania chemokin CC przez ich receptory ma cały odcinek poprzedzający pierwszą cysteinę w łańcuchach polipeptydowych [8, 9]. Jego wydłużenie bądź odłączenie od niego kilku aminokwasów powoduje całkowitą lub częściową utratę aktywności. Istnieją jednak dowody na to, że niektóre skrócone analogi tych chemokin działają jako antagoniści ich receptorów (np. formy MCP-3 (10–76) i RANTES (9–68) są antagonistami licznych receptorów CCR (ang. *CC receptors*), co sugeruje, że ten odcinek

spełnia rolę przede wszystkim w selektywnym rozpoznaniu receptora, natomiast za samo wiązanie się z nim odpowiadają inne fragmenty [9, 19].

3.2. Receptory chemokin i przekazywanie sygnału w komórkach docelowych

Molekularną „tarczą” dla chemokin są receptory o charakterze serpentynowym, mające zewnątrzkomórkowy fragment N-końcowy, siedem domen transbłonowych połączonych przez pętle i odcinek C-końcowy (wewnątrzkomórkowy). Należą one do nadrodziny białek receptorowych, łączących się z białkami G [8, 18]. Drugie i trzecie pętle wewnątrzkomórkowe receptorów chemokin wiążą białka G, za których pośrednictwem sygnał przesyłany jest do wnętrza komórek docelowych. Również inne białka mogą odgrywać rolę w przesyłaniu sygnału. Istnieją dowody, wskazujące na możliwość wiązania podjednostek $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$ i $G\alpha_{16}$ przez receptory CXCR1 (ang. *CXC receptor 1*) i CXCR2 oraz podjednostek $G\alpha_{14}$ i $G\alpha_{16}$ przez CCR2b [9]. Przyłączenie określonej chemokiny do receptora prowadzi do aktywacji wewnątrzkomórkowej fosfolipazy C, produkcji inozytolo-1,4,5-trisfosforanu i diacyloglicerolu, wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia, aktywacji kinazy białkowej C i w konsekwencji do fosforylacji innych białek komórkowych oraz aktywacji czynników transkrypcyjnych [9, 62]. Możliwe jest również wykorzystywanie innych szlaków przekazywania sygnału przez chemokiny. Po przyłączeniu ligandu do receptorów CXCR1 (IL 8) czy CXCR2 (wszystkie chemokiny CXC zawierające motyw ELR), następuje aktywacja kinaz MAP (p42/44) [34]. Liczne dowody wskazują na możliwość aktywacji 3-kinazy fosfatydyloinozytolowej w przekazywaniu sygnału w komórkach docelowych. 3-kinaza fosfatydyloinozytolo-wa może przesyłać sygnał po wcześniejszej interakcji z małymi GTP-azami, kinazami tyrozynowymi lub podjednostkami $\beta\gamma$ białek G [9, 34]. W przypadku receptora CXCR1 aktywacji ulega także fosfolipaza D. Fosforylacja reszt seryny i treoniny w odcinkach C-końcowych receptorów chemokin koreluje ze zmniejszeniem ich zdolności do wiązania chemokin [48].

Receptory chemokin, oprócz tego że zawierają konserwatywne motywy strukturalne w obrębie domen transbłonowych, charakteryzują się: obecnością mostka disulfidowego utworzonego między cysteinami znajdującymi się w odcinku N-końcowym i w trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, który ma krytyczne znaczenie dla konformacji miejsca wiążącego ligand, obecnością znacznej ilości aminokwasów kwaśnych we fragmencie N-końcowym cząsteczek i zasadowych w trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej, zbliżoną długością łańcuchów polipeptydowych (około 350 aminokwasów) i znaczną homologią sekwencji aminokwasowych (rzędu 36–89%) [1, 9]. Dla receptorów chemokin CXC przyjęto nazwę CXCR, natomiast receptory rodziny CC określa się jako CCR.

Receptory chemokin dzielą się na cztery grupy [62]:

- 1) Receptory wiążące więcej niż jedną chemokinę z danej rodziny (np. CXCR2, CCR1, CCR2, CCR3);
- 2) Receptory wiążące specyficznie tylko jedną chemokinę (CXCR1 dla IL-8);
- 3) Receptory wiążące wszystkie chemokiny z rodzin CC i CXC, np. receptory DARC (ang. *Duffy antigen receptor for chemokines*) – na powierzchni erytrocytów i komórek śródbłonna naczyń postkapilarnych;
- 4) Receptory kodowane przez wirusy (np. US28 kodowany przez ludzki cytomegalowirus).

Rozmieszczenie receptorów na powierzchni określonych komórek jest różne. CCR, rozpoznający MIP1 α i MIP1 β , MCP-1 i RANTES, znajduje się na powierzchni monocytów, limfocytów T, komórek NK i bazofilów, natomiast CCR3, wiążący się z eotaksyną, RANTES i z MCP-3, występuje na powierzchni eozynofiliów i monocytów [42].

3.3. Działanie chemokin

Komórki, migrujące w wyniku działania chemokin, rozpoznają gradient tych polipeptydów [53, 57, 75]. Zasadowe reszty chemokin mogą wchodzić w interakcje elektrostatyczne z ujemnie naładowanymi resztami glikozaminoglikanów (GAG) obecnych na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, a także w obrębie matryks zewnątrzkomórkowej. W interakcje wchodzi reszty aminokwasów znajdujące się w C-terminalnym regionie cząsteczki chemokin [9, 68]. Mechanizm tworzenia gradientu pozostaje jednak niewyjaśniony. Po połączeniu chemokiny z receptorem na powierzchni komórki docelowej, powstający kompleks receptor-ligand ulega szybkiej internalizacji, a związana chemokina – dalszej degradacji lizosomalnej [10, 49], po czym receptor „powraca” na powierzchnię komórki. Odkrycia te doprowadziły do stworzenia modelu migracji komórek odpornościowych w kierunku ogniska zapalnego, w którym zasadnicze etapy migracji (adhezja, diapedeza i migracja komórek w przestrzeni międzykankowej) są regulowane przez chemokiny [1, 64]. Stwierdzono, że chemokiny mają wpływ na ekspresję receptorów integrzynowych w komórkach docelowych, m.in. zwiększają one ekspresję podjednostek CD11b i CD11c na powierzchni monocytów oraz podjednostki $\alpha 6$ VLA na powierzchni eozynofiliów [27, 71]. Chemokiny mogą również aktywować komórki docelowe, stymulując je do uwalniania składników wewnątrzkomórkowych ziarnistości (np. RANTES wywołuje degranulację eozyno- i bazofilów [37]) czy też indukując wybuch tlenowy (np. IL-8 po związaniu z neutrofilami [7]) lub regulując ich proliferację [5]. Chemokiny działają także jako regulatory angiogenezy. Przedstawiciele podrodziny CXC z motywem ELR (wszystkie białka tej rodziny, z wyjątkiem PF4, IP-10 i Mig) działają jako stymulatory angiogenezy, podczas gdy inne chemokiny podrodziny są jej inhibitorami [46, 56, 66], a nawet odwracają angiogenne działanie

tych pierwszych [46]. Angiogeneza może być hamowana przez ograniczanie przez chemokiny CXC dostępu czynników wzrostu do miejsc ich wiązania na powierzchni komórek docelowych [56]. Nadprodukcja angiogennych chemokin w guzach nowotworowych zwierząt doświadczalnych koreluje z przyspieszonym wzrostem tych guzów i z ich zwiększoną zdolnością do metastazy [3, 41]. Niektóre chemokiny (np. IL-8, MCP-1) ograniczają wzrost komórek nowotworowych także w inny sposób. Może być to wynikiem stymulowania przez nie napływu limfocytów T lub komórek NK w kierunku guza (w przypadku chemokin CC) albo działania jeszcze innych, niewyjaśnionych mechanizmów [43, 56, 73].

Chemokiny mają wpływ na procesy hematopoezy. Aktywują (np. SDF-1 α) lub hamują (np. MIP-1 α , IL-8, MCP-1, PF4, IP-10) proliferację komórek pnia, stymulują lub ograniczają wzrost kolonii prekursorów komórek mieloidalnych (tj. BFU-E czy CFU-GM [13,56]), działając synergistycznie albo znosząc wzajemnie swoje działanie. Ich wpływ na proliferację takich komórek nie zależy od obecności lub braku motywu ELR (niektóre chimery PF4/IL-8 są aktywne) ani od struktury typowej dla podrodziny CC, czy też CXC [21]. Skomplikowany mechanizm działania tych peptydów na hematopoezę sugeruje możliwość wykorzystywania przez nie licznych, być może nieznanych jeszcze, receptorów na powierzchni komórek docelowych [14, 56].

Sugeruje się hamowanie przez chemokiny rozprzestrzeniania się wirusa HIV w organizmie człowieka. Receptor CCR5, którego ligandami są RANTES, MIP-1 α i MIP-1 β , jest koreceptorem dla monocyto/makrofagotropowych szczepów wirusa, podczas gdy CXCR4, którego ligandem jest SDF-1, jest koreceptorem dla szczepów limfocytotropowych, indukujących powstawanie syncytiów [11, 26]. Do innych koreceptorów wirusów monocytootropowych należą CCR3 i CCR2b [17, 25]. Koreceptory, z którymi łączy się białko otoczki wirusa, gp120, są niezbędne dla jego wnikania do komórki docelowej [38, 70].

Chemokiny uczestniczą również w patogenezie niektórych chorób o podłożu immunologicznym, m.in. astmy alergicznej [68, 69], reumatoidalnego zapalenia stawów [35], kłębuszkowego zapalenia nerek [63] czy miażdżycy.

3.4. Chemokiny płytek krwi

Ludzkie płytki krwi są źródłem licznej grupy chemokin, w tym kilku specyficznych chemokin, pochodzących wyłącznie z tych komórek. Należą do nich: płytkowy czynnik 4 (PF4), chemokina RANTES, zasadowe białko płytek (PBP) oraz produkty jego rozkładu: peptyd aktywujący tkanki łącznej III (CTAP III), β -tromboglobulina (β -TG) i peptyd aktywujący neutrofile-2 (NAP-2). Fizjologiczna rola tych związków nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Wynika to m.in. z szerokiego spektrum działania tych chemokin.

Płytkowy czynnik 4 jest polipeptydem o m. cz. 7,8 kDa, zawierającym 70 aminokwasów [16, 28, 78], syntetyzowanym przez megakariocyty, a następnie zmagazynowanym w ziarnistościach α płytek krwi i uwalnianym z nich podczas aktywacji płytek. PF4 należy do rodziny chemokin CXC i nie zawiera motywu ELR, przez co jest wyjątkowo słabym chemoatraktantem dla neutrofilów [56]. W przeciwieństwie do innych chemokin, PF4 w warunkach fizjologicznych tworzy tetramer w wyniku łączenia dimerów [9, 20]. PF4 ma również zdolność wywoływania chemotaksji monocytów i fibroblastów oraz aktywacji tych ostatnich [59, 78]. Stymuluje też uwalnianie histaminy przez bazofile [12]. Sekrecja PF4 z α -ziarnistości płytek krwi ma wpływ na aktywność prokoagulacyjną pobudzonych płytek. PF4 ma bowiem zdolność do łączenia się z heparyną i związkami heparynopodobnymi w osoczu i na powierzchni komórek śródbłonna oraz do ich neutralizacji [55, 58]. Wiązanie się PF4 z sulfonowanymi glikozaminoglikuronoglikanami (GAG) obecnymi na śródbłonnku zapobiega powstawaniu kompleksów trombina - antytrombina III, i w konsekwencji zapobiega inaktywacji trombiny na powierzchni śródbłonna [51]. Za wiązanie z GAG odpowiada C-terminalny, α -helikalny fragment cząsteczki PF4, a największą rolę przypisuje się czterem resztom lizyny zlokalizowanym w tym obszarze [16]. Ta płytkowa chemokina wykazuje też wpływ na procesy hematopoezy. PF4 hamuje w sposób specyficzny i bezpośredni wzrost i różnicowanie prekursorów megakariocytów [21], działa też supresyjnie na komórki pnia w szpiku kostnym [56] oraz na prekursor erytroidalne chorych z nadpłytkowością samoistną [55]. Blokowanie wzrostu megakariocytów może zachodzić w sposób parakryny lub autokryny. Istotnym aspektem działania PF4 jest możliwość hamowania angiogenezy przez ten polipeptyd. PF4 hamuje proliferację i ogranicza migrację komórek śródbłonna, wywołaną przez naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) lub zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF ang. *basic fibroblast growth factor*) [67]. Aktywność angiostatyczna PF4 zależy od obecności C-terminalnej domeny w cząsteczce i może być zniesiona przez dodanie heparyny, nie zależy natomiast od obecności fragmentu N-końcowego [56]. Angiostatyczne efekty PF4 (i innych chemokin CXC bez motywu ELR) mogą wynikać z jego zdolności do wiązania się ze związkami heparynopodobnymi i ograniczania dostępu czynników wzrostu do ich receptorów na powierzchni śródbłonna [9], a także z możliwości wiązania się PF4 bezpośrednio z samymi czynnikami wzrostu. Ta płytkowa chemokina może łączyć się z VEGF, fizjologicznym mediatorem angiogenezy, znosząc jego aktywność [29]. Może jednak znosić również działanie skróconego analogu VEGF (VEGF₁₂₁), którego wiązaniu z receptorem nie zapobiega PF4 (i jest ono niezależne od heparyny), co wskazuje na istnienie jeszcze innych mechanizmów hamowania angiogenezy [29]. PF4 może także wpływać na regulację cyklu komórkowego w komórkach śródbłonna [30]. PF4 charakteryzuje się również właściwościami immunostymulacyjnymi [77], a nawet

antybakteryjnymi [22]. Ponadto PF4 powoduje wzrost syntezy czynnika tkankowego (TF, ang. *tissue factor*) w monocytach stymulowanych lipopolisacharydem [28].

Chemokiną, zmagazynowaną w ziarnistościach α płytek krwi i uwalnianą podczas stymulacji płytek, jest zasadowe białko płytek (PBP), którego łańcuch polipeptydowy zawiera 94 aminokwasy [1, 68]. Ma ono niską aktywność biologiczną, jest bardzo słabym chemoatraktantem dla neutrofilów. Po uwolnieniu z płytek, PBP jest substratem dla enzymów proteolitycznych, tj. chymotrypsyny czy katepsyny G, pochodzących z neutrofilów [36]; powstają skrócone pochodne. Rozszczepienie 9-go wiązania (licząc od N-końca PBP) między Argi i Asn, daje w efekcie peptyd aktywujący tkanki łącznej III (CTAP III), który stymuluje fibroblasty do produkcji glikozaminoglikanów i działa na nie mitogennie [47, 68]. CTAP III jest także słabym chemoatraktantem dla neutrofilów i stymuluje uwalnianie histaminy przez bazofile [54, 68]. Odłączenie kolejnych czterech aminokwasów od N-końca CTAP III (rozerwanie wiązania pomiędzy Liz i Gly), prowadzi do wytworzenia β -tromboglobuliny (β -TG), słabego chemoatraktanta dla fibroblastów i neutrofilów [59, 68]. CTAP III i β -tromboglobulina prawdopodobnie odgrywają rolę we wczesnych etapach gojenia ran. Odłączenie jedenastu N-końcowych aminokwasów od β -TG (proteoliza wiązania pomiędzy Tyr i Ala) prowadzi do utworzenia peptydu aktywującego neutrofile-2 (NAP-2), który wywołuje chemotaksję neutrofilów silniej niż β -TG czy CTAP III, ale 2 do 100 razy słabiej niż IL-8 [68]. NAP-2 wywołuje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia w neutrofilach i powoduje degranulację tych komórek, przez co odgrywa ważną rolę w interakcji płytek krwi z neutrofilami [72]. NAP-2 może wywoływać uwalnianie histaminy przez bazofile [54], stymuluje też włączanie znakowanej glukozaminy do glikozaminoglikanów [36]. Ponadto ma zdolność hamowania megakariocytopoezy, co czyni znacznie silniej (2–3-krotnie) niż PF4 [21]. PBP i produkty jego proteolizy zawierają motywy ELR, działają jako monomery i wiążą się z receptorami CXCR2 na powierzchni komórek docelowych.

RANTES (ang. *Regulated upon Activation Normal T-cells Expressed and Secreted*) jest zasadowym polipeptydem o m. cz. 8 kDa, składającym się z 67 aminokwasów. Jest syntetyzowany i uwalniany przez monocyty, limfocyty T, fibroblasty, komórki śródbłonna i komórki nabłonkowe wielu narządów [24, 31, 44, 60, 65]. Jest obecny również w ziarnistościach α płytek krwi, skąd jest uwalniany podczas aktywacji płytek [32]. RANTES należy do podrodziny chemokin CC i ma zdolność wiązania receptorów CCR1, CCR3, CCR4 i CCR5 [9]. Jest chemoatraktantem dla monocytów, limfocytów T i B, komórek NK, eozynofilów i bazofilów [2, 6, 37, 61]. Stymuluje on uwalnianie histaminy przez bazofile [37], zwiększa ekspresję podjednostek β 2 integrzyn (CD 11b/CD18 i CD11c/CD18) na powierzchni monocytów [71], wywołuje degranulację eozynofilów i bazofilów [37]. RANTES stymuluje też migrację eozynofilów przez śródbłonek (TEM, ang. *transendothelial eosinophil migration*), prawdopodobnie przez nasilenie ekspresji β 1-integrzyn w tych

komórkach [27], dzięki czemu odgrywa rolę w patogenezie wielu chorób o podłożu alergicznym [69]. Poza tym RANTES jest jednym z czynników hamujących rozprzestrzenianie się wirusa HIV w organizmie [26]. Płytki krwi są tylko jednym z wielu źródeł tej chemokiny, dlatego też ich rola w procesach, w których bierze udział RANTES, pozostaje jeszcze nie w pełni wyjaśniona.

LITERATURA

- [1] VAN ACKER FAA, VOSS H-P, TIMMERMAN H. Chemokines: structure, receptors and functions. A new target for inflammation and asthma therapy? *Med Inflamm* 1996; **5**: 393–416.
- [2] ALAM R, STAFFORD S, FORSYTHE P, HARRISON R, FAUBION D, LETT-BROWN M, GRANT J. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 1993; **150**: 3442–3448.
- [3] ARENBERG D A, KANKEL S L, POLVERINI PJ, GLASS M, BURDICK MD, STRIETER RM. Inhibition of interleukin 8 reduces tumorigenesis of human nonsmall cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Inv* 1996; **97**: 2792–2802.
- [4] AVALOS BR, BARTYNSKI KJ, ELDER PJ, KOTUR MS, BURTON W G, WILKIE MN. The active monomeric form of macrophage inflammatory protein-1 α interacts with high- and low-affinity classes of receptors on human hematopoietic cells. *Blood* 1994; **84**: 1790–1801.
- [5] BACON KB, PREMACK BA, GARDNER P, SCHALL TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995; **269**: 1727–1730.
- [6] BACON KB, SHALL TJ. Chemokines as mediators of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; **109**: 97–109.
- [7] BAGGIOLINI M, WYMAN MP. Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem Sci* 1990; **15**: 69–72.
- [8] BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; **55**: 97–179.
- [9] BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B. Human chemokines: an update *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 675–705.
- [10] BESEMER J, HUIJBER A, KUHN B. Specific binding, internalization and degradation of human neutrophil activating factor by human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 17409–17415.
- [11] BLEUL CC, FARZAN M, CHOE H, PAROLIN C, CLARK-LEWIS I, SODROSKI J, SPRINGER TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; **382**: 829–833.
- [12] BRINDLEY LL, SWEET JM, GOETZL EJ. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *J Clin Invest* 1983; **72**: 1218–1223.
- [13] BROXMEYER HE, SHERRY B, COOPER S, LUL, MAZE R, BECKMANN MP, CERAMI A, RALPH P. Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J Immunol* 1993; **150**: 3448–3458.
- [14] BROXMEYER H E, COOPER S, CACALANO G, HAGUE NL, BAILISH E, MOORE M W. Involvement of interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells *in vivo*: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med* 1996; **184**: 1825–1832.
- [15] BURROWS SD, DOYLE ML, MURPHY KP, FRANKLIN SD, WHITE JR, BROOKS I, MCNULTY DE, SCOTT MO, KNUTTSON JR, PORTER D, YOUNG PR, HENSLEY P.

- Determination of the monomer-dimer equilibrium of interleukin-8 reveals it is a monomer in physiological concentrations. *Biochemistry* 1994; **33**: 741–745.
- [16] BUTCHER DJ, KOWALSKA MA, LI S, LUO Z, SHAN S, LU Z, NIEWIAROWSKI S, HUANG Z. A natural motif approach to protein design: a synthetic leucine zipper peptide mimics the biological function of the platelet factor 4 protein *FEBS Letters* 1997; **409**: 183–187.
- [17] CHOE H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACKAY CR, LA ROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; **85**: 1135–1148.
- [18] CLARK-LEWIS I, DEWALD B, LOETSCHER M, MOSER B, BAGGIOLINI M. Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. *J Biol Chem* 1994; **269**: 75–81.
- [19] CLARK-LEWIS I, KIM K-S, RAJARATHNAM K, GONG J-H, DEWALD B, MOSER B, BAGGIOLINI M, SYKES BD. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leuk Biol* 1995; **57**: 703–711.
- [20] COVELL DG, SMYTHERS GW, GRONENBORN AM, CLORE G. M.: Analysis of hydrophobicity in the α and β chemokine families and its relevance to dimerization. *Protein Sci* 1994; **3**: 2064–2072.
- [21] DALY TJ, LA ROSA GJ, DOLICH S, MAIONE TE, COOPER S, BROXMEYER HE. High activity suppression of myeloid progenitor proliferation by chimeric mutants of interleukin 8 and platelet factor 4. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23282–23292.
- [22] DARVEAU RP, BLAKE J, SEACHORD CL, COSAND WL, CUNNINGHAM M D, CASSIANO-CLOUGH L, MALONEY G. Peptides related to carboxyl terminus of human platelet factor IV with antibacterial activity. *J Clin Invest* 1992; **90**: 447–455.
- [23] DEBETS R, SAVELKOUL HFJ. Cytokines as cellular communicators. *Med Inflamm* 1996; **5**: 417–423.
- [24] DEVERGNE O, MARFAING KOKA A, SCHALL TJ. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J Exp Med* 1994; **179**: 1689–1694.
- [25] DORANZ BJ, RUCKER J, YI Y, SMYTH RJ, SAMSON M, PEIPER SC, PARMENTIER M, COLLMAN RG, DORMS RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; **85**: 1149–1158.
- [26] DRAGIC T, LITWIN V, ALLAWAY GP, MARTIN SR, HUANG Y, NAGASHIMA K Y, CAYANAN C, MADDON PY, KOUP RA, MOORE JP, PAXTON W A. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; **381**: 667–673.
- [27] EBISAWA M, YAMADA T, BICKEL C, KLUNK D, SCHLEIMER R. P. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III: Effect of the chemokine RANTES. *J Immunol* 1994; **153**: 2153–2159.
- [28] ENGSTAD CS, LIA K, REKDAL O, OLSEN JO, OSTERUD B. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J Leukoc Biol* 1995; **58**: 575–581.
- [29] GENGRINOVITCH S, LEVI B, GREENBERG SM, COHEN T, GITAY GH, ROCKWELL P, MAIONE Z, NEUFELD G. Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* 1995; **270**: 15059–15065.
- [30] GENTILINI G, KIRSCHBAUM NE, AUGUSTINE JA, ASTER JA, VISENTIN GP. Inhibition of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation by the CXC-chemokine PF4 is associated with impaired downregulation of p21^{Cip1/WAF1}. *Blood* 1999; **93**: 25–33.
- [31] HEEGER P, WOLF G, MEYERS C. Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine RANTES. *Kidney Int* 1992; **41**: 220–225.

- [31a] HERBERT JM, CORSEAUX D, LALE A, BERNAT A. Hypoxia primes endotoxin-induced tissue factor ex-pression in human monocytes and endothelial cells by a PAF-dependent mechanism. *J Cell Bioch* 1996; **169**: 290–299.
- [32] HOLME PA, MULLER F, SOLUM NO, BROSSTAD F, FROLAND S. S, AUKRUST P. Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FASEB J* 1998; **12**: 79–89
- [33] HONCZARENKO M, MACHALIŃSKI B. Udział chemokin oraz receptorów chemokinowych w patogenezie zarażenia wirusem AIDS. *Post Biol Kom* 1997; **25**: 283–310.
- [34] HOWARD OMZ, BENBARUCH A, OPPENHEIM JJ. Chemokines: Progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotech* 1996; **14**: 46–51.
- [35] KOCH AE, KUNKEL SL, HARLOW LA, JOHNSON B, EVANOFF HL, HAINES GK, BURDICK MD, POPE RM, STRIETER RM Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992; **90**: 772–779.
- [36] KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E, TARNAWSKI R, GRABOWSKA-BOCHENEK R. Trombocyty a miażdżycyca. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 43–52.
- [37] KUNA P, REDDIGARI SR, SCHALL TJ, RUCINSKI D, VIKSMAN M. Y, KAPLAN AP. RANTES, a monocyte and lymphocyte chemotactic cytokine, releases histamine from human basophils. *J Immunol* 1992; **149**: 636–642.
- [38] LAPHAM CK, OUYANG J, CHANDRASEKHAR B, NGUYEN NY, DIMITROV DS, GOLDING H. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp 120 complex in human cell lines. *Science* 1996 **274**: 602–605.
- [39] LEE TH, STROMBERG R R, HEITMAN J W, SAWYER CV, HANSON AND BUSCH MP.: Distribution of HIV type 1 (HIV-1) in blood components: detection and significance of high levels of HIV-1 associated with platelets. *Transfusion* 1998; **38**: 579–588.
- [40] LORANT DE, TOPHAM MK, WHATLEY RE, MC EVER R. P., MCINTYRE TM, PRESCOTT SM, ZIMMERMAN GA.: Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993; **92**: 559–570.
- [41] LUAN J, SHATTUCK-BRANDT R, HAGHNEGAHTAR H, OWEN J, STRIETER RM, BURDICK M, NIRODI C, BEAUCHAMP D, NEWSON-JOHNSON K, RICHMOND A. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leuk Biol* 1997; **62**: 588–597.
- [42] LUSTER AD: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New Eng J Med* 1998; **338**: 436–445.
- [43] MANOME Y, WEN PY, HERSHOWITZ A, TANAKA T, ROLLINS BJ, KUFE DW, FINE HA. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene transduction: an effective tumor vaccine strategy for nonintracranial tumors. *Cancer Immunol Immunother* 1995; **41**: 227–235.
- [44] MARFAING-KOKA A, DEVERGNE O, GORGONE G. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells: synergistic induction by IFN-gamma plus TNF- α and inhibition by IL-4 and IL-13. *J Immunol* 1995; **154**: 1870–1878.
- [45] MEYER MW, GONG K, HERZBERG MC. *Streptococcus sanguis*-induced platelet clotting in rabbits and hemodynamic and cardiopulmonary consequences. *Infect Immun* 1998; **66**: 5906–5914.
- [46] MOORE BB, KEANE MP, ADDISON CL, STRIETER RM. CXC chemokine modulation of angiogenesis: The importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Inv Med* 1998 **46**: 113–120.
- [47] MULLENBACH GT, TABRIZI A, BLACHER RW, STEIMER KS. Chemical synthesis and expression in yeast of a gene encoding connective tissue activating peptide-III. *J Biol Chem* 1986 **261**: 719–722.
- [48] MURPHY PM. Molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors . *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 593–633.

- [49] NAMANTA AK, OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA T. Interleukin 8 (monocyte derived neutrophil chemoattractant factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem* 1990; **265**: 183–189.
- [50] PAOLINI JF, WILLARD D, CONSLER T, LUTHER M, KRANGEL MS. The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J Immunol* 1994; **153**: 2704–2717.
- [51] PREISSNER KT. Physiological role of vessel wall related antithrombotic mechanisms: contribution of endogenous and exogenous heparin-like components to the anticoagulant potential of the endothelium. *Haemostasis* 1990; **20**: (Suppl 1) 30–49.
- [52] RAJARATHNAM K, SYKES BD, KAY CM, DEWALD B, GEISER T, BAGGIOLINI M, CLARK-LEWIS I. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science* 1994; **264**: 90–92.
- [53] RANDOLPH GJ, FURIE MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes *in vivo*. *J Immunol* 1995 **155**: 3610–3618.
- [54] REDDIGARI S, KUNA P, MIRAGLIOTTA G. Connective tissue-activating peptide-III and its derivative, neutrophil-activating peptide-2, release histamine from human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1992; **89**: 666–672.
- [55] ROBAK T. Biologia i farmakologia cytokin. PWN, W-wa 1995.
- [56] ROLLINS BJ. Chemokines. *Blood* 1997; **90**: 909–928.
- [57] ROT A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces *in vitro* neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 303–306.
- [58] RYBAK ME, GIMBRONE MA, DAVIES PF, HANDIN RI. Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells. *Blood* 1989; **73**: 1534–1539.
- [58a] SANDERSON HM, FOX SC, ROBBINS RA, LOSCHE W, SPANGENBERG P, HEPTINSTALL S. Role of GpIIb/IIIa in platelet-monocyte and platelet-neutrophil conjugate formation in whole blood. *Platelets* 1998; **9**: 245–250.
- [59] SENIOR RM, GRIFFIN GL, HUANG JS, WALZ DA, DEUEL T. F.: Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. *J Cell Biol* 1983; **96**: 382–385.
- [60] SCHALL TJ, JONGSTRA J, DYER BJ. A human T-cell specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 1988; **141**: 1018–1025.
- [61] SHALL TJ, BACON K, TOY K, GOEDDEL DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990; **347**: 669–671.
- [62] SHALL TJ, BACON KB. Chemokines, leukocyte trafficking and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**: 865–873.
- [63] SCHLONDORFF D, NELSON PJ, LUCKOW B. Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 1997; **51**: 610–621.
- [64] SPRINGER TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995; **57**: 827–872.
- [65] STICHERLING M, KUPPER M, KOLTROWITZ F. Detection of chemokine RANTES in cytokine-stimulated human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 585–591.
- [66] STRIETER RM, POLVERINI PJ, KUNKEL SL, ARENBEG DA, BURDICK MD, KASPER J, DZUIBA J, VAN DJ, WALTZ A, MARRIOTT D, CHAN SY, ROCZNIAK S, SHANAFELT AB. The functional role of ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; **270**: 27348–27357.
- [67] STRINGER SE, GALLAGHER JT. Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulphate. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1–6.
- [68] TERAN LM, DAVIES DE. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1996; **26**: 1005–1019.

- [69] TERAN LM, NOSO N, CARROLL M, DAVIES DE, HOLGATE S, SCHRODER JM. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *J Immunol* 1996; 157: 1806–1812.
- [70] TRKOLA A, DRAGIC T, ARTHOS J, BINLEY JM, OLSON WC, ALLAWAY GP, CHENG-MAYER C, ROBINSON J, MADDON PJ, MOORE J. P. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor, CCR-5. *Nature* 1996; 384: 184–187.
- [71] VADDI K, NEWTON RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol* 1994; 153: 4721–4732.
- [72] WALZ A, MELONI F, CLARK-LEWIS I, VON TSCHARNER V, BAGGIOLINI M. $[Ca^{2+}]$ changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 279–286.
- [73] WANG J, HUANG M, LEE P, KOMANDURI K, SHARMA S, CHEN G, DUBINETT SM. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 53–58.
- [74] WILLCOX MDP, WEBB BC, THAKUR A, HARTY D. W. S.: Interactions between *Candida* species and platelets. *J Med Microbiol* 1998; 47: 103–110.
- [75] WIEDERMANN CJ, KOWALD E, REINISH N, KAEHLER CM, VON LUETTICHAU I, PATTISON JM, HUIE P, SIBLEY RK, NELSON PJ, KRENSKY AM. Monocyte haptotaxis induced by RANTES chemokine. *Curr. Biol* 1993; 3: 735–739.
- [76] YANG Y, MAYO KH, DALY TJ, BARRY JK, LA ROSA GJ: Subunit association and structural analysis of platelet basic protein and related proteins investigated by 1H NMR spectroscopy and circular dichroism. *J Biol Chem* 1994; 269: 110–118.
- [77] ZUCKER MB, KATZ I R, THORBECKE BJ, MILOT DC, HOLT J: Immunoregulatory activity of peptides related to platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2559–2567.
- [78] ZUCKER MB, KATZ IR : Platelet factor 4: production, structure, physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 693–702.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 10.05. 1999 r.

Przyjęto: 28.06. 1999 r.

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

TLENEK AZOTU JAKO REGULATOR NIEKTÓRYCH FUNKCJI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

NITRIC OXIDE AS THE REGULATOR OF SOME FUNCTIONS OF THE IMMUNE SYSTEM

Magdalena KLINK, Maciej CEDZYŃSKI

Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi

Streszczenie: Tlenek azotu (NO) jest biologicznie aktywną cząsteczką odgrywającą istotną rolę w fizjologii i patologii organizmu. Syntetyzowany jest z L-argininy przy udziale syntazy NO (NOS) obecnej w wielu komórkach układu odpornościowego, krwionośnego i nerwowego. Ostatnio dyskutuje się alternatywną (niezależną od NOS) drogę jego generowania. Działanie NO na komórki ssaków ściśle zależy od jego koncentracji w miejscu reakcji. W niskich stężeniach reguluje on homeostazę układu krwionośnego, przewodnictwo w układzie nerwowym, natomiast w wysokich wykazuje działanie prozapalne i cytotoksyczne, bezpośrednio lub za pośrednictwem aktywnych pochodnych, określanymi mianem reaktywnych form azotu (azotyn, trójtlenek azotu, nadtlenoazotyn, nitrozonadwęglan i inne). Wśród komórek zdolnych do produkcji NO wymienia się neutrofile. Egzo- lub endogenny tlenek azotu hamuje agregację, moduluje właściwości adhezyjne i chemotaktyczne tych komórek oraz wydzielanie reaktywnych form tlenu.

(Postępy Biologii Komórki 1999; 26: 775–791)

Słowa kluczowe: tlenek azotu, syntaza NO, reaktywne formy azotu, neutrofile

Summary: Nitric oxide (NO) is a highly active molecule playing a key role in physiological as well as pathological processes in the organism. This metabolite is produced from L-arginine by NO synthase (NOS) in numerous cells of immune, cardiovascular and nervous systems. Recently, the alternative, NO synthase-independent pathway of nitric oxide generation is discussed. The effect of nitric oxide on mammalian cells is closely connected with its local concentration. In the lower concentrations it acts as a neurotransmitter and is implicated in vasodilatation, while in higher shows pro-inflammatory and cytotoxic activity. The activity of nitric oxide depends mainly on its reactive intermediates (nitrite, dinitrogen trioxide, peroxynitrite, nitrozoperoxy carbonate). Among other cells, neutrophils are being considered as NO producers. Exo- as well as endogenous NO diminishes their aggregation and modulates the adhesive and chemotactic properties and liberation of the reactive oxygen species.

(Advances in Cell Biology 1999; 26: 775–791)

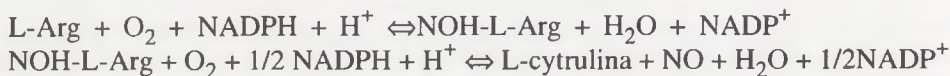
Key words: nitric oxide, NO synthase, reactive nitrogen intermediates, neutrophils

1. TLENEK AZOTU I JEGO REAKTYWNE POCHODNE

1.1. Wytwarzanie tlenku azotu

1.1.1. Produkcja tlenku azotu zależna od syntazy NO

Tlenek azotu (NO, ang. *nitric oxide*) jest biologicznie aktywną cząsteczką regulującą funkcjonowanie układu nerwowego, krwionośnego i odpornościowego. Oprócz swojej fizjologicznej funkcji NO odgrywa istotną rolę w niektórych stanach patologicznych. Nadprodukcję NO obserwuje się we wstrząsie septycznym, cukrzycy typu 1, reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym, łuszczycy, zapaleniu jelita grubego, natomiast jego obniżoną koncentrację w: arteriosklerozie, nadciśnieniu, impotencji oraz stanach zwiększonej podatności na infekcje [6, 25, 35]. Enzymem odpowiedzialnym za syntezę tlenku azotu jest syntaza NO (ang. *NO synthase*, NOS) – dioksygenaza, która w dwustopniowej reakcji, przy udziale NADPH, wprowadza tlen do L-argininy (L-Arg), w wyniku czego powstaje L-cytrulina i tlenek azotu. Związkiem pośrednim tej reakcji jest N^ω-hydroksy-L-arginina (NOH-L-Arg) (rys. 1).



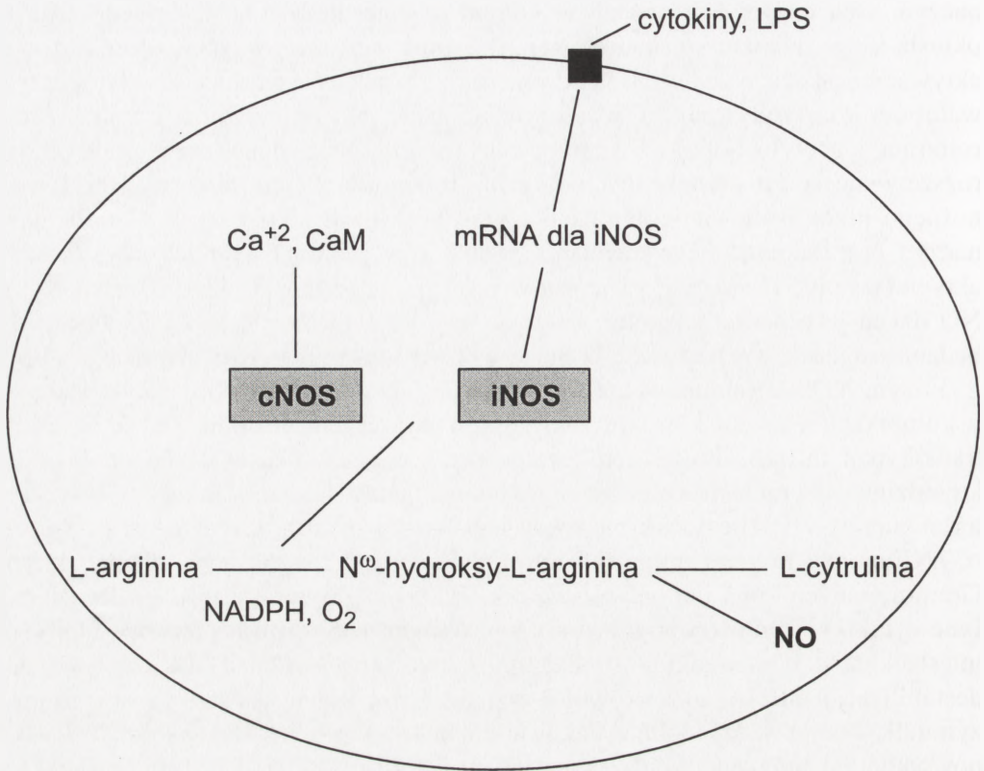
Aktywność NOS uzależniona jest od obecności licznych kofaktorów: dwunukleotydu flawinoadeninowego (FAD), mononukleotydu flawinowego (FMN), tetrahydropteryny (H₄B). Enzym ten wykryto po raz pierwszy w mysich komórkach śródbłonna i makrofagach. Późniejsze badania udowodniły jednak, iż wiele rodzajów komórek, różnych gatunków ssaków: myszy, szczurów, bydła i człowieka wykazuje zdolność do syntezy tlenku azotu [25, 35].

Obecnie przyjmuje się, że syntaza NO występuje w trzech izoformach: NOS-I, NOS-II i NOS-III, które są produktami różnych genów. Izoenzymy NOS różnią się masą cząsteczkową, sekwencją aminokwasów, zależnością aktywacji od wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, mają też różne mechanizmy regulacji ekspresji na poziomie transkrypcji. Każda z nich zawiera wspólne komponenty: domenę katalityczną, wiążącą hem, H₄B i L-Arg (na N-końcu); domenę wiążącą FMN, FAD i NADPH (na C-końcu); oraz region wiążący kalmodulinę [5, 6]. NOS-I (neuronowa NOS, ang. *neuronal NOS*, nNOS) występuje przede wszystkim w neuronach centralnego i obwodowego układu nerwowego. NOS-III (endotelialna NOS, ang. *endothelial NOS*, eNOS) znajduje się głównie w błonie komórkowej śródbłonna

naczyń. Oba enzymy są obecne w komórkach niezależnie od ich pobudzenia i określa się je mianem konstytutywnej NOS (ang. *constitutive NOS*, cNOS), a ich aktywacja jest ściśle uzależniona od jonów Ca^{2+} oraz kalmoduliny. Znanymi aktywatorami konstytutywnej NOS są czynniki, takie jak: bradykinina, trombina, serotonina i acetylocholina. Syntetyzowany przez eNOS tlenek azotu powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych. Reguluje również funkcjonowanie układu krwionośnego przez hamowanie agregacji płytek krwi i ich adherencji do śródbłonna naczyń oraz hamowanie wydzielania mediatorów zapalnych, takich jak czynnik aktywujący płytki krwi (ang. *platelet activating factor*, PAF). W układzie nerwowym NO działa jako neurotransmitter, hamując jego pobudzenie [3, 5, 7, 12]. Niektóre badania sugerują również, iż NO może wpływać na proces rozwoju mózgu [12].

Enzym NOS-II (indukowalna NOS, ang. *inducible NOS*, iNOS) nie występuje w komórkach w sposób konstytutywny, a jego ekspresja uzależniona jest od indukcji transkrypcji mRNA. Proces ten regulowany jest przez sieć cytokinową. Po kilkugodzinnej stymulacji komórek cytokinami, takimi jak: interferony – IFN, interleukina 1 – IL-1, czynnik martwicy nowotworu α (ang. *tumor necrosis factor* α , TNF- α), czy drobnoustrojami lub ich produktami, np. lipopolisacharydami bakterii Gram-ujemnych (ang. *lipopolysaccharide* – LPS), wykrywa się mRNA dla iNOS. Inne cytokiny: czynnik wzrostowy β (ang. *transforming growth factor* β , TGF- β), interleukina 4 i interleukina 10 hamują wytwarzanie iNOS. TGF- β wpływa na destabilizację mRNA, może również wzmagać degradację zsyntetyzowanego enzymu. IL-4 najprawdopodobniej działa na etapie transkrypcji białka, natomiast IL-10 powoduje zahamowanie wydzielania IFN- γ i TNF- α [2, 5, 35, 47]. Aktywność indukowalnej syntazy NO jest niezależna od jonów Ca^{2+} i kalmoduliny. Do jej ekspresji dochodzi głównie w komórkach linii monocytarno-makrofagowej, neutrofilach, hepatocytach, astrocytach, fibroblastach, komórkach epitelialnych. Syntetyzowany przez iNOS tlenek azotu bierze udział w szeroko pojętej immunoregulacji, jak również w wielu reakcjach patologicznych, w których obserwuje się jego nadprodukcję [2, 25, 35].

Nie do końca poznany jest mechanizm sygnału transdukcyjnego koniecznego do zainicjowania transkrypcji mRNA dla iNOS. Wiadomo jednak, że stymulacja komórek cytokinami lub lipopolisacharydami powoduje aktywację kinazy tyrozynowej i kinazy serynowej, które aktywują następnie jądrowy czynnik transkrypcyjny – κB (ang. *nuclear factor* κB , NF- κB). NF- κB wydaje się być niezbędny w zainicjowaniu procesu transkrypcji [2, 13]. Regulacja syntezy iNOS na poziomie genetycznym została lepiej poznana. Na podstawie badań prowadzonych na mysich makrofagach stwierdzono, że w regionie promotorowym genu odpowiedzialnego za syntezę iNOS występują dwa oddzielne regiony regulatorowe. Region I (IFR-I) zawiera miejsca wiążące jądrowy czynnik transkrypcyjny dla interleukiny 6 (NF-IL-6) oraz NF- κB , co wskazuje, że region ten reguluje ekspresję iNOS indukowaną przez LPS. W regionie tym występuje również miejsce wiążące czynnik trans-



RYSUNEK 1. Schemat wytwarzania tlenku azotu przy udziale syntazy NO: cNOS – konstytutywna syntaza NO; iNOS – indukowalna syntaza NO; CaM – kalmodulina; LPS – lipopolisacharyd

krypcyjny dla interferonu γ (IFN- γ) – Stat1 α . Region II (IFR-II) zawiera miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny Stat1 α i NF- κ B. Liczne doniesienia sugerują, że IFR-II bezpośrednio nie reguluje ekspresji NOS, lecz wzmacnia aktywność IFR-I [3, 18, 25, 31, 40]. Przyjmuje się, że maksymalna ekspresja iNOS w mysich makrofagach wymaga ich stymulacji za pomocą LPS i IFN- γ , natomiast do indukcji iNOS w komórkach ludzkich konieczne są również inne cytokiny: TNF- α , IL-1 β , granulocyto-makrofagowy czynnik stymulujący wzrost kolonii (ang. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF). Ponadto komórki ludzkie w porównaniu z mysimi syntetyzują znacznie mniejsze ilości NO. mRNA dla iNOS można wykryć już po około 4 godzinach stymulacji, a w ciągu kolejnych 24 godzin obserwuje się powolne obniżanie jego poziomu [25, 35]. Porównanie podstawowych cech różnicujących izoforny NOS przedstawiono w tabeli 1.

Do najlepiej poznanych i najczęściej stosowanych związków hamujących syntezę NO należą analogi (pochodne) L-argininy, które blokują aktywność zarówno konstytutywnej, jak i indukowalnej NOS (tab. 2). Większość opisanych związków silnie

TABELA 1. Właściwości izoform NOS

| | Izoforma | | |
|----------------------------|--|--|---|
| | NOS-I | NOS-III | NOS-II |
| Występowanie | komórki nerwowe płytki krwi komórki nabłonka komórki trzustki | komórki śródbłonka komórki nerwowe komórki mięśniowe | makrofagi komórki endotelialne chondrocyty hepatocyty komórki mięśni gładkich neutrofile |
| Stymulatory | insulina trombina | acetylocholina trombina ADP | LPS TNF- α IFN- γ interleukina 1 |
| Lokalizacja (chromosom) | 12 | 7 | 17 |

wpływa na aktywność cNOS niż iNOS. Zahamowanie syntezy tlenu azotu przy ich zastosowaniu może być procesem odwracalnym jak w przypadku N^ω-nitro-L-argininy (L-NNA) lub całkowicie nieodwracalnym, jak np. dla L-iminoetylo-L-ornityny (L-NIO) [3, 25, 47].

Prowadzi się też poszukiwania innych inhibitorów NOS. Interesujące wydają się badania Venturini i wsp. [50], którzy wykazali, iż będąca inhibitorem proteiny serynowej apronityna może również hamować aktywność NOS-I i NOS-II, jakkolwiek mechanizm jej działania nie został dotychczas wyjaśniony. Apronityna obecna jest w mózgu, płucach, śledzionie, trzustce, tkankach, w których obserwuje się akumulację komórek tłuszczowych oraz w plazmie krwi i innych płynach ustrojowych. Można zatem przypuszczać, że w warunkach *in vivo* istnieje system autoregulacji aktywności syntazy NO. Wcześniejsze prace prowadzone na mysich makrofagach otrzewnowych i mysiej linii makrofagowej RAW 264.7 wskazują, że inne inhibitory proteinaz serynowych: TPCK (ang. *N- α -tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone*) i TLCK (ang. *N- α -tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone*) również wykazują zdolność hamowania syntezy tlenu azotu. Przypuszcza się, że TPCK i TLCK działają poprzez blokowanie translokacji NF- κ B do jądra komórkowego [21]. Ponadto wśród inhibitorów iNOS można wyróżnić związki naturalnie występujące w organizmie np: poliaminy (spermina) [43, 45] czy też glikokortykosteroidy [12, 47].

1.1.2. Produkcja tlenu azotu niezależna od NOS

Coraz częściej zwraca się uwagę na inne niż przy udziale syntazy NO drogi wytwarzania tlenu azotu. W literaturze szeroko dyskutuje się mechanizmy syntezy

TABELA 2. Najczęściej stosowane analogi L-argininy – inhibitory NOS

| Inhibitor | Specyficzność | Działanie |
|--|---------------|-----------------------------|
| L-NMMA (N ^ω -monometylo-L-arginina) | cNOS iNOS | odwracalne odwracalne |
| L-NNA (N ^ω -nitro-L-arginina) | cNOS iNOS | nieodwracalne odwracalne |
| L-NAME (ester metylowy N ^ω -nitro-L-argininy) | cNOS iNOS | nieodwracalne odwracalne |
| L-NAA (N ^ω -amino-L-arginina) | cNOS iNOS | odwracalne odwracalne |
| L-NIO (N-iminoetylo-L-ornityna) | cNOS iNOS | odwracalne nieodwracalne |
| L-NIL (N ^ω -iminoetylo-L-lizyna) | iNOS | nieodwracalne |

NO pod wpływem innych niż NOS enzymów, jak również powstawania tego aktywnego metabolitu bez udziału enzymów.

Xia i Zweier [58] sugerują, że NOS nie syntetyzuje bezpośrednio NO ale jon NO^- , który następnie, pod wpływem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), ulega konwersji do NO. Tlenek azotu może również powstawać bez obecności NOS. Samouliov i wsp. [41] zaobserwowali, iż w warunkach kwaśnych, przy niedotlenieniu tkanek dochodzi do wzrostu koncentracji tlenu azotu, którego prawdopodobnym źródłem jest redukcja lub dysproporcjonowanie jonu NO_2^- . Warto podkreślić, że azotyn jest nie tylko produktem przemian NO, ale może być też substratem do jego wytwarzania. Sugeruje się, że azotyn może ulegać redukcji do NO przy udziale oksydazy ksantynowej (XO), w obecności NADH jako źródła elektronów [61]. Enzym ten zawiera molibden, który najprawdopodobniej oddziałuje z NO_2^- i FAD, wchodzącym w reakcję z NADH. Redukcja azotynu do NO przy pomocy XO może zachodzić zarówno w obecności tlenu, jak i w warunkach beztlenowych, co sugeruje, że ten sposób wytwarzania tlenu azotu może mieć szczególne znaczenie w przypadku miejscowego niedotlenienia tkanek. Ostatnie doniesienia Nagase i wsp. [32] wskazują, że NO może być również produkowany w sposób całkowicie niezależny od enzymów, z L- lub D-argininy przy udziale nadtlenu wodoru (H_2O_2). W tym przypadku, substratem, z którego powstaje NO może być grupa aminowa lub guanidynowa aminokwasu. Źródłem tlenu azotu może być również hydroksylamina (HA) będąca naturalnym produktem komórek ssaków. HA podobnie jak NO aktywuje cyklazę guanylową, co prowadzi do rozkurczu mięśni ścian naczyń krwionośnych. Degradacja hydroksylaminy do NO może zachodzić w obecności komórek jak i w środowisku bezkomórkowym [46, 51]. Można zatem rozpatrywać różnorodne możliwości tworzenia tlenu azotu w sposób niezależny od NOS, jednakże istnienie

drogi alternatywnej, jej mechanizmy i znaczenie w warunkach *in vivo* nadal budzą kontrowersje.

1.2. Mechanizm działania tlenu azotu

Mimo wielu intensywnych badań mechanizm działania NO na poziomie komórkowym nadal nie jest do końca poznany. Tlenek azotu jako drobna cząsteczka o dużej lipofilności łatwo przenika przez błonę komórkową drogą pozareceptorową i wywołuje liczne efekty bezpośrednio wewnątrz komórki. Wiadomo, że NO wykazuje duże powinowactwo do biologicznie czynnych związków zawierających metale. Dobrze poznana jest zdolność NO do interakcji z grupą hemową białek. Reakcja z tą grupą w cyklicznym guanylowym powoduje wzrost poziomu cyklicznego GMP (cGMP) w komórkach. Produkt ten odpowiedzialny jest między innymi za rozkurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych [35, 55]. Innym, wrażliwym na działanie tlenu azotu białkiem zawierającym hem jest cytochrom P450. Przyłączenie NO do tego enzymu powoduje jego inaktywację, co może mieć istotne patologiczne konsekwencje w przebiegu wstrząsu septycznego. Zahamowanie funkcji cytochromu P450 w wątrobie osłabia zdolność organizmu do metabolizowania leków stosowanych w zwalczaniu infekcji [55]. Ponadto tlenek azotu oddziałuje bezpośrednio z oksyhemoglobina, w wyniku czego powstaje methemoglobina i azotan (NO_3^-).



Reakcja ta jest kluczowym mechanizmem kontrolującym stężenie NO w organizmie [55].

Tlenek azotu reaguje również z niektórymi białkami uczestniczącymi w przekazywaniu sygnału transdukcji (p21ras, kinaza białkowa C, czynnik transkrypcyjny OxyR) powodując bezpośrednie nitrozowanie zawartej w nich tyrozyny. Proces ten moduluje fosforylację tyrozyny i w ten sposób wpływa na funkcje białek [5]. Nitrozowanie tyrozyny może zachodzić w obecności tlenu jak i w warunkach beztlenowych, przy udziale innych akceptorów elektronów [37, 49]. Ponadto tlenek azotu ułatwia kowalencyjne przyłączenie ADP-rybozy do białek, np. do aktywnego G w neutrofilach, co blokuje jej polaryzację, a w efekcie hamuje migrację, adhezję i właściwości fagocytarne tych komórek [5, 35].

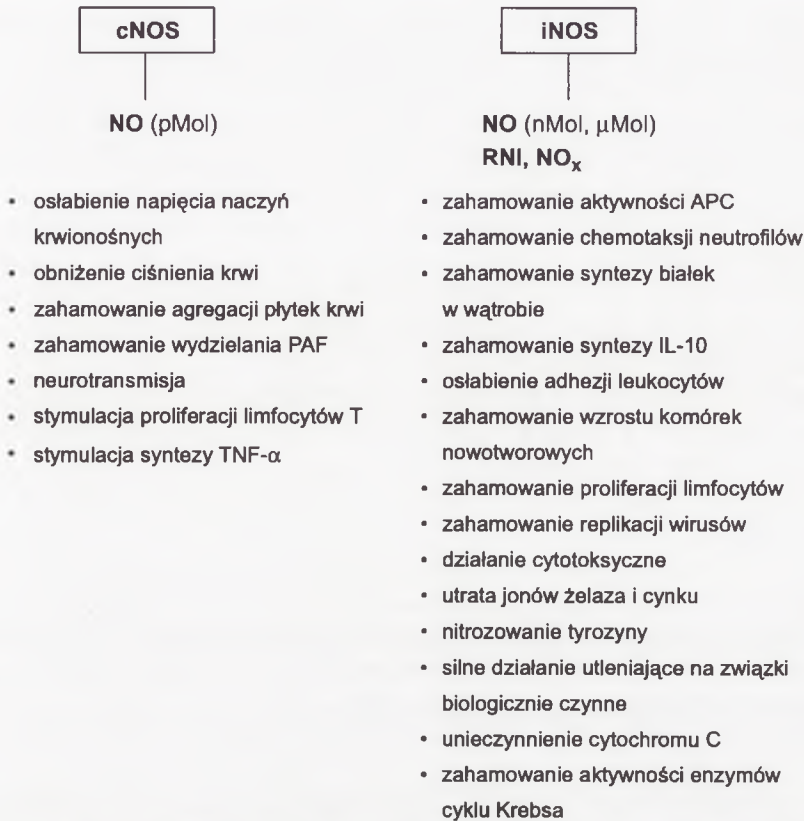
Mechanizm cytotoksycznego działania NO jest bardzo złożony i nie do końca wyjaśniony. Wiadomo, że tlenek azotu indukuje utratę jonów żelaza z komórek i inaktywuje enzymy oksydoredukcyjne zawierające żelazo połączone z siarką, np. kompleks I i II mitochondrialnego łańcucha oddechowego czy akonitazy cyklu kwasów trójkarboksylowych. NO powoduje też uwalnianie cynku z białek komórkowych przez nitrozowanie siarki związanej z tym metalem [12, 25, 55]. Może ponadto uszkadzać DNA w wyniku bezpośredniej reakcji oraz hamować procesy

jego naprawy. W pierwszym przypadku, w warunkach tlenowych powoduje pęknięcia łańcucha, jak również dezaminację cytozyny, adeniny i guaniny [55].

Omawiany, aktywny metabolit odgrywa również istotną rolę w modulowaniu zaprogramowanej śmierci komórki – apoptozie. Niskie stężenie NO ma działanie protekcyjne, między innymi przez aktywację cGMP, natomiast wysokie – ułatwia apoptozę makrofagów oraz eliminację autoreaktywnych tymocytów o fenotypie $CD4^+/CD8^+$. Tlenek azotu indukuje też apoptozę niektórych komórek nowotworowych, np. mastocytoma czy mięsaka [5, 14, 24, 55]. Głównymi mechanizmami oddziaływania NO na procesy programowanej śmierci komórki wydają się być: zdolność do regulacji ekspresji białka p53, aktywacji polimerazy ADP-rybozy i nitrozowania białek biorących udział w tym procesie [5, 42, 55]. NO jest znanym mediatorem uszkodzenia komórek beta wysp Langerhansa trzustki w insulinozależnej cukrzycy typu I (ang. *insuline-dependent diabetes mellitus* IDDM). Stymulowane cytokinami makrofagi jak również same komórki beta produkują duże ilości tlenu azotu, co prowadzi do uszkodzenia, a w konsekwencji śmierci tych ostatnich. Delaney i Eizirik [9] uważają, że bójcze działanie NO w tym przypadku może być związane z inaktywacją mitochondrialnej akonitazy komórek trzustki, co hamuje procesy oddechowe i co się z tym wiąże – wytwarzanie ATP. Nie wyklucza się też, że tlenek azotu zaburza inne procesy transportu elektronów w mitochondriach. Wykazano ponadto uszkodzenia DNA w jądrach szczurzych i ludzkich komórek beta pod wpływem NO. Śmierć komórek następuje w drodze apoptozy, nie wyklucza się jednak faktu, że w niektórych przypadkach może dochodzić do nekrozy [8, 9]. Flodstrom i wsp. [15] w badaniach z użyciem defektywnych myszy nie wytwarzających indukowalnej syntazy NO wykazali, że opisane wyżej procesy są zależne od iNOS.

Tlenek azotu oddziałuje również z wolnymi tiolami tworząc S-nitrozotiole, które mogą brać udział w przekazywaniu sygnału transdukcyjnego i wykazują silne działanie cytotoksyczne [5].

Fizjologiczna i patologiczna rola tlenu azotu w organizmie ściśle wiąże się z jego koncentracją w miejscu reakcji (rys. 2). NO syntetyzowany w „fizjologicznych” (pikomolowych) ilościach (przez cNOS) wystarcza do wzbudzenia sygnału transdukcyjnego w komórkach. Stymuluje proliferację limfocytów, produkcję TNF- α , wzmacnia aktywność kinazy tyrozynowej p56, powoduje relaksację naczyń krwionośnych i działa jako neurotransmitter. Natomiast tlenek azotu w ilościach nanolub mikromolowych (syntetyzowany przez iNOS) szeroko oddziałuje na funkcje wielu komórek immunologicznie kompetentnych oraz spoza układu odpornościowego. Najlepiej poznane jest jego działanie prozapalne i cytotoksyczne. NO w wysokich stężeniach hamuje między innymi: aktywność komórek prezentujących antygen, proliferację limfocytów T, chemotaksję neutrofilów, syntezę wielu białek w hepatocytach, produkcję interleukiny 10, wzrost komórek nowotworowych. Osłabia też zależną od selektyn adhezję limfocytów, co wpływa na obniżenie liczby



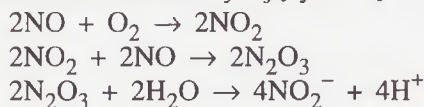
RYSUNEK 2. Schemat przedstawiający fizjologiczną i patologiczną rolę tlenku azotu w organizmie, RNI – reaktywne formy azotu; NIO $_x$ – reaktywne tlenki azotu

tych komórek w miejscu zapalenia. Ponadto wytwarzany przez iNOS tlenek azotu powoduje zahamowanie ekspresji genu dla IL-2 i nasilenie syntezy IL-4 w limfocytach T indukując w ten sposób ich proliferację w kierunku TH2. NO wywiera również działanie bójcze lub statyczne w stosunku do wielu bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz hamuje replikację DNA wirusowego [5, 12, 24, 25].

1.3. Reaktywne pochodne tlenku azotu

Uważa się, że tlenek azotu wywołuje znaczące efekty biologiczne nie tylko *per se*, ale także po przekształceniu w reaktywne pochodne. W warunkach bez-tlenowych NO jest związkiem trwałym, jednakże w natlenionych płynach fizjologicznych ulega utlenieniu do różnych bardziej lub mniej aktywnych produktów (określanych jako reaktywne formy azotu, ang. *reactive nitrogen intermediates*, RNI lub tlenki azotu, NO $_x$) [12]. Jednym z podstawowych metabolitów NO jest

azotyn, który powstaje w kilkustopniowej reakcji z wytworzeniem szeregu związków pośrednich charakteryzujących się różnym stopniem reaktywności.

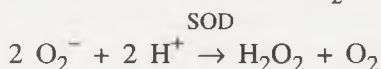


Szczególne znaczenie przypisuje się trójtlenkowi azotu (N_2O_3) wykazującemu dużą zdolność do nitrozowania grup aminowych i tiolowych [20, 44]. Azotyn przy udziale mieloperoksydazy i laktoperoksydazy, w obecności nadtlenu wodoru, może ulec utlenieniu do rodnika NO_2^{\cdot} , który bierze udział w nitrozowaniu tyrozyny podczas toczącego się procesu zapalnego [52].

W wyniku reakcji NO z anionem ponadtlenkowym (O_2^-) powstaje jon nad-tlenoazotynowy (ONOO^-), uważany za główny mediator cytotoksycznego działania tlenu azotu na komórki i tkanki.



Reakcja tworzenia się ONOO^- (zarówno wewnątrz komórki, jak i w środowisku zewnątrzkomórkowym) uzależniona jest od stężenia jonów O_2^- , a co się z tym wiąże, kontrolowana jest przez dysmutazę ponadtlenkową, która katalizuje powstawanie nadtlenu wodoru z O_2^- i H^+ [1, 44].



Nadtlenoazotyn jest produktem aktywacji różnych komórek (makrofagi, neutrofile, komórki Kupffera, endotelialne). Prawdopodobnie powstaje on w mitochondriach, w których produkowany jest też anion ponadtlenkowy [1, 44]. ONOO^- wykazuje silne działanie utleniające w stosunku do wielu biologicznie czynnych związków: lipidów, białek czy tioli. Szczególną wrażliwość na działanie ONOO^- wykazują: czynnik transdukcji zawierający w swoim centrum aktywnym cynk oraz peroksydaza glutationowa, uznawana za najważniejszy enzym o działaniu antyoksydacyjnym [44]. Nad-tlenoazotyn powoduje również nitrozowanie białek zawierających tyrozinę, co może prowadzić do utraty ich funkcji i w konsekwencji zmian patologicznych. Ponadto omawiany jon, w większym niż tlenek azotu stopniu, hamuje aktywność enzymów kompleksu I i II mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz akonitazy cyklu kwasów trójkarboksylowych. Wpływa również na transport kationów jedno- i dwuwartościowych przez błony biologiczne. Znane są jego silne właściwości bójcze w stosunku do licznych bakterii i pierwotniaków: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* [1, 35].

Obecność dwutlenku węgla (CO_2) powoduje gwałtowne nasilenie nitrozowania tyrozyny w komórkach. Katalityczne działanie tego czynnika polega na jego przyłączeniu do jonu nadtlenoazotynowego, w wyniku czego powstaje pochodna ONOOCO_2^- (nitrozonadwęglan, ang. *nitrozoperoxy carbonate*), której właściwości nitrozowania tyrozyny są prawdopodobnie znacznie silniejsze niż ONOO^- . ONOOCO_2^- jest związkiem bardzo nietrwałym i prawie natychmiast ulega degradacji do CO_2 i NO_3^- [10, 19, 44].



W pH o wartościach fizjologicznych jon nadtlenoazotynowy jest protonowany, w wyniku czego powstaje kwas nadtlenoazotynowy (ONOOH), który w porównaniu z anionem jest jeszcze silniej reaktywnym metabolitem. Może on ulegać degradacji do innych, wysoce aktywnych produktów – rodników: HO^\cdot i NO_2^\cdot lub jonów: OH^- i NO_2^+ [1].

Ostatnie badania Nappi i Vass [33] sugerują, że tlenek azotu może wchodzić w reakcję z nadtlenkiem wodoru, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia rodników HO^\cdot , które oddziałują ze związkami organicznymi i połączonymi z nimi metalami powodując ich nieodwracalne utlenienie.

2. TLENEK AZOTU W PATOFIZJOLOGII NEUTROFILÓW

2.1. Produkcja NO przez neutrofile

Reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen intermediates*, ROI): H_2O_2 , O_2^- , HO^\cdot uważane są za jedne z najstojniejszych czynników odpowiedzialnych za uszkodzenie tkanek w miejscu zapalenia. Neutrofile (leukocyty wielojądrzaste – ang. *polymorphonuclear leukocytes*, PMNs) są ich głównymi producentami [48, 53]. Ostatnio zwraca się uwagę na udział RNI i NO_x w zależnej od PMNs destrukcji tkanek.

Wiadomo, że neutrofile szczurze i mysie wykazują ekspresję iNOS i produkują duże ilości tlenu azotu w odpowiedzi na stymulację cytokinami zapalnymi i (lub) lipopolisacharydami bakteryjnymi. Natomiast wytwarzanie tlenu azotu przez neutrofile izolowane z krwi obwodowej człowieka wydaje się być kontrowersyjne. Yan i wsp. [59] przy użyciu bardzo czułej metody izotopowej stwierdzili, że aktywacja ludzkich PMNs za pomocą LPS i znanych mediatorów reakcji zapalnej (IL-1, IFN- γ) nie wzbudza ekspresji iNOS, tak jak ma to miejsce w przypadku komórek mysich. Zaobserwowano też, że neutrofile krwi obwodowej zdrowych dawców nie reagują zwiększoną produkcją NO w odpowiedzi na stymulację różnymi endotoksynami, niezależnie od czasu hodowli i użytej dawki LPS. W badaniach tych ilość uwalnianego NO oznaczano kolorymetryczną metodą Griess'a [23]. Larfars i Gyllenhammar [26] sugerują jednak, że neutrofile produkują tlenek azotu w odpowiedzi na stymulację

PMA (ang. *phorbol 12-myristate,13-acetate*, ester forbolu) i fMLP (ang. *formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*, chemotaktyczny oligopeptyd), przy czym w przypadku tego ostatniego, efekt ten obserwuje się jedynie w obecności jonów wapnia. Autorzy ci określali ilość wydzielanego tlenu azotu metodą elektrochemiczną oceniając zdolność NO do utleniania oksyhemoglobiny do methemoglobiny. Podobnie, Wright i wsp., [57] udowadniają, że ludzkie neutrofile hodowane w obecności stymulatorów wybuchu tlenowego (PMA, fMLP, opsonizowany zymozan) wydzielają NO. Natomiast Klebanoff i Nathan [22] zaobserwowali, że neutrofile aktywowane za pomocą PMA produkują NO, ale jedynie w obecności katalazy i azydku sodu. Aktywność ta nie ulega zahamowaniu przez inhibitor NOS – N^ω-monometylo-L-argininę (NMMA). Autorzy sugerują w związku z tym obecność niezależnej od NOS produkcji tlenu azotu przez neutrofile ludzkie. Przypuszcza się, że NO może pochodzić z konwersji azydru przez katalazę w obecności nadtlenu wodoru, który jest wydzielany przez neutrofile w odpowiedzi na stymulację PMA. Należy jednak zwrócić uwagę, że Bryant i wsp. [4] zidentyfikowali aktywność syntazy NO w ludzkich neutrofilach oraz otrzymali oczyszczony preparat tego enzymu. Sprzeczne wyniki uzyskane w różnych laboratoriach i wynikające z nich kontrowersyjne wnioski mogą wynikać z odmienności stosowanych metod oznaczania tlenu azotu (bezpośrednia detekcja NO₂⁻ w supernatantach pochodzących, oznaczanie aktywności syntazy NO lub obecności mRNA dla iNOS itd). Trudności w bezpośredniej detekcji NO₂⁻ mogą wynikać z różnych przyczyn:

1. Stymulowane neutrofile produkują duże ilości wolnych rodników tlenowych, które wchodzi w reakcje z NO, tworząc np. jon nadtlenuazotynowy, niewykrywalny powszechnie stosowaną metodą Griess'a. Sugeruje się zatem stosowanie katalazy wraz z SOD do hodowli PMNs w celu uniemożliwienia tworzenia się ROI. SOD jest, jak wiadomo, odpowiedzialna za unieczynnienie jonu ponadtlennego, natomiast katalaza ułatwia reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru do H₂O i O₂ [27, 34, 39].
2. Azotyn może ulegać konwersji do NO₂Cl i NO₂' w drodze zależnej od mieloperoksydazy, produkowanej w dużych ilościach przez PMNs [54].
3. NO może reagować z nisko- i wysokocząsteczkowymi tiolami, co hamuje jego przekształcanie do NO₂⁻ [54].
4. Rodzaj czynnika stymulującego komórki może wpływać na ilość i rodzaj produkowanych metabolitów [39].

Większość autorów podkreśla fakt, że ludzkie PMNs wytwarzają bardzo niewielkie ilości tlenu azotu [26, 30, 57], jednakże w miejscu reakcji zapalnej, gdzie komórki te gromadzą się masowo, stężenie wydzielanego NO może osiągać poziom wywołujący efekt biologiczne znaczący [34].

2.2. Oddziaływanie tlenu azotu na funkcje neutrofilów

Tlenek azotu wydzielany przez komórki w miejscu reakcji zapalnej może działać jako czynnik anty- lub prozapalny, modulujący odpowiedź organizmu. Jego stężenie w miejscu reakcji i, co się z tym wiąże, wywierany efekt, uzależnione są od zachowania lub zachwiania równowagi między izoformami NOS [56]. Ponieważ w toczącym się procesie zapalnym niezwykle ważną rolę odgrywają neutrofile, wpływ NO na ich funkcje wydaje się mieć istotne znaczenie. Jedną z najważniejszych aktywności neutrofilów jest wybuch tlenowy, toteż w wielu laboratoriach ocenia się udział tlenu azotu w wydzielaniu ROI. Praca Nath i Powledge [34] sugeruje, że NO w znacznym stopniu moduluje aktywność PMNs stymulowanych takimi czynnikami zapalnymi jak LPS i fMLP. Zaobserwowano, iż tlenek azotu pochodzący z egzogennych donorów hamuje agregację PMNs i produkcję O_2^- przez te komórki, natomiast w obecności inhibitorów NOS obserwuje się nasilenie wytwarzania O_2^- przez te komórki. Forslund i Sundqvist [16] zaobserwowali, że niewielkie dawki nitroprusydku sodu (ang. *sodium nitropruside*, SNP) będącego donorem NO wzmagają wydzielanie rodników tlenowych przez PMNs w odpowiedzi na stymulację PMA lub kolagenem, nie wpływają natomiast na komórki pobudzone fMLP. Wysokie dawki SNP hamują chemiluminescencję komórek prawdopodobnie przez inaktywację oksydazy NADPH. Podobne obserwacje przedstawili Pieper i wsp. [38] podkreślając, że działanie stymulujące lub hamujące tlenu azotu na wydzielanie wolnych rodników tlenowych przez PMNs aktywowane opsonizowanym zymozanem zależy od stężenia użytych donorów NO.

Jedna z hipotez zakłada, że interakcja między NO i O_2^- jest jednym z kluczowych mechanizmów decydujących o patofizjologii neutrofilów zapalnych. Wiadomo, że NO w postaci jonu nadtlenuazotynowego jest czynnikiem działającym wysoce destrukcyjnie na komórki i tkanki. Z drugiej jednak strony sugeruje się, że tlenek azotu może odgrywać istotną rolę jako antyutleniacz w stosunku do anionu ponadtlenkowego. Endogennie produkowany NO hamuje aktywność oksydazy NADPH zlokalizowanej w błonie komórkowej ograniczając tym samym powstawanie anionu ponadtlenkowego i w konsekwencji nadtlenuazotynowego w neutrofilach [39].

Z wybuchem tlenowym wiąże się bezpośrednio zdolność neutrofilów do chemotaksji w kierunku czynnika zapalnego i do wewnątrzkomórkowego zabijania drobnoustrojów [60]. Zaobserwowano, że zahamowanie wydzielania tlenu azotu nie wpływa na te podstawowe funkcje omawianych komórek. Traktowanie neutrofilów inhibitorami iNOS i cNOS nie osłabiało ani ich zdolności chemotaktycznych [28] ani zdolności do zabijania bakterii z rodzajów *Staphylococcus* i *Serratia* [29]. Jednakże nie wiadomo, czy NO wydzielany przez inne komórki w miejscu reakcji zapalnej nie moduluje zdolności neutrofilów do fagocytozy i eliminacji patogenów. Tlenek azotu generowany przez komórki endotelialne w trakcie zapalenia może wpływać na funkcje PMNs między innymi przez wzmożenie ich aktywności pro-

zapalnej. Van Dervot i wsp. [11] zaobserwowali, że synteza TNF- α przez neutrofile stymulowane lipopolisacharydem wzrasta znacząco w obecności egzogenego źródła tlenu azotu – SNP.

Wśród innych istotnych funkcji PMNs można wyróżnić adhezję komórek do śródbłonna naczyń, poprzedzającą ich migrację przez ścianę naczynia w odpowiedzi na czynnik chemotaktyczny [60]. Tlenek azotu może modulować ten proces, choć jego działanie nie jest do końca sprecyzowane. Praca Fukatsu i wsp. [17] sugeruje, że dożylnie podanie szczerom donoru NO – SNAP (ang. *S-nitroso-acetyl-penicillamine*) powoduje osłabienie adhezji PMNs w płucach i wątrobie. Okayama i wsp. [36] wykazali jednak, że dodany do hodowli, egzogeny tlenek azotu nie wpływa na adhezję PMNs do komórek endotelialnych, a w obecności nadtlenu wodoru może ją nasilać.

LITERATURA

- [1] BARTOSZ G. Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide. *Acta Biochim Pol* 1996; **43**: 645–660.
- [2] BOGDAN CH, ROLLINGHOFF M, VODOVOTZ Y, XIE Q, NATHAN C. Regulation of inducible nitric oxide synthase in macrophages by cytokines and microbial products. [w] Masihi KN [red.] Immunotherapy of infections. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker, Inc. 1994: 37–47.
- [3] BREDDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 175–195.
- [4] BRYANT JL, MEHTA P, VON DER PORTEN A, MEHTA L. Co-purification of 130 kD nitric oxide synthase and a 22 kD link protein from human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 558–564.
- [5] CLANCY RM, AMIN AR, ABRAMSON SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 1141–1151.
- [6] CRANE BR, ARVAI AS, GACHHUI R, WU CH, GHOSH DK, GETZOFF ED, STUEHR DJ, TAINER JA. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science* 1997; **278**: 425–431.
- [7] DARLEY-USMAR W, WISEMAN H, HALLIWELL B. Nitric oxide and oxygen radical: a question of balance. *FEBS Lett* 1995; **369**: 131–135.
- [8] DELANEY CA, EIZIRIK DL. Intracellular target for nitric oxide toxicity to pancreatic beta-cells. *Braz J Med. Biol Res* 1996; **29**: 569–579.
- [9] DELANEY CA, TYRBERG B, BOUWENS L, VAGHEH H, HELLMAN B, EIZIRIK DL. Sensitivity of human pancreatic islet to peroxynitrite-induced cell dysfunction and death. *FEBS Lett* 1996; **394**: 300–306.
- [10] DENICOLA A, FREEMAN BA, TRUJILLO M, RADI R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 1996; **333**: 48–58.
- [11] DERVOT AL., YAN L, MADARA PJ, COBB JP, WESLEY RA, CORRIVEAU CH C, TROPEA MM, DANNER RL. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- α production by human neutrophils. *J Immunol* 1994; **152**: 4102–4108.

- [12] DĘBIŃSKA-KIEĆ A. Biosynteza i fizjologiczna funkcja tlenku azotu. [w] Konarska L [red] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Warszawa: PWN 1995: 177–189.
- [13] FAURE V, COURTOIS Y, GOUREAU O. Tyrosine kinase inhibitors and antioxidants modulate NF- κ B and NOS-II induction in renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1998; **257**: C202–C215.
- [14] FEHSEL K, KRONCKE KD, MEYER KL, HUBER H, WAHN V, KOLB-BACHOFEN W. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 1994; **155**: 2858–2865.
- [15] FLODSTROM M, TYRBERG B, EIZIRIK DL, SANDLER S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1999; **48**: 706–713.
- [16] FORSLUND T, SUNDQVIST T. Nitric oxide regulates the chemiluminescence from stimulated human neutrophils. *AMPIS* 1995; **103**: 813–817.
- [17] FUKATSU K, SAITO F, HANI I, FURUKAWA S, LIN MT, MATSUDA T, IKEDA S, INOUE T, YASUHARA H, MUTO T. Nitric oxide donor decreases neutrophil adhesion in both lung and peritoneum during peritonitis. *J Surg Res* 1998; **74**: 119–124.
- [18] GAO JJ, FILLA MB, FULTZ MJ, VOGEL SN, RUSSELL SW, MURPHY WJ. Autocrine/paracrine IFN- $\alpha\beta$ mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Immunol* 1998; **161**: 4803–4810.
- [19] GOW A, DURAN D, THOM SR, ISCHIROPOULOS H. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 1996; **333**: 42–48.
- [20] GRISHAM MB, GRANGER DN, LEFER DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 404–433.
- [21] KIM H, LEE HS, CHANG KT, KO TH, BACK KJ, KWON NS. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor - κ B. *J Immunol* 1995; **154**: 4741–4748.
- [22] KLEBANOFF SJ, NATHAN CF. Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 192–196.
- [23] KLINK M, BRZYCHCY M, ZIÓŁKOWSKI A, ŚWIERZKO A, SUŁOWSKA Z, CEDZYŃSKI M, TCHÓRZEWSKI H. The comparison of some biological activities of lipopolysaccharides obtained from smooth and rough *Proteus mirabilis* strains. *Acta Microbiol Pol* 1998; **47**: 141–151.
- [24] KOLB H, KOLB-BACHOFEN W. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator. *Immunol Today* 1998; **19**: 556–561.
- [25] KRONCKE KD, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN W. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem* 1995; **376**: 327–343.
- [26] LARFARS G, GYLLENHAMMAR H. Stimulus-dependent transduction mechanisms for nitric oxide release in human polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J Lab Clin Med* 1998; **132**: 54–60.
- [27] LASKOWSKA-KLITA T. Wolne rodniki tlenowe i obrona przeciwutleniająca. *Medycyna Wieku Rozwojowego* 1997; **I**: 44–53.
- [28] MALAWISTA SE, BOISFLEURY CHEVANCE A. Chemotaxis by human neutrophils and their cytokineplasts treated with inhibitors of nitric oxide synthase: no suppression of orientation or trajectory. *J Leukoc Biol* 1997; **61**: 58–62.
- [29] MALAWISTA SE, MONTGOMERY RR, BLARICOM GV. Microbial killing by human neutrophil cytokineplasts: similar suppressive effect of reversible and irreversible inhibitor of nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1996; **60**: 753–757.

- [30] MARKET M, CARNAL B, MAUEL J. Nitric oxide production by activated human neutrophils exposed to sodium azide and hydroxylamine: the role of oxygen radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **199**: 1245–1249.
- [31] MARTIN E, NATHAN C, XIE Q. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1994; **180**: 977–984.
- [32] NAGASE S, KATSUMI T, UEDA A, HIRAYAMA A, AOYAGIKI K, KONDOHM, KOYAMA A. A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-Arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **233**: 150–153.
- [33] NAPPI AJ, VASS E. Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nitric oxide and hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Acta* 1998; **1380**: 55–63.
- [34] NATH J, POWLEDGE A. Modulation of human neutrophil inflammatory responses by nitric oxide: studies in unprimed and LPS-primed cells. *J Leukoc Biol* 1997; **62**: 805–816.
- [35] NUSSLER AK, BILLIAR TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993; **54**: 171–178.
- [36] OKAYAMA N, ICHIKAWA H, COEL, ITOH M, ALEKSANDER IS. Exogenous NO enhances hydrogen peroxide-mediated neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; **274**: L820–L826.
- [37] PADGETT CM, WHORTON AR. Cellular responses to nitric oxide: role of protein S-thiolation/dethiolation. *Arch Biochem Biophys* 1998; **358**: 232–242.
- [38] PIEPER GM, CLARKE GA, GROSS GJ. Stimulatory and inhibitory action of nitric oxide donor agents vs. nitrovasodilators on reactive oxygen production by isolated polymorphonuclear leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; **269**: 451–456.
- [39] RODENAS J, MITJAVILA MT, CARBONELL T. Nitric oxide inhibits superoxide production by inflammatory polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol* 1998; **274**: C827–C830.
- [40] SALKOWSKI CA, BARBER S.A., DETORE GR, VOGEL SN. Differential dysregulation of nitric oxide production in macrophages with targeted disruption in IFN regulatory factor-1 and -2 genes. *J Immunol* 1996; **156**: 3107–3110.
- [41] SAMOUILOV A, KUPPUSAMY P, ZWEIER JL. Evaluation of the magnitude and rate nitric oxide production from nitrite in biological system. *Arch Biochem Biophys* 1998; **357**: 1–7.
- [42] SO HS, PARK RK, KIM MS, LEE SR, JUNG BH, CHUNG SY, JUN CD., CHUNG HT. Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **247**: 809–813.
- [43] SOUTHAN GJ, SZABO C, THIEMERMANN C. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by spermine is modulated by aldehyde dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **203**: 1638–1644.
- [44] SQUADRITO GL, PRYOR WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: The role of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*. 1998; **25**: 392–403.
- [45] SZABO C, SOUTHAN GJ, THIEMERMANN C, VANE JR. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br J Pharmacol* 1994; **113**: 757–766.
- [46] TAIRA J, MISIK V, RIESZ P. Nitric oxide formation from hydroxylamine by myoglobin and hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Acta* 1997; **1336**: 502–508.
- [47] THIEMERMANN CH. Selective inhibition of activity of inducible nitric oxide synthase in septic shock. [w] Levin J, Alving CR, Munford RS, Redl H [red] Bacterial endotoxins: lipopolysaccharides from genes to therapy. New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore: Wiley-Liss, Inc1995: 383–392.
- [48] UMEKI S. Activation factors of neutrophil NADPH oxidase complex. *Life Sciences* 1994; **55**: 1–13.
- [49] UPPU RM, LEMERCIER JN, SQUADRITO GL, ZHANG HW, BOLZAN RM, PRYOR WA. Nitrosation by peroxynitrite: Use of phenol as a probe. *Arch Biochem Biophys* 1998; **358**: 1–16.

- [50] VENTURINI G, COLOSANTI M, ASCENZI P. Aprotinin, the first competitive protein inhibitor of NOS activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 263–265.
- [51] VETROVSKY P, STOCLET JC, ENTLICHER G. Possible mechanism of nitric oxide production from N(G)-hydroxy-L-arginine or hydroxylamine by superoxide ion. *Int J Biochem Cell Biol* 1996; **28**: 1311–1318.
- [52] VLIET A, EISERICH JP, HALLIWELL B, CROSS CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalysed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 7617–7625.
- [53] WADDEL TK, FIALKOW L, CHAN CK, KISHINOTO TK, DOWNEY GP. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18485–18491.
- [54] WEINBERG JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: A review. *Mol Med* 1998; **4**: 557–591.
- [55] WINK DA, MITCHELL JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 434–456.
- [56] WOLKOW PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res* 1998; **47**: 152–166.
- [57] WRIGHT CD., MULSH A, BUSSE R, OSSWALD H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **160**: 813–819.
- [58] XIA Y, ZWEIER JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 12707–12710.
- [59] YAN L, VANDIVIER W, SUFFREDINI AF, DANNER RL. Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity. *J Immunol* 1994; **153**: 1825–1833.
- [60] ZEMAN K. Współczesne poglądy na rolę granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów) w procesach zapalnych. I Patofizjologiczne podstawy udziału neutrofilów w zapaleniu. *Pol J Immunol* 1993; **XVIII**: 3–21.
- [61] ZHANG Z, NAUGHTON D, WINYARD PG, BENJAMIN N, BLAKE DR, SYMONS MCR. Generation of nitric oxide by nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 767–772.

Redaktor prowadzący – S. Biliński

Otrzymano: 10.04. 1999 r.

Przyjęto: 24.04. 1999 r.

Adres autora: Lodowa 106, 93-232 Łódź

E-mail: mklink@wirus.cmtwpan.lodz.pl

**POSTĘPY W BADANIACH NAD ZAPŁODNIENIEM
U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH (ANGIOSPERMAE):
I. ZAPŁODNIENIE *IN VITRO* Z UŻYCIEM
IZOLOWANYCH GAMET**

**ADVANCES IN FERTILIZATION RESEARCH IN ANGIOSPERMS:
I. *IN VITRO* FERTILIZATION WITH ISOLATED GAMETES**

Marzena POPIELARSKA, Lesław PRZYWARA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie: W ostatnich latach opracowane zostały nowe lub udoskonalone już istniejące systemy eksperymentalne zapłodnienia *in vitro* z użyciem izolowanych gamet roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*). Obecnie w wyniku fuzji komórki jajowej z komórką plemnikową mogą być otrzymywane w warunkach *in vitro* zygoty, a w przypadku kukurydzy także płodne rośliny. Osiągnięcia te stwarzają nowe możliwości badania mechanizmów kontrolujących podwójne zapłodnienie i embriogenezę w jej początkowych etapach. W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan badań w omawianej dziedzinie.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 793–807)

Słowa kluczowe: Zapłodnienie *in vitro*, izolowane gamety, *Angiospermae*.

Summary: *In vitro* fertilization systems for studying the processes of fertilization, zygote formation and development are now available for angiosperms. Now it is possible to produce mature plants in maize after fusion of egg cell with sperm. These systems represent new experimental approach in the research on double fertilization and early stages of embryogenesis. In this review we provide an information on most recent development in this field.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 793–807)

Key words: *In vitro* fertilization, isolated gametes, angiosperms.

WSTĘP

Zapłodnienie u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*) ma charakter tzw. *podwójnego zapłodnienia*. Do woreczka zalążkowego (gametofit żeński) zawierającego w typowej postaci siedem komórek – dwie synergidy, komórkę jajową (gameta żeńska), komórkę centralną i trzy antypody – przekazywane są za pośrednictwem łagiewki pyłkowej dwie komórki plemnikowe (gamety męskie), z których jedna łączy się z komórką jajową, zaś druga z komórką centralną. W wyniku podziałów, z zapłodnionej komórki jajowej (zygoty) powstaje diploidalny zarodek, natomiast z komórki centralnej – triploidalne bielmo, tkanka odżywcza dla rozwijającego się zarodka [11, 56].

Podwójne zapłodnienie odkryte zostało pod koniec XIX wieku niezależnie przez S. G. Nawaszina w Rosji w oraz L. Guignarda we Francji. Z okazji 100-letniej rocznicy tego ważnego odkrycia ukazały się w światowej prasie naukowej okolicznościowe artykuły [18, 23, 29]. Warto dodać, że w 1990 roku opisano u przedstawicieli roślin nagonasiennych *Ephedra* i *Gnetum* zjawisko przypominające proces podwójnego zapłodnienia u *Angiospermae* [17, 19]. Różnica polega na tym, że u nagonasiennych powstają dwie diploidalne zygoty, a nie diploidalny zarodek i triploidalne bielmo, jak to ma miejsce u okrytonasiennych. Odkrycie to rzuca nowe światło na ewolucję i pochodzenie roślin okrytonasiennych.

Przez wiele lat badania nad zapłodnieniem u *Angiospermae* miały charakter głównie opisowy, co wynikało przede wszystkim z trudności metodycznych. Komórka jajowa u *Angiospermae*, w przeciwieństwie do roślin niższych, gdzie zapłodnienie zachodzi na zewnątrz organizmu, jest tu głęboko ukryta w tkankach sporofitu przez to niedostępna dla bezpośredniej obserwacji i eksperymentów, z tego też względu większość informacji na temat przebiegu zapłodnienia i embriogenezy pochodzi z badań przeprowadzonych na materiale utrwalonym. Przez pierwsze 50 lat badania prowadzone były z użyciem mikroskopu świetlnego. Późniejsze, z zastosowaniem mikroskopu elektronowego pomogły rozwiązać wiele spornych kwestii i w znaczący sposób wzbogaciły naszą wiedzę na temat strukturalnych aspektów podwójnego zapłodnienia (podsumowanie [56, 57]). Nieznane pozostały jednak mechanizmy molekularne związane z wniknięciem gamet męskich do woreczka zalążkowego i ich fuzją z komórką jajową i komórką centralną. Konieczne stało się opracowanie nowych technik eksperymentalnych, które umożliwiałyby manipulowanie żywymi gametofitami i gametami w warunkach *in vitro*.

Pierwsze próby izolowania woreczków zalążkowych prowadzono już w latach pięćdziesiątych. Obecnie znamy techniki izolacji megagametofitów dla ok. 50 gatunków roślin okrytonasiennych, a w przypadku niektórych z nich potrafimy również izolować żywotne gamety żeńskie i męskie (omówienie danych na ten temat [4, 26, 48, 61]).

W latach dziewięćdziesiątych nastąpił przełom w badaniach nad zapłodnieniem u *Angiospermae*. W roku 1991 dokonano pierwszej fuzji izolowanych gamet kukurydzy (*Zea mays*) [34, 35]. Początkowo wykazano, że produkty fuzji były zdolne do podziałów i formowania mikrokalusa. Kolejne doniesienia informowały, iż możliwy jest rozwój z takiej zygoty zarodka w drodze embriogenezy zygotycznej bez obecności bielma i tkanek rośliny macierzystej. Uzyskane tą drogą rośliny były w pełni płodne [38]. W roku 1993 opisano kariogamię w produktach elektrofuzji [13], a rok później dokonano fuzji gamet w obecności jonów Ca^{2+} uzyskując zygoty, które rozwijały się w struktury wielokomórkowe [14, 39]. Osiągnięcia te zostały szerzej omówione w kilku artykułach przeglądowych [1, 8-10, 36, 55].

Równoległe z eksperymentami nad fuzją gamet prowadzone były różnorodne badania na izolowanych komórkach jajowych i zygotach pochodzących z zapłodnienia *in situ* oraz eksperymenty polegające na iniekcji izolowanych gamet męskich do komórki jajowej [31] lub wyizolowanego woreczka zalążkowego [49]. Celem niniejszego artykułu jest przybliżenie polskiemu czytelnikowi osiągnięć w zakresie eksperymentów przeprowadzanych przy wykorzystaniu techniki zapłodnienia *in vitro* u roślin okrytonasiennych. Najnowszy kierunek badań dotyczy biochemicznych i molekularnych mechanizmów zapłodnienia u *Angiospermae*, m.in. poprzez izolowanie genów specyficznych dla gamet oraz genów indukowanych po zapłodnieniu. Zagadnienia te zostały przedstawione w odrębnym artykule [54].

IZOLACJA GAMET

Izolacja fizjologicznie dojrzałych i żywotnych gamet męskich i żeńskich jest podstawowym warunkiem dla przeprowadzenia zapłodnienia *in vitro*. Szczególnie trudna jest izolacja gamet żeńskich ze względu na ich umiejscowienie w roślinie. Tkanki ośrodka otaczające woreczek zalążkowy muszą zostać usunięte, a komórka jajowa oddzielona od innych komórek megagametofitu. Żywe komórki jajowe udało się wyizolować u: *Nicotiana tabacum* (po raz pierwszy [24]; ponadto szereg autorów), *Zea mays* (po raz pierwszy [66], metoda ulepszona i zmodyfikowana [38]; ponadto wielu autorów), *Plumbago zeylanica* [3, 25, 27], *Lolium perenne* [65], *Hordeum vulgare* [22], *Triticum aestivum* [22, 33, 53], *Brassica napus* [30] i ostatnio *Cunninghamia lanceolata* [5].

Do izolacji komórek jajowych, a także innych elementów woreczka zalążkowego, najczęściej stosuje się metody maceracji enzymatycznej w połączeniu z mikro-manipulacją. Najlepiej opracowana jest procedura izolacji komórek jajowych kukurydzy. Połówki zalążków zawierające woreczki zalążkowe inkubuje się w roztworze mannitolu z enzymami degradującymi ścianę komórkową, a następnie przy pomocy mikronarzędzi izoluje się protoplasty komórek jajowych. Jest to zajęcie

bardzo pracochłonne i wymagające dużych zdolności manualnych. Zręczny i cierpliwy eksperymentator jest w stanie wyizolować 20–25 komórek jajowych ze 100 fragmentów zalążków (jest to liczba wystarczająca do przeprowadzenia eksperymentów fuzji gamet) w ciągu 2 godzin. Biorąc pod uwagę czas potrzebny do wcześniejszego przygotowania zalążków, cała procedura zajmuje zwykle dzień intensywnej pracy [36]. Żywotne komórki jajowe kukurydzy można także wyizolować bez wcześniejszego traktowania enzymatycznego [40]. Metoda ta, chociaż bardziej pracochłonna, jest zalecana ze względu na wyższą żywotność gamet [46]. Unikanie stosowania enzymów, które mogłyby reagować ze składnikami błony komórkowej, jest wskazane zwłaszcza w przypadku badań nad łączeniem się błon komórkowych gamet.

Po izolacji protoplasty komórek jajowych są okrągłe i silnie zwakuolizowane. Ich rozmiary ok. 300 razy przekraczają wielkość izolowanych komórek plemnikowych. Struktura organelli [12], jak i ich właściwości fizjologiczne i molekularne [64] są bardzo podobne do obserwowanych *in situ*.

Izolowanie gamet męskich jest na ogół łatwiejsze, a ponadto istnieje możliwość otrzymania ich w dużych ilościach (*mass isolation*). Źródłem pozyskiwania gamet męskich jest pyłek lub rosnące łągielki pyłkowe. Stosowane są tu dwie podstawowe metody:

(i) technika szoku osmotycznego z użyciem, lub bez, wstępnego traktowania enzymatycznego oraz

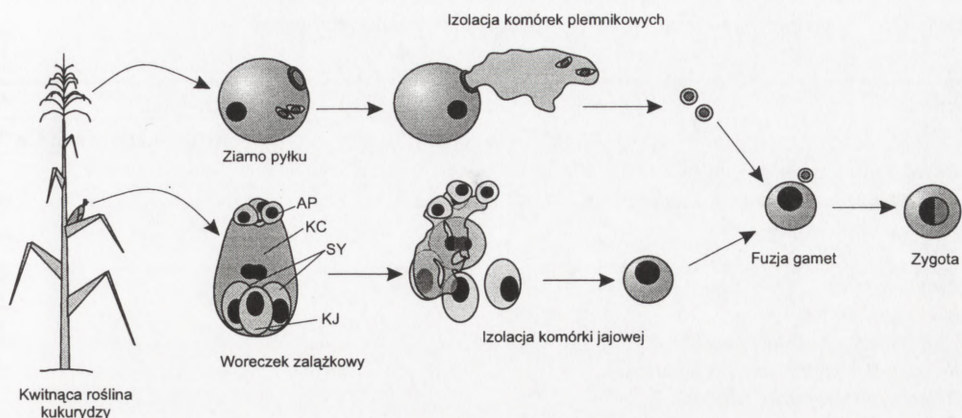
(ii) technika mechanicznej maceracji.

Zaletą pierwszej metody jest jej duża wydajność; w wyniku kilkuminutowej inkubacji w roztworze hypotonicznym następuje pęknięcie ziarna pyłku lub łągielki i uwolnienie dużej liczby komórek generatywnych lub komórek plemnikowych. Wadą natomiast tej metody jest ryzyko uszkodzenia izolowanych komórek wskutek poddania ich szokowi osmotycznemu. W przypadku metody mechanicznej, cała procedura może być prowadzona w medium o optymalnej wartości osmotycznej dzięki czemu unika się uszkodzeń jednakże ilość izolowanych gamet uzyskiwanych tą drogą jest znacznie mniejsza. Eksperymenty izolowania gamet męskich dostarczyły szeregu cennych informacji na temat ich cech cytologicznych i fizjologicznych, a także trwałości i żywotności [10, 67-69].

Szczegółowe dane na temat techniki izolacji gamet zawierają cytowane powyżej prace.

FUZJA KOMÓRKI JAJOWEJ Z KOMÓRKĄ PLEMNIKOWĄ

Najlepiej opracowanym eksperymentalnym systemem zapłodnienia *in vitro* jest bez wątpienia system izolowanych gamet kukurydzy (rys. 1). Istnieją dwie metody



RYSUNEK 1. Otrzymywanie izolowanych gamet kukurydzy i ich fuzja w warunkach *in vitro*; z dojrzałego ziarna pyłku po inkubacji w hypotonicznym roztworze mannitolu uwalniane są komórki plemnikowe, a z woreczka zalążkowego w drodze maceracji enzymatycznej i mikromanipulacji – komórka jajowa (KJ) oraz inne komórki gametofitu żeńskiego (synergidy – SY, komórka centralna – KC, komórki antypod – AP)

łączenia wyizolowanych gamet: elektrofuzja [34, 35] oraz fuzja przy udziale wysokich stężeń jonów wapnia [14, 39] określana także jako fuzja bez elektrycznej stymulacji [1], fuzja 'spontaniczna' [15] lub fuzja indukowana chemicznie [36]. Do fuzji gamet wykorzystuje się specjalny mikrosystem opracowany dla pojedynczych protoplastów komórek somatycznych [32, 58]. Zastosowanie tego mikrosystemu (w nieco zmodyfikowanej wersji) było bardzo korzystne, bowiem eliminuje on konieczność dysponowania dużą liczbą komórek jajowych. Fuzję przeprowadza się na szkiełku nakrywkowym w 2 l mikrokroplach 0,55 M mannitolu przykrytych olejem mineralnym (*mineraloil*). Przebieg fuzji obserwowany jest w mikroskopie odwróconym.

Elektrofuzję gamet indukuje się za pomocą krótkich impulsów elektrycznych mikroelektrod przymocowanych do statywu. Odległość między elektrodami ustalana jest przy pomocy systemu mechanicznego kontrolowanego przez komputer. Częstość fuzji jest na ogół wysoka i wynosi około 85% [14, 34, 35]. Badania produktów elektrofuzji wykonane z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego wykazały, że jądro komórki plemnikowej zostaje włączone do protoplastu komórki jajowej, wędruje w kierunku jądra żeńskiego i łączy się z nim (kariogamia) w przeciągu 0,5 do 1,5 godziny [13].

W trakcie eksperymentów zaobserwowano, że użycie prądu elektrycznego, równie często jak fuzje gamet przeciwnej płci, powoduje fuzje gamet tej samej płci, protoplastów gamet z protoplastami innych komórek gametofitowych, a także z protoplastami komórek sporofitowych [34]. Jest to zjawisko niekorzystne, bowiem utrudnia badanie mechanizmu rozpoznawania się gamet i warunków koniecznych do ich fuzji. Rozpoczęto więc próby znalezienia bardziej specyficznej metody fuzji. W roku 1994 opracowano chemiczną procedurę fuzji, w obecności wysokich stężeń

TABELA 1. Metoda fuzji a możliwość prowadzenia określonych badań

| Proces | Metoda fuzji izolowanych gamet | |
|--|--------------------------------|-----------------------------------|
| | elektrofuzja | fuzja indukowana Ca ²⁺ |
| <i>Rozpoznawanie się gamet</i> | | |
| Identyfikacja cząsteczek (receptorów) powierzchniowych | – | + |
| Bariery międzygatunkowe | – | + |
| <i>Fuzja gamet</i> | | |
| Mechanizm fuzji | – | + |
| Preferencyjne zapłodnienie | – | + |
| Wczesne bariery dla polispermii | – | + |
| <i>Aktywacja komórki jajowej</i> | | |
| Sekwencja czasowa zdarzeń | + | + |
| Sygnaly międzykomórkowe | + | + |
| Mechanizmy aktywacji | + | + |
| Późne bariery dla polispermii | + | + |
| <i>Powstawanie zygoty</i> | | |
| Migracja jąder | + | + |
| Kariogamia | + | + |

CaCl₂ [14, 39]. Warunki eksperymentalne były zatem bardziej zbliżone do tych panujących *in situ*. Wyizolowane gamety męskie i żeńskie przenoszono do roztworu zawierającego 0,55 M mannitol i różne stężenia chlorku wapnia: 1 mM, 5 mM lub 10 mM. Mikromanipulacji gametami w celu doprowadzenia do ich kontaktu dokonywano szklanymi mikroigłami. Po adhezji gamet, niemal natychmiast (czasem nawet po czasie krótszym od 1 s) następowała ich fuzja. Najwyższa frekwencja, dochodząca do 80%, miała miejsce w obecności 5 mM CaCl₂. Przy tej metodzie fuzji tylko sporadycznie obserwowano fuzje gamet tej samej płci, a także fuzje gamety męskiej z protoplastami somatycznymi. Częstość tych ostatnich wynosiła zaledwie 1,8%. W produktach fuzji obserwowano w jądrze dwa jąderka, co wskazuje zgodnie z obserwacjami zygoty przeprowadzonymi *in situ* na wystąpienie kariogamii [51]. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej pozwoliło na lokalizację chromatyny jądra komórki plemnikowej przed i po kariogamii [64]. Zakres badań jakie można prowadzić przy zastosowaniu omówionych metod łączenia gamet przedstawiono w tabeli 1. Zebrane w tabeli dane jednoznacznie wskazują, że metoda chemiczna jest bardziej uniwersalna.

Ogromna większość badań nad zapłodnieniem *in vitro* przeprowadzona została na roślinach jednoliściennych, głównie kukurydzy. Pierwsze próby tego rodzaju eksperymentów u roślin dwuliściennych wykonano na izolowanych gametach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [62, 63]. Fuzja protoplastów gamet była indukowana chemicznie przy pomocy glikolu polietylenowego (PEG). Stwierdzono, w odróżnieniu od ku-

kurydzy [39], że wysokie stężenie jonów wapnia i wysokie pH nie wpływały indukująco na połączenie się gamet tytoniu. Sugeruje się, że raczej czas działania jonów Ca^{2+} na gamety, a nie ich stężenie w roztworze ma istotny wpływ na szybkość przebiegu fuzji [59, 60].

Na zakończenie warto dodać, że eksperymenty z zapłodnieniem *in vitro* prowadzone były również u roślin nagonasiennych (*Pseudotsuga menziesii*) [16]. Zastosowano system wspólnej hodowli rosnących łagiewek pyłkowych i izolowanych gametofitów żeńskich. Łagiewki penetrowały komórkę jajową przez komórkę kanałowo-brzuszną (analogicznie jak w warunkach *in situ*). Następnie dochodziło do uwolnienia plemników, fuzji gamet i wstępnych etapów tworzenia się zarodka. Jest to pierwsze doniesienie o zapłodnieniu *in vitro* u roślin nagonasiennych.

Odmienne podejście eksperymentalne do badania podwójnego zapłodnienia reprezentują studia nad *Torenia fournieri* [21]. U gatunku tego występuje charakterystyczny, nagi woreczek zalążkowy, który wystaje z okienka (mikropyle), tak że możliwa jest obserwacja całego procesu zapłodnienia w warunkach *in situ*. Stosując mikroskop fluorescencyjny i mikroskop z optyką Nomarskiego prześlędzono dokładnie przebieg i sekwencję czasową wydarzeń od momentu kiełkowania pyłku aż do fuzji gamet męskich z komórką jajową i komórką centralną.

FUZJA KOMÓRKI CENTRALNEJ I KOMÓRKI PLEMNIKOWEJ

Eksperymenty nad zapłodnieniem *in vitro* u roślin okrytonasiennych nie są ograniczone tylko do fuzji komórki jajowej z plemnikową. Próbuje się, podobnie jak to ma miejsce w naturze, doprowadzić do połączenia komórki centralnej z komórką plemnikową i uzyskania tą drogą bielma. Ostatnio doniesiono o pierwszym tego typu eksperymencie zakończonym częściowym sukcesem [41]. Wyizolowana komórka centralna zapłodniona *in vitro* rozwijała się podobnie jak w warunkach *in situ* tworząc tkankę przypominającą bielmo. Zaobserwowano, że jądro komórki plemnikowej łączy się z jednym z jąder biegunowych lub z jądrem wtórnym.

Wyizolowane komórki centralne mogą być użyte w badaniach nad specyficznością molekularną powierzchni błon i receptorami błonowymi dla adhezji komórek plemnikowych. Interesująca wydaje się być również możliwość analizy substancji wydzielanych przez wytworzone *in vitro* bielmo do pożywki i wykorzystanie ewentualnych czynników promujących rozwój zarodka w kulturach 'kombinowanych' (*co-culture*) zapłodnionych *in vitro* komórek jajowych i centralnych. Zapłodnione komórki centralne mogą być również użyte w badaniach nad regulacją i izolacją genów, jak to uczyniono z izolowanymi komórkami jajowymi i zygotami [6, 7]. Stwarza to możliwość zrozumienia korelacji w rozwoju komórki jajowej

i centralnej. Poznanie zmian zachodzących w pierwszym cyklu komórkowym, nie tylko zygoty ale także zapłodnionej komórki centralnej, może wydatnie przybliżyć zrozumienie procesu podwójnego zapłodnienia.

HODOWLA *IN VITRO* ZYGOT, EMBRIOGENEZA I REGENERACJA ROŚLIN

Zasadniczym warunkiem determinującym sukces eksperymentów z zapłodnieniem *in vitro* było opracowanie odpowiedniego systemu mikrokultury, który podtrzymywałby wzrost i rozwój zygot. Problem ten udało się rozwiązać dzięki tzw. kulturom 'kombinowanym' (*co-culture*). W metodzie tej zygoty umieszcza się w specjalnych miniszalkach (*Millicell*) o średnicy 12 mm zaopatrzonych w półprzepuszczalną, przeźroczystą membranę, a te z kolei w większej plastikowej szalce (śr. 35 mm) wypełnionej 1,5 ml kultury zawieszinowej niemorfogenicznych komórek niedojrzałych zarodków kukurydzy, które stanowią kulturę odżywiająca zygotę ('*feede' rcells*). Ostatnio, jako kultury odżywiające częściej stosuje się hodowle zawieszinowe mikrospor kukurydzy lub jęczmienia [43, 47]. Dobre wyniki przynosi także stosowanie pożywek dwuwarstwowych, w których warstwę odżywiającą stanowi kultura komórek kukurydzy [37] lub mchu [40]. Hodowla prowadzona jest na zmodyfikowanej pożywce Murashige i Skooga [52] wzbogaconej o aminokwasy i regulatory wzrostu. Opisany system mikrokultury wykorzystywany jest także do kultury izolowanych zygot po zapłodnieniu *in situ*.

W przypadku kultury zygot kukurydzy powstałych *in vitro* osiągnięto pełny sukces. Rozwijające się struktury były wyraźnie spolaryzowane, a przebieg embriogenezy *in vitro* analogiczny do rozwoju zarodka *in situ*. Po przeniesieniu zarodka na pożywkę zestaloną dochodziło wprawdzie do pewnego przerostu tkanek, jednak formowany był koleoptyl, a w końcu powstawały siewki i płodne rośliny [38]. U pszenicy, podziały zygot prowadziły tylko do powstania mikrokalusa [33], natomiast produkt fuzji izolowanych gamet tytoniu cechował się obniżoną żywotnością i nie wykazywał zdolności do cytokinezy [63]. Kukurydza jest więc jak dotąd jedynym gatunkiem, u którego udało się uzyskać rośliny po fuzji izolowanych gamet.

Znacznie lepsze rezultaty uzyskano w eksperymentach przeprowadzonych z wykorzystaniem hodowli *in vitro* zygot izolowanych krótko po zapłodnieniu *in situ*. Płodne rośliny otrzymano u jęczmienia [22], pszenicy [22, 43] i kukurydzy [50]. W przypadku tytoniu obserwowano jedynie pojedyncze podziały w izolowanej zygocie [20] (tab. 2).

Inną techniką zapewniającą rozwój izolowanej zygoty jest jej implantacja do zalążków pobudzanych uprzednio do partenokarpicznego wzrostu przez traktowanie

TABELA 2. Kultura *in vitro* zygot i produktów fuzji po zapłodnieniu *in vitro* oraz izolowanych woreczków zalążkowych, zygot i komórek jajowych po zapłodnieniu *in situ*

| System eksperymentalny | Materiał | Gatunek | Wynik | Pozycja literatury |
|--|---|---------------------------|---|-------------------------------|
| Zapłodnienie <i>in vitro</i> Elektrofuzja | <i>Fuzja między gametami jednego gatunku</i> | K. jajowa + k. plemnikowa | Zea mays + Z. mays | Płodne rośliny [38] |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Triticum aestivum</i> + <i>T. aestivum</i> | Wielokomórkowe struktury [36] |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Nicotiana tabacum</i> + <i>N. tabacum</i> | Wielokomórkowe struktury [62] |
| | <i>Fuzja między gametami różnych gatunków</i> | | | |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Zea mays</i> + <i>Sorghum</i> | Wielokomórkowe struktury [40] |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Zea mays</i> + <i>Cotix</i> | Wielokomórkowe struktury [40] |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Zea mays</i> + <i>Triticum aestivum</i> | Wielokomórkowe struktury [40] |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Zea mays</i> + <i>Brassica</i> | Brak rozwoju [40] |
| | Fuzja przy udziale jonów wapnia | | | |
| | | K. jajowa + k. plemnikowa | <i>Zea mays</i> + <i>Z. mays</i> | Wielokomórkowe struktury [39] |
| | Izolacja po zapłodnieniu <i>in situ</i> | | | |
| | Zygota | <i>Hordeum vulgare</i> | Płodne rośliny [22] | [22] |
| | | <i>Triticum aestivum</i> | Płodne rośliny [22, 42, 43] | [22, 42, 43] |
| | | <i>Nicotiana tabacum</i> | Podział zygoty [20] | [20] |
| | | <i>Zea mays</i> | Płodne rośliny [46] | [46] |
| | | <i>Zea mays</i> | Płodne rośliny [2, 50] | [2, 50] |
| | Częściowo izolowane woreczek zalążkowy | | | |
| | Komórka jajowa | <i>Zea mays</i> | Wielokomórkowe struktury [40] | [40] |
| | | <i>Nicotiana tabacum</i> | Podział komórki jajowej [62] | [62] |
| | Kultura niezapłodnionej komórki jajowej (indukcja partenogenezy) | | | |
| | | <i>Zea mays</i> | Wielokomórkowe struktury [40] | [40] |
| | | <i>Nicotiana tabacum</i> | Podział komórki jajowej [62] | [62] |

systetyczna auksyną 2,4-D. Kultura *in vitro* takich zalążków pozwoliła otrzymać na drodze bezpośredniej embriogenezy płodne rośliny pszenicy z zygot wszczepionych do zalążków tego samego gatunku lub do zalążków jęczmienia [42]. Odmianą tej techniki jest hodowla *in vitro* izolowanych zalążków zawierających zygoty [45].

Ostatnim osiągnięciem jest opracowanie systemu mikrokultury umożliwiającego podtrzymanie rozwoju wyizolowanych zygot pszenicy i równoczesną ich obserwację [44]. Mikroskopowej analizie poddano wyizolowane zygoty zatopione w agarozie bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym.

INDUKCJA PARTENOGENEZY W IZOLOWANYCH KOMÓRKACH JAJOWYCH

Izolowane komórki jajowe kukurydzy, jęczmienia i pszenicy [22] nie dzieliły się w warunkach *in vitro*. Podobnie produkt fuzji dwóch gamet żeńskich kukurydzy nie ulegał podziałom, mimo wystąpienia fuzji jąder komórkowych. Udało się natomiast indukować rozwój izolowanych protoplastów komórek jajowych przez ich krótką inkubację (1 do 2 godzin) w roztworze o wysokim stężeniu 2,4-D ($10\text{--}40 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$) [40]. W rezultacie uzyskano struktury wielokomórkowe. Również niezapłodnione komórki jajowe tytoniu przechodziły cytokinezy po inkubacji w 2,4-D [63]. Próby te dają szansę nie tylko na stworzenie alternatywnej drogi indukcji gynogenezy u roślin [28, 70], ale także na badanie procesu aktywacji komórki jajowej podczas partenogenetycznego rozwoju. Warto zaznaczyć, że molekularne mechanizmy indukcji partenogenezy u roślin są całkowicie nieznane.

HYBRYDYZACJA KOMÓREK GAMETYCZNYCH

Technika zapłodnienia *in vitro* może być przydatna w przełamywaniu barier uniemożliwiających uzyskiwanie mieszańców oddalonych u roślin, stanowiąc alternatywny dla innych technik (krzyżowania seksualnego, somatycznej hybrydyzacji, zapyłania *in vitro*) sposób produkcji nowych kombinacji mieszańcowych. Dotychczasowe próby fuzji gamet należących do różnych taksonów nie przyniosły wprawdzie pełnego sukcesu, budzą jednak uzasadnione nadzieje. Fuzja komórek jajowych kukurydzy z gametami męskimi pszenicy, *Sorghum*, *Coix* i rzepaku, tylko w ostatnim przypadku zakończyła się szybką degeneracją komórki powstałej w wyniku fuzji [40]. W pozostałych eksperymentach produkty fuzji dzieliły się tworząc wielokomórkowe struktury. Wyniki te wskazują, że otrzymanie roślin w drodze hybrydyzacji gamet może się udać w przyszłości.

Interesujące perspektywy daje także technika mikroiniekcji jąder komórek plemnikowych do komórki jajowej lub komórki centralnej. Tego typu eksperymenty przeprowadzone na izolowanych woreczkach zalążkowych kukurydzy [31, 49] wykazały, że procedury izolacji nie mają wpływu na aktywność transkrypcyjną materiału zawartego w jądrze komórki plemnikowej.

Stosując technikę bezpośredniej mikroiniekcji DNA do jądra zygoty usiłowano także uzyskać u kukurydzy modyfikacje genetyczne [47]. Najlepsze wyniki osiągnano po przeprowadzeniu iniekcji po 20 godz. kultury, kiedy nastąpiła już regeneracja ściany komórkowej. Stwierdzono, że ekspresja genów reporterowych ujawniała się z częstością 3,5%, a frekwencja powstawania transgenicznych zygot była wyższa, kiedy mikroiniekcję przeprowadzano na początku lub po zakończeniu fazy S, niż w trakcie jej trwania. Poddane iniekcji zygoty były zdolne do podziałów i tworzenia struktur globularnych.

PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

W ostatnich latach wykazano, że możliwy jest rozwój w kontrolowanych warunkach *in vitro* wyizolowanej zygoty powstałej w wyniku zapłodnienia *in planta* lub *in vitro* aż do stadium płodnej rośliny. Poczyniono także pierwsze kroki w indukowaniu rozwoju niezapłodnionych komórek jajowych. Wykonalne stają się obecnie badania z zakresu biochemii i ekspresji genów w izolowanych gametach i zygocie.

Metody łączenia gamet powinny być odpowiednio dobrane w zależności od badanego zagadnienia. Elektrofuzja jest często stosowana ze względu na swoją efektywność. Techniki fuzji indukowanej chemicznie muszą zostać ulepszone pod względem składu pożywki i procedury łączenia gamet. Ta metoda daje większe możliwości badania mechanizmu rozpoznawania się i fuzji gamet. Uzyskane wyniki pomogą odpowiedzieć na pytanie, czy u roślin wyższych występują receptory charakterystyczne dla gamet, jak to ma miejsce u zwierząt, czy też fuzja komórek gametycznych nie jest specyficzna, jak w przypadku fuzji komórek somatycznych.

Niewiele wiadomo jeszcze o biochemii i fizjologii fuzji gamet roślin wyższych *in vitro*. Badania wykorzystujące techniki zapłodnienia *in vitro* mogą zostać rozszerzone o szczegółowe analizy zmian, jakim podlegają pojedyncze komórki jajowe w trakcie i po powstaniu zygoty, a następnie podczas rozwoju zarodka. Duże perspektywy rokują transformacje jednokomórkowe dzięki mikroiniekcji DNA do pojedynczej komórki jajowej przed fuzją, lub do zygoty – po fuzji. Regeneracja roślin z pojedynczej zygoty wiąże się z licznymi technicznymi utrudnieniami. Dużym ułatwieniem byłoby rozwinięcie metody hodowli pojedynczych komórek zapew-

nijającej podtrzymanie ich zdolności do podziałów bez konieczności stosowania kultur 'kombinowanych' z komórkami odżywczymi.

Połączenie techniki kultur pojedynczych komórek z metodami molekularnymi daje możliwość badania molekularnych mechanizmów regulujących proces podwójnego zapłodnienia i pierwszych etapów rozwoju zarodka u roślin okrytonasiennych.

LITERATURA

- [1] BRETON C, FAURE JE, DUMAS C. From *in vitro* fertilization to early embryogenesis in maize. *Protoplasma* 1995; **187**: 3–12.
- [2] CAMPENOT MK, ZHANG G, CUTLER AJ, CASS DD. *Zea mays* embryo sacs in culture. I. Plant regeneration from 1 day after pollination embryos. *Am J Bot* 1992; **79**: 1368–1373.
- [3] CAO YJ, RUSSELL SD. Mechanical isolation and ultrastructural characterization of viable egg cells in *Plumbago zeylanica*. *Sex Plant Reprod* 1997; **10**: 368–373.
- [4] CHABAUD A, PEREZ R. Generative cells and male gametes: isolation, physiology, and biochemistry. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 205–232.
- [5] CHENG XF, LI WD, HONG JS. Isolation of viable male and female gametes in *Cunninghamia lanceolata*. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 68.
- [6] DRESSELHAUS T, LÖRZ H, KRANZ E. Representative cDNA libraries from few plant cells. *Plant J* 1994; **5**: 605–610.
- [7] DRESSELHAUS T, HAGEL C H, LÖRZ H, KRANZ E. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of *in vitro* zygotes of maize. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 23–34.
- [8] DUMAS C, BERGER C, FAURE JE, MATTHYS-ROCHON E. Gametes, fertilization and early embryogenesis in flowering plants. [w] *Advances in Botanical Research*. JA Callow (red.) London, Academic Press, 1998.
- [9] DUMAS C, FAURE JE. Use of *in vitro* fertilization and zygote culture in crop improvement. *Curr Opin Biotech* 1995; **6**: 183–188.
- [10] DUMAS C, MOGENSEN HL. Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 1337–1348.
- [11] DUMAS C, RUSSELL SD. Sexual Reproduction in Flowering Plants. *Int Rev Cytol* 1992; **140**.
- [12] FAURE JE, MOGENSEN HL, KRANZ E, DIGONNET C, DUMAS C. Ultrastructural characterization and three-dimensional reconstruction of isolated maize (*Zea mays* L.) egg cell protoplasts. *Protoplasma* 1992; **171**: 97–103.
- [13] FAURE JE, MOGENSEN H L, DUMAS C, LÖRZ H, KRANZ E. Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course. *Plant Cell* 1993; **5**: 747–755.
- [14] FAURE JE, DIGONNET C, DUMAS C. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 1994; **263**: 1598–1600.
- [15] FAURE JE, DIGONNET C, MÓL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. *In vitro* pollination and fertilization in maize (*Zea mays* L.): technical procedure and prospects for the dissection of the double fertilization process. *Plant Sci* 1994; **104**: 1–10.

- [16] FERNANDO DD, OWENS JN, VON ADERKAS P. *In vitro* fertilization from co-cultured tubes and female gametophytes of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Theor Appl Genet* 1998; **96**: 1057–1063.
- [17] FRIEDMAN WE. Double fertilization in *Ephedra*, a non-flowering seed plant: its bearing on the origin of angiosperms. *Science* 1990; **247**: 951–954.
- [18] FRIEDMAN WE. The evolution of double fertilization and endosperm: an „historical” perspective. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 6–16.
- [19] FRIEDMAN WE, CARMICHEL IS. Double fertilization in *Grtetales*: implications for understanding reproductive diversification among seed plants. *Int J Plant Sci* [Suppl] 1996; **157**: 74–79.
- [20] FU CM, SUN MX, ZHOU C, YANG HY. Isolation of fertilized embryo sacs and triggering of zygote division *in vitro* in *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1996; **38**: 262–267.
- [21] HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, KUROIWA T. Kinetics of double fertilization in *Torenia fournieri* based on direct observations of the naked embryo sac. *Planta* 1997; **203**: 101–110.
- [22] HOLM PB, KNUDSEN S, MOURITZEN P, NEGRI D, OLSEN FL, ROUE C. Regeneration of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell. *Plant Cell* 1994; **6**: 531–543.
- [23] HU SY. Centenary on S.G. Nawaschin’s discovery of double fertilization: retrospects and prospects. *Acta Bot Sin* 1998; **40**: 1–13.
- [24] HU SY, LI LG, ZHOU C. Isolation of viable embryo sacs and their protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1985; **27**: 343–347.
- [25] HUANG BQ, RUSSELL SD. Isolation of fixed and viable eggs, central cells and embryo sacs from ovules of *Plumbago zeylanica*. *Plant Physiol* 1989; **90**: 9–12.
- [26] HUANG BQ, RUSSELL SD. Female germ unit: organization, isolation and function. *Intern Rev Cytol* 1992; **140**: 233–293.
- [27] HUANG BQ, RUSSELL SD, STROUT GW, MAO LJ. Organization of isolated embryo sacs and eggs of *Plumbago zeylanica* (Plumbaginaceae) before and after fertilization. *Am J Bot* 1990; **77**: 1401–1410.
- [28] IMRE K, TIMAR O, BARNABAS B, KRISTOF Z. Isolated megaspores and megagametophyte cells as haploid source for biotechnological manipulation. Plant Reproduction 1996, 14th International Congress on Plant Reproduction, 18–23 February 1996, Cumberland Resort, Lorn, Victoria, Australia, s. 106.
- [29] JENSEN WA. Double fertilization: a personal view. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 1–5.
- [30] KATOH N, LÖRZ H, KRANZ E. Isolation of viable egg cells of rape (*Brassica napus* L.). *Zygote* 1997; **5**: 31–33.
- [31] KEIJZER CJ. The isolation of sperm cell, their microinjection into the egg apparatus and methods for structural analysis of the injected cells. [w] Sexual Plant Reproduction. C Cresti, A Tiezzi (red.) Springer 1992; 161–172.
- [32] KOOP HU, SCHWEIGER HG. Regeneration of plants after elektrofusion of selected pairs of protoplasts. *Eur J Cell Biol* 1985; **39**: 46–49.
- [33] KOVACS M, BARNABAS B, KRANZ E. The Isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Reprod* 1994; **7**: 311–312.
- [34] KRANZ E, BAUTOR J, LÖRZ H. *In vitro* fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 12–16.
- [35] KRANZ E, BAUTOR J, LÖRZ H. Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the *in vitro* fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize. *Sex Plant Reprod* 1991; **4**: 17–21.
- [36] KRANZ E, DRESSELHAUST T. *In vitro* fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends in Plant Science* 1996; **1**: 82–89.

- [37] KRANZ E, LÖRZ H. Micromanipulation and *in vitro* fertilization with single pollen grains of maize. *Sex Plant Reprod* 1990; **3**: 160–169.
- [38] KRANZ E, LÖRZ H. *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 739–746.
- [39] KRANZ E, LÖRZ H. *In vitro* fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote* 1994; **2**: 125–128.
- [40] KRANZ E, VON WIEGEN P, LÖRZ H. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *Plant J* 1995; **8**: 9–23.
- [41] KRANZ E, VON WIEGEN P, QUADER H, LÖRZ H. Endosperm development after fusion of isolated, simple maize sperm and central cells *in vitro*. *Plant Cell* 1998; **10**: 511–524.
- [42] KUMLEHN J, BRETTSCHEIDER R, LÖRZ H, KRANZ E. Zygote implantation to cultured ovules leads to direct embryogenesis and plant regeneration of wheat. *Plant J* 1997; **12**: 1473–1479.
- [43] KUMLEHN J, LÖRZ H, KRANZ E. Differentiation of isolated wheat zygotes into embryos and normal plants. *Planta* 1998; **205**: 327–333.
- [44] KUMLEHN J, LÖRZ H, KRANZ E. Monitoring individual development of isolated wheat zygotes: a novel approach to study early embryogenesis. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 88.
- [45] KUMLEHN J, SCHIEDER O, LÖRZ H. *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovule culture. *Plant Cell Rep* 1997; **16**: 663–667.
- [46] LEDUC N, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. Deleterious effect of minimal enzymatic treatments on the development of isolated maize embryo sacs in culture. *Sex Plant Reprod* 1995; **8**: 313–317.
- [47] LEDUC N, MATTHYS-ROCHON E, ROUGIER M, MOGENSEN HL, HOLM PB, MAGNARD JL, DUMAS C. Isolated maize zygotes mimic *in vivo* embryonic development and express microinjected genes when cultured *in vitro*. *Dev Biol* 1996; **177**: 190–203.
- [48] LIBIK M, PRZYWARA L. Izolacja gametofitów żeńskich i gamet u *Angiospermae*. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 277–294.
- [49] MATTHYS-ROCHON E, MÓL R, HEIZMANN P, DUMAS C. Isolation and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated maize embryo sacs. *Zygote* 1994; **2**: 29–35.
- [50] MÓL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. *In-vitro* culture of fertilized embryo sacs of maize: Zygotes and two-celled proembryos can develop into plants. *Planta* 1993; **189**: 213–217.
- [51] MÓL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. The kinetics of cytological events during double fertilization in *Zea mays* L. *Plant J* 1994; **5**: 197–206.
- [52] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; **15**: 473–497.
- [53] PÓNYA Z, TÍMÁR I, SZABÓ L, KRISTÓF Z, BARNABÁS B. Morphological characterization of wheat (*T. aestivum* L.) egg cell protoplasts isolated from immature and overaged caryopses. *Sex Plant Reprod* 1999; **11**: 357–359.
- [54] PRZYWARA L, POPIELARSKA M. Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*): II. Biochemiczne i molekularne aspekty zapłodnienia. *Post Biol Kom* 1999; **26**: xx–xx.
- [55] ROUGIER M, ANTOINE AF, ALDON D, DUMAS C. New lights in early steps of *in vitro* fertilization in plants. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 324–329.
- [56] RUSSELL SD. Double fertilization. *Intern Rev Cytol* 1992; **140**: 357–387.
- [57] RUSSELL SD. Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 337–342.

- [58] SCHWEIGER HG, DIRK J, KOOP HU, KRANZ E, NEUHAUS G, SPANGENBERG G, WOLF D. Individual selection, culture and manipulation of higher plant cells. *Theor Appl Genet* 1987; **73**: 769–783.
- [59] SUN MX, YANG HY, ZHOU C, KOOP HU. Single - pair fusion of various combinations between female gametoplasts and other protoplasts in *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1995; **37**: 106.
- [60] SUN MX, MOSCATELLI A, YANG H, CRESTI M. *In vitro* double fertilization in tobacco, compared with somatic protoplast fusion toward understanding gamete-specific characters. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 51.
- [61] THEUNIS CH, PIERSON ES, CRESTI M. Isolation of male and female gametes in higher plants. *Sex Plant Reprod* 1991; **5**: 145–154.
- [62] TIAN HQ, RUSSELL SD. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: I. Isolation of gametes. *Plant Cell Reports* 1997; **16**: 555–560.
- [63] TIAN HQ, RUSSELL SD. Micromanipulation of male and female gametes of *Nicotiana tabacum*: II. Preliminary attempts for *in vitro* fertilization and egg cell culture. *Plant Cell Reports* 1997; **16**: 657–661.
- [64] TIRLAPUR UK, KRANZ E, CRESTI M. Characterization of isolated egg cells, *in vitro* fusion products and zygotes of *Zea mays* L. using the technique of image analysis and confocal laser scanning microscopy. *Zygote* 1995; **3**: 57–64.
- [65] VAN DER MAAS HM, ZAAL MACM, DE JONG ER, KRENS FA, VAN WENT J L. Isolation of viable egg cells of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Protoplasma* 1993; **173**: 86–89.
- [66] WAGNER VT, SONG Y C, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. The isolated embryo sac of *Zea mays*: ultrastructural observations. [w] Sexual Reproductions in Higher Plants. M Cresti, P Gori, P Pacini (red.). Springer, New York Berlin Heidelberg, 1988, s. 125–130.
- [67] ZHANG G, GIFFORD DJ, CASS DD. RNA and protein synthesis in sperm cells isolated from *Zea mays* L. pollen. *Sex Plant Reprod* 1993; **6**: 239–243.
- [68] ZHANG G, WILLIAMS CM, CAMPENOT MK, MCGANN LE, CASS DD. Improvement of longevity and viability of sperm cells isolated from pollen of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 1992; **100**: 47–53.
- [69] ZHANG G, WILLIAMS CM, CAMPENOT MK, MCGANN LE, CUTLER AJ, CASS DD. Effects of calcium, magnesium, potassium, and boron on sperm cells isolated from pollen of *Zea mays* L. *Sex Plant Reprod* 1995; **8**: 113–122.
- [70] ZHOU C, YANG HY. Isolation of embryo sacs by enzymatic maceration and its potential in haploid study. [w] Haploids of higher plants *in vitro*. H Hu, H Yang (red.). Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo, 1986; s. 192–202.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 30.04. 1999 r.

Przyjęto: 19.07. 1999 r.

Adres autora ul. Grodzka 52, 31-044 Kraków

POSTĘPY W BADANIACH NAD ZAPŁODNIENIEM U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH (*ANGIOSPERMAE*): II. BIOCHEMICZNE I MOLEKULARNE ASPEKTY ZAPŁODNIENIA

ADVANCES IN FERTILIZATION RESEARCH IN ANGIOSPERMS: II. BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS

Lesław PRZYWARA, Marzena POPIELARSKA

Zakład Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Streszczenie: Zastosowanie techniki zapłodnienia *in vitro* z użyciem izolowanych gamet roślin okrytonasiennych oraz metod biologii molekularnej stworzyło nowe możliwości i przyniosło znaczący postęp w poznaniu biochemicznych i molekularnych mechanizmów leżących u podstaw zjawisk reprodukcyjnych u *Angiospermae*. W badaniach wykorzystuje się opracowane w ostatnich latach precyzyjne techniki molekularne, np. zmodyfikowaną metodę namnażania fragmentów DNA, tzw. RT/PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*), dzięki której można skonstruować bibliotekę cDNA z zaledwie kilku komórek. Pozwala to na izolowanie genów specyficznych dla komórki jajowej i zygoty oraz genów indukowanych przed, w trakcie i po zapłodnieniu. W artykule omówiono wyniki badań z tego zakresu. (*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 809–825)

Słowa kluczowe: *Angiospermae*, zapłodnienie *in vitro*, izolowane gamety, molekularne mechanizmy zapłodnienia.

Summary: The use of molecular techniques along with the method of *in vitro* fertilization with isolated gametes of angiosperms provide new tools for biochemical and molecular analysis of reproductive processes in this group of plants. Recent development of highly sensitive molecular tools such as PCR-based cDNA libraries originating from egg cells and zygotes as well as the RT-PCR technique at the single-cell level enables studying of gene expression in gametes and genes induced by fertilization. In this revue we have discussed the new results in this field.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 809–825)

Key words: *In vitro* fertilization, isolated gametes, angiosperms, molecular mechanisms.

WSTĘP

Zastosowaniu technik biologii molekularnej przyniosło duży postęp w poznaniu biochemicznych i molekularnych mechanizmów leżących u podstaw zjawisk reprodukcyjnych u roślin okrytonasiennych. Systematyczne badania genetyczne pozwoliły na identyfikację mutacji zaburzających poszczególne etapy ontogenezy zarodka. Wyizolowane zostały geny biorące udział w regulacji rozwoju tego najważniejszego żeńskiego organu generatywnego u roślin kwiatowych [2, 45, 79, 80]. Niedawno zidentyfikowano również mutacje wpływające na przebieg megagametogenezy oraz rozwój i funkcjonowanie gametofitu żeńskiego u *Arabidopsis thaliana* [13, 24]. Jest to ważny krok w kierunku poznania genów i ich produktów kierujących rozwojem i funkcjonowaniem tej niezbędnej w seksualnym rozmnażaniu roślin kwiatowych struktury. Tutaj znajdują się komórki jajowa i centralna, których zapłodnienie zapoczątkowuje rozwój nasienia.

W ostatnich latach zanotowano również znaczący postęp w poznaniu procesu zapłodnienia u *Angiospermae*. Opracowany został system eksperymentalny umożliwiający zapłodnienie *in vitro* z użyciem izolowanych gamet. Wykazano, że w przypadku kukurydzy możliwy jest rozwój powstałej tą drogą zygoty aż do stadium płodnej rośliny. Poczyniono także pierwsze kroki w indukowaniu podziałów niezapłodnionych komórek jajowych, co powinno pozwolić w przyszłości na badanie zjawiska partenogenezy u roślin. Zagadnienia te zostały omówione w odrębnej pracy [70]. Dzięki technice zapłodnienia *in vitro* możemy obecnie w ściśle określonych warunkach fizjologicznych, pozbawionych oddziaływań wynikających z obecności tkanek rośliny macierzystej, badać mechanizmy rozpoznawania się gamet i procesy rozwojowe zachodzące w czasie aktywacji komórki jajowej, powstania zygoty i wczesnego rozwoju zarodka i bielma. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie niektórych dokonań w tej dziedzinie.

OBECNY STAN WIEDZY O MECHANIZMACH REGULUJĄCYCH FUZJĘ GAMET I AKTYWACJĘ KOMÓRKI JAJOWEJ U *ANGIOSPERMAE*

Jedną z podstawowych kwestii związanych z procesem zapłodnienia są mechanizmy odpowiedzialne za rozpoznawanie się gamet przeciwnej płci. Niestety nie potrafimy jeszcze odpowiedzieć na pytanie, jak proces ten przebiega u roślin okrytonasiennych. Do badania mechanizmu rozpoznawania się gamet zastosować można różne strategie. Jedną z nich polega na identyfikacji cząsteczek biorących udział w rozpoznawaniu się gamet przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko

determinantom powierzchniowym zawartym w gametach żeńskich i męskich. Metoda ta z powodzeniem wykorzystywana u glonu *Fucus* [7] jak dotychczas nie sprawdzila się w przypadku roślin wyższych. Uzyskano wprawdzie monoklonalne przeciwciała w stosunku do powierzchni komórek plemnikowych szeregu gatunków roślin, jednak ze względu na znaczny stopień zanieczyszczeń powstałych w trakcie izolacji plemników reakcja immunologiczna nie była specyficzna [8, 9]. W odniesieniu do komórek jajowych opisana metoda nie była dotychczas stosowana; głównym ograniczeniem jest tu niewielka liczba komórek jajowych, jakimi mogą dysponować eksperymetatorzy.

Innym podejściem do badania zjawisk rozpoznawania się gamet żeńskiej i męskiej jest użycie systemu zapłodnienia *in vitro*. Identyfikacja inhibitorów zapłodnienia w warunkach *in vitro* mogłaby umożliwić identyfikację receptorów biorących udział w rozpoznawaniu się gamet [9]. Wreszcie wykorzystanie metod molekularnych do identyfikacji sekwencji cDNA specyficznych dla izolowanych komórek plemnikowej i jajowej może być pomocne w zrozumieniu mechanizmu rozpoznawania się gamet. Ostatnie osiągnięcia w zakresie konstruowania metodą PCR bibliotek cDNA z gamety żeńskiej i zygoty [19, 20] stwarzają szansę identyfikacji genów kodujących białka zaangażowane w rozpoznawanie się gamet i inne procesy związane z zapłodnieniem.

Cytologiczne, biochemiczne i molekularne zmiany prowadzących do aktywacji komórki jajowej, jak i sama jej aktywacja są dobrze udokumentowane u zwierząt [29, 40, 55, 86] i roślin niższych [4, 7]. Z badań tych wiadomo, że bardzo istotną rolę w procesie zapłodnienia odgrywają jony Ca^{2+} . W ostatnich latach ukazało się szereg prac wskazujących na kluczową rolę wapnia w procesach reprodukcyjnych u *Angiospermae* [12, 47, 60, 69, 88, 90- 92, 99, 101-103].

Doniesiono m.in. o korzystnym wpływie jonów Ca^{2+} jako czynnika regulującego zapłodnienie *in situ* [12, 91] i indukującego proces fuzji *in vitro*. Analiza zmian koncentracji jonów wapnia przeprowadzona przy użyciu technik fluorescencji [94] i spektroskopii elektronowej (EELS) [47] wykazały wzrost stężenia tego jonu bezpośrednio po zapyleniu, głównie w otoczeniu komórki jajowej i synergid. Zastosowanie monoklonalnych przeciwciał kalmoduliny (CaM) pozwoliło na ustalenie zmian w ilości błonowego Ca^{2+} . Stwierdzono wzrost poziomu CaM w momencie fuzji gamet, szczególnie wokół jądra komórkowego [90]. Eksperymenty nad fuzją gamet tytoniu (*Nicotiana tabacum*) wykazały, że wysokie stężenie jonów wapnia i wysokie pH nie wpływały indukująco na połączenie się gamet u tego gatunku. Wskazuje się jednocześnie, że raczej czas działania jonów Ca^{2+} na gamety, a nie stopień koncentracji tego czynnika może mieć istotny wpływ na szybkość przebiegu fuzji [84, 85].

W celu zbadania wpływu wapnia (Ca^{2+}) na zjawiska występujące w męskich gametach tuż przed zapłodnieniem, Williams i wsp. [94] badali fosforylację i zmiany poziomu białek wiążących wapń (kalmoduliny i kalretikuliny) w izolowanych ple-

mnikach kukurydzy. Stosując techniki immunologiczne stwierdzono, że podczas gdy inkubacja komórek plemnikowych w obecności 1 mM Ca^{2+} przez okres 1 godz. zwiększała poziom kalmoduliny o 136% w porównaniu z kontrolą, poziom kalretikuliny wzrósł stosunkowo nieznacznie (34% po 3-godz. traktowaniu) w komórkach plemnikowych. Fosforylacja białek była niska zarówno w materiale kontrolnym, jak i po jednogodzinnym traktowaniu Ca^{2+} , jednakże po 12 godz. inkubacji w obecności wapnia nastąpił 13-krotny wzrost fosforylacji białka o masie 18 kDa. Przypuszcza się, że obserwowane w eksperymencie zmiany fosforylacji białek indukowane wapniem mogą być analogiczne do zjawisk występujących w plemnikach tuż przed zapłodnieniem w warunkach *in situ* i ułatwiają fuzję plemników z komórką jajową i komórką centralną.

Z innych badań [99] wynika, że jony wapnia są odpowiedzialne za fuzję izolowanych plemników kukurydzy. W rosnących łagiewkach pyłkowych, w odległości 20 do 50 μm od szczytu łagiewki stwierdzono podwyższoną koncentrację jonów wapnia. Plemniki natomiast znaleziono w odległości nie mniejszej niż 90 μm od szczytu łagiewki. Wyniki te sugerują, że przed uwolnieniem plemników do degenerującej synergidy znajdują się one w regionie ubogim w wapń.

Badania nad dynamiką zmian w poziomie jonów Ca^{2+} w trakcie wzrostu i wejścia łagiewki pyłkowej do woreczka zalążkowego wykazały u wszystkich przebadanych gatunków zlokalizowany szczytowo gradient ograniczony do niewielkiego obszaru błony plazmatycznej na najbardziej wysuniętym fragmencie szczytu wierzchołka łagiewki. Wzrost łagiewki powoduje fluktuacje gradientu [69].

Rozmieszczenie wapnia w zalążkach i woreczkach zalążkowych przed i po zapłodnieniu badano u tytoniu [88]. Przed zapłodnieniem, w komórkach nucellusa otaczających kanał mikropylarny pojawiają się obfite złogi wapnia. Akumulacja wapnia jest większa w synergidzie, która w przyszłości stanie się receptywna dla łagiewki pyłkowej. Po zapłodnieniu złogi wapnia w mikropyle zanikają, a wnikanie kolejnych łagiewek pyłkowych ulega zahamowaniu. Wykazano zatem, że zdolność zalążków do zapłodnienia jest skorelowana z obecnością wapnia, który jest niezbędny dla wniknięcia łagiewki pyłkowej do woreczka zalążkowego.

Ostatnie prace ujawniły cząsteczki sygnałowe, które kontrolują zapylenie, włączając peptydy pośredniczące w rozpoznawaniu pyłku i glikoproteidy podtrzymujące wzrost łagiewki pyłkowej. Spolaryzowany wzrost łagiewki pyłkowej wymaga kaskady sygnałów warunkowanych udziałem wapnia i wskazówek pochodzących od haploidalnych i diploidalnych komórek zalążka skierowujących łagiewki do komórki jajowej (omówienie [93]).

Podczas zapłodnienia u zwierząt wniknięcie plemnika do jaja powoduje gwałtowny, krótkotrwały, wzrost poziomu wapnia. Wydaje się, że podobne zjawisko występuje również u roślin okrytonasiennych. Pierwszy dowód na podniesienie poziomu wolnych jonów wapnia w cytosolu komórki jajowej będący efektem zapłodnienia został przedstawiony przez Digonnet i wsp. w 1997 r. [18]. Stosując

system zapłodnienia *in vitro* u kukurydzy stwierdzono, że adhezja gamet nie powodowała żadnych zmian w poziomie cytosolowego Ca^{2+} w komórce jajowej, natomiast fuzja wywoływała gwałtowne, trwające kilka minut podniesienie poziomu wapnia. Obserwacje te otwierają drogę do identyfikacji u roślin kwiatowych wczesnych sygnałów indukowanych w okresie poprzedzającym zapłodnienie jak i w trakcie samego zapłodnienia oraz do badania roli wapnia podczas fazy aktywacji komórki jajowej i wczesnego etapu rozwoju zygoty.

Ważnym zjawiskiem związanym z aktywacją komórki jajowej u glonów jest synteza ściany komórkowej [7]. Stosując system zapłodnienia *in vitro* u kukurydzy stwierdzono, że składniki odbudowywanej *de novo* ściany komórkowej pojawiają się już w 30 sekund, po fuzji komórki jajowej z plemnikową natomiast – po 20 min ściana pokrywa już całą zapłodnioną komórkę jajową [46]. Przypuszcza się, że odbudowa ściany komórkowej zmniejsza lub wręcz uniemożliwia zajście polispermii. Świadczyć może o tym fakt, że po wprowadzeniu w pobliże produktów fuzji dodatkowych gamet męskich (10-45 minut po zainicjowaniu fuzji, a więc w czasie kiedy obserwuje się już odbudowę składników ściany komórkowej zygoty) nie stwierdzono wnikania do zapłodnionej komórki jajowej dodatkowych plemników [27]. Jest to pierwsza tego typu obserwacja dotycząca zapłodnienia u roślin okrytonasiennych.

Zapłodnienie u roślin niższych często związane jest z modyfikacjami powierzchni i cytoszkieletu komórki jajowej połączonymi z migracją jądra gamety męskiej [34, 49, 59, 87]. Podobne zjawiska obserwowano także u roślin wyższych. Przykładem może być deformacja kształtu komórki jajowej kukurydzy bezpośrednio po fuzji indukowanej elektrycznie lub chemicznie [27, 28, 46]. O tym, czy taka deformacja wystąpi decyduje turgor komórki jajowej w trakcie jej izolacji i fuzji z gametą męską. Wrzecionowata komórka plemnikowa łączy się z komórką jajową z większą wydajnością niż komórka sferyczna [46]. Należy podkreślić, że wyniki otrzymane w warunkach *in vitro* muszą być interpretowane z dużą ostrożnością i nie mogą być w bezpośredni sposób odnoszone do zjawisk występujących podczas zapłodnienia *in situ*.

Osobnym zagadnieniem jest kwestia preferencji komórek plemnikowych w procesie podwójnego zapłodnienia [74]. Przypuszcza się, że rozdział gamet męskich może mieć związek z nierównym podziałem materiału genetycznego [30].

Przedmiotem badań jest również transport komórek plemnikowych w łagiewce. Pewne dane wskazują na istnienie komunikacji między woreczkiem zalążkowym a łagiewką pyłkową oraz na udział w tym procesie miozyny, białka zidentyfikowanego wewnątrz łagiewki pyłkowej u tytoniu [75, 100].

Coraz więcej uwagi poświęca się ostatnio zagadnieniu związku między cyklem komórkowym, różnicowaniem się gamet i zapłodnieniem u roślin wyższych. Wiele danych wskazuje na kluczową rolę cyklu komórkowego i genów z nim związanych w kierowaniu procesem różnicowania się gamet i ich fuzji. Wykazano, że gamety

żeńskie i męskie reprezentują tę samą fazę cyklu komórkowego w momencie fuzji [61, 62]. Oznacza to, że sukces fuzji wydaje się być uzależniony od uzyskania synchronizacji przebiegu cyklu komórkowego przez komórkę jajową i plemnikową przed zapłodnieniem i podczas kariogamii. Cykl komórkowy powinien być zatem postrzegany jako 'zegar', który koordynuje procesy związane z gametogenezą i zapłodnieniem.

Badania nad cyklem komórkowym w plemnikach *Arabidopsis* wykazały, że w momencie zapylenia ilość DNA w pyłku wynosi 1.5 C DNA. Kiedy łagiewka dociera do zalążni, w jądrach komórek plemnikowych zawartość DNA wynosi 1.75 C, natomiast tuż przed podwójnym zapłodnieniem 2 C DNA [31]. Opisany sposób przebiegu fazy S przed zapłodnieniem u roślin kwiatowych jest odmienny niż u wszystkich innych nieroślinnych organizmów eukariotycznych, gdzie plemnik pozostaje w fazie G₁ podczas rozwoju przed fuzją gamet. Powyższe badania mają również pewne praktyczne implikacje. Pokazują one bowiem, że analiza przebiegu cyklu komórkowego może być wykorzystywana do oceny przydatności gatunku w eksperymentach z zapłodnieniem *in vitro*.

Problem replikacji zygotycznego DNA był przedmiotem interesujących badań prowadzonych nad izolowanymi zygotami jęczmienia i kukurydzy [61, 62]. Wykazały one, że u jęczmienia wartość 4C DNA (efekt replikacji) była osiągana 22–29 godzin po zapyleniu. U kukurydzy pierwszy podział zygoty *in vivo* zachodził 32 godz. po zapyleniu, podczas gdy zygota otrzymana *in vitro* dzieliła się dopiero 42–46 godzin po fuzji.

Eksperymenty przeprowadzone na izolowanych zygotach mają duże znaczenie dla zrozumienia procesów odpowiedzialnych za przekształcenie się zygoty w zarodek. Podczas gdy mechanizmy molekularne, które indukują i regulują tę transformację u roślin okrytonasiennych, są słabo poznane [25], u zwierząt wiele kwestii z tym związanych jest już w znacznym stopniu wyjaśnionych (omówienie [15, 77]).

POLARYZACJA KOMÓRKI JAJOWEJ I ZYGOTY *IN VITRO*

Postuluje się, że asymetria komórkowa odgrywa istotną rolę w embriogenezie. Badania nad molekularnymi aspektami polaryzacji w rozwoju roślin są najbardziej zaawansowane u glonów *Fucus* i *Pelvetia* należących do brunatnic (*Phaeophyta*) [1, 4, 5, 7, 48, 71]. Dane na ten temat odnoszące się do roślin wyższych są znacznie uboższe. Studia nad ekspresją genów u *Arabidopsis* i w innych układach eksperymentalnych, ujawniły konsekwencje rozwojowe wynikające z asymetrii w późniejszych stadiach embriogenezy. Badania genetyczne sugerują, że asymetria komórkowa jest odpowiedzią na jakieś niezidentyfikowane dotychczas sygnały po-

chodzące z sąsiednich komórek. Natura sygnałów biorących udział w determinacji losów zarodka jest jednak słabo poznana. Wszelkie dostępne dowody uzyskane w wyniku badań genetycznych i molekularnych wydają się potwierdzać przypuszczenie, że formowanie się wzoru zarodka postępuje stopniowo z udziałem komunikacji pomiędzy klonalnie niespokrewnionymi komórkami (omówienia ostatnich badań na ten temat [35, 42, 43, 56, 78]).

System zapłodnienia *in vitro* może ułatwić zrozumienie roli polaryzacji i asymetryczności zygoty w procesie zapłodnienia. Polarność zygoty, mająca wpływ na asymetryczny podział komórki, a w konsekwencji na wyodrębnienie się zarodka właściwego i suspensora, może mieć swój początek w rozmieszczeniu cytoplazmy w obrębie komórki jajowej. W izolowanych komórkach jajowych, które stają się sferyczne, polarność wydaje się być utrzymana. Protoplasty komórek jajowych, a także produkty fuzji dwóch protoplastów komórek jajowych odtwarzają w kulturze ścianę komórkową tylko na jednym biegunie komórki, co można tłumaczyć próbą przywrócenia polarności typowej *in vivo*, gdzie ściana komórkowa otacza komórkę jajową tylko częściowo. Wyraźna polaryzacja jest obserwowana po fuzji z komórką plemnikową i w rozwijającej się zygocie [46]. Ostatnio wykazano przy użyciu sond fluorescencyjnych chlorotetracykliny (CTC) i flufenazyny (FPZ), że rozmieszczenie wapnia i kalmoduliny podczas rozwoju izolowanej zygoty i młodego zarodka pszenicy jest wyraźnie spolaryzowane, a ich koncentrację stwierdzono w regionach, w których następowało różnicowanie się pączka zarodkowego i zawiązku korzenia [102].

MOLEKULARNE ASPEKTY ZAPŁODNIENIA U *ANGIOSPERMAE*

Niewiele wiadomo jeszcze o mechanizmach, które aktywują i kontrolują rozwój komórki jajowej i komórki centralnej po zapłodnieniu. Nasuwa się wiele fundamentalnych pytań związanych z tym zagadnieniem. Dla przykładu, czy istnieją geny, których ekspresja ma miejsce tylko w komórkach plemnikowej i jajowej? Czy zapłodnienie indukuje ekspresję określonych genów? Czy istnieją geny specyficzne dla zygoty? Jaka jest rola genów podczas rozwoju zygoty i w początkowych etapach embriogenezy u roślin okrytonasiennych? Na niektóre z tych pytań potrafimy już częściowo odpowiedzieć.

W celu przeprowadzenia badań molekularnych konstruuje się biblioteki cDNA jako źródło dla izolacji genów z komórek plemnikowych kukurydzy, które można uzyskiwać z wysoką wydajnością. W przeciwieństwie do komórek plemnikowych izolacja genów z komórek jajowych i zygot jest utrudniona ze względu na ograniczoną ilość materiału. Pomocne są tu zmodyfikowane metody namazania fragmentów

DNA, tzw. RT/PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*), dzięki którym można skonstruować bibliotekę cDNA z zaledwie kilku komórek [19, 73]. Wykorzystując metodę PCR utworzono biblioteki cDNA kukurydzy ze 128 niezapłodnionych komórek jajowych i 104 zygot w 18 godz. od momentu zapłodnienia *in vitro*. Z wymienionych bibliotek wyizolowano ponad 50 różnych genów, których ekspresja jest regulowana po zapłodnieniu. Kilka wyizolowanych klonów wydaje się ulegać ekspresji wyłącznie w komórkach jajowych kukurydzy i zygotach otrzymanych *in vitro*. Kolejne wyodrębnione geny, których ekspresja indukowana jest po zapłodnieniu, nie podlegały ekspresji lub tylko na bardzo niskim poziomie, w niezapłodnionych komórkach jajowych. Większość tych klonów nie była wcześniej opisana i wydaje się być specyficzna dla woreczka zalążkowego [14]. Niektóre z nich, homologiczne do znanych białek, są zaangażowane w podziały i cykl komórkowy, translację, replikację i naprawę DNA, modyfikację i degradację białek [22].

Jednym ze zidentyfikowanych klonów z biblioteki cDNA zygot kukurydzy otrzymanych w warunkach *in vitro* jest klon kodujący kalretikulinę [20]. Kalretikulina jest głównym białkiem gromadzącym wapń, zlokalizowanym przede wszystkim we wnętrzu kanałów siateczki śródplazmatycznej, ale także w jądrze komórkowym i cytoplazmie [50]. Wzmoczona ekspresja tego genu następuje po zapłodnieniu i jest ściśle związana z podziałem komórki. Dane te wydają się wskazywać na duże znaczenie kalretikuliny jako magazynu Ca^{2+} w czasie zapłodnienia oraz pierwszego podziału zygoty. Potwierdzają to doniesienia innych autorów o podniesieniu się poziomu tego jonu w obrębie cytoplazmy przy elektrofuzji komórki jajowej z plemnikiem [90]. Opisany gen kalretikuliny jest pierwszym klonem cDNA wyizolowanym z biblioteki cDNA utworzonej metodą RT/PCR i pierwszym genem wyizolowanym z zygoty roślin wyższych.

Wśród wspomnianych 50 różnych genów z biblioteki cDNA komórek jajowych i zygot kukurydzy, zidentyfikowano również cDNA kodujący jeden z czynników inicjujących translację określanej jako eIF-5a [21]. Ten wysoce konserwatywny czynnik jest konieczny do stabilizacji mRNA i inicjacji procesu translacji. Mimo że komórki jajowe uważane są za nieaktywne metabolicznie, wykazano, że zmagazynowana jest w nich duża ilość transkryptu tego genu. Po zapłodnieniu ilość transkryptu maleje. Wynik ten sugeruje, że niezapłodniona komórka jajowa kukurydzy mimo stosunkowo małej aktywności metabolicznej jest przygotowana do translacji wybranych odcinków mRNA, stąd też proces ten zostaje szybko uruchomiony po zapłodnieniu, wcześniej niż ma to miejsce u zwierząt. Siedem innych sklonowanych genów koduje białka związane prawdopodobnie z translacją, a dwa inne przypuszczalnie zaangażowane są w replikację DNA [23]. Druga grupa z wymienionych genów jest indukowana w trakcie procesu zapłodnienia. Wskazuje to, że aktywacja genu zygotycznego (ZGA – *Zygotic Gene Activation*) i zmiana kontroli rozwoju z macierzystego na zarodkowy zachodzą u zygot roślin wyższych krótko po za-

plodnieniu. Poddano analizie cztery transkrypty białek rybosomalnych zaangażowanych w biosyntezę rybosomów i proces translacji. Ekspresja wszystkich tych genów jest skorelowana z aktywnością podziałową komórki i jest silnie indukowana w czasie fazy G₁ komórek somatycznych. Odmienne typy regulacji ma miejsce w pierwszym cyklu komórkowym szlaku embrionalnego, gdzie duża ilość transkryptu jest przechowywana w niezapłodnionej komórce jajowej. Przeprowadzona analiza czterech genów kodujących białka rybosomalne wykazała, że pierwszy cykl komórkowy w zygocie i komórkach somatycznych jest odmiennie regulowany u roślin wyższych.

Wśród klonów, wyizolowanych z materiału genetycznego pobranego z niezapłodnionej komórki jajowej, zygot, a także komórek plemnikowych kukurydzy, zidentyfikowano nieznane dotąd geny z wysoko konserwatywnej rodziny genów MADS-box odgrywające znaczącą rolę w rozwoju organów generatywnych roślin. Transkrypty dwóch wyizolowanych genów znaleziono w kiełkującej łagiewce pyłkowej [38].

Metoda zapłodnienia *in vitro* pozwala również na badanie roli znanych już genów (np. genów regulujących cykl komórkowy). Wykorzystując tę technikę Sauter i wsp. [76] badali regulację podziału zygoty kukurydzy przez analizę ekspresji genów regulatorowych cyklu komórkowego. Śledzono transkrypty genów *cdc2* i cyklin, jak również genów kodujących histony. Analizowano ekspresję genów w komórce plemnikowej, we wszystkich komórkach megagametofitu (tj. synergidach, komórce jajowej, komórce centralnej i w antypodach), a także w zygocie i stadium dwukomórkowego prazarodka. Podczas gdy ekspresję genu *cdc2* stwierdzono w komórce plemnikowej, we wszystkich komórkach woreczka zalążkowego i podczas rozwoju zygoty, geny cyklin wykazują komórkowo-specyficzną ekspresję w woreczku zalążkowym i zróżnicowaną ekspresję podczas rozwoju zygoty. U roślin wszystkie trzy przebadane cykliny podlegają transkrypcji *de novo* po zapłodnieniu, podczas gdy u zwierząt wczesne podziały komórek embrjonalnych są regulowane cyklina mRNA pochodzącą od matki.

Rola gamety męskiej w procesie zapłodnienia jest bardzo słabo poznana. Komórka plemnikowa przylega do gamety żeńskiej, a następnie łączy się z nią. Przypuszcza się, że te wysoce wyspecjalizowane funkcje są aktywowane przez unikalny zestaw genów. Tradycyjnie komórki gametofitu męskiego uważane były za nieaktywne transkrypcyjnie ze względu na wysoce skondensowaną chromatynę i bardzo ograniczoną ilość cytoplazmy. Xu i wsp. [95] dostarczyli dowodów na ekspresję genów specyficznych dla gamety męskiej u roślin kwiatowych. Zidentyfikowali i scharakteryzowali gen *LGCI*, który ujawnia się wyłącznie w gamecie męskiej. Produkty tego genu są zlokalizowane na powierzchni komórek plemnikowych sugerując ich rolę w interakcjach plemnik-komórka jajowa. Odkrycie to stanowi ważny krok w kierunku zdefiniowania molekularnych mechanizmów rozwoju gamet męskich i procesów komórkowych związanych z zapłodnieniem u roślin kwiatowych. W

innej pracy [96] ci sami autorzy wyizolowali klony cDNA kodujące specyficzne dla komórki generatywnej histony gcH2A i cH3. Hybrydyzacja *in situ* wykazała, że obydwa geny są aktywowane po utworzeniu komórki generatywnej i akumulacja ich transkryptów zwiększa się podczas dojrzewania komórki generatywnej. Wyniki te sugerują, że gcH2A i gcH3 mRNAy są produktami transkrypcyjnej aktywacji jądra komórki generatywnej. Dane te są pierwszymi dowodami ekspresji genów specyficznych dla komórek męskiej linii generatywnej.

Inną grupą genów, które ostatnio wyizolowano z rozwijającego się pyłku kilku gatunków roślin, są konserwatywne ewolucyjnie geny kodujące roślinne kinazy białkowe homologiczne do zwierzęcych kinaz określanych jako GSK-3/shaggy [89]. Analiza sekwencyjna wykazała, że geny te tworzą izolowaną grupę nazwaną PSK6. Trzy geny izolowane z pyłku *Petunia hybrida* i *Arabidopsis thaliana* miały taką samą organizację genomową: 12 intronów i 13 eksonów i chociaż wielkość intronów zmieniała się, ich położenie było stałe w obrębie poszczególnych genów i gatunków.

Interesujące badania nad molekularnymi i fizjologicznymi procesami pobierania i metabolizmu cukru podczas wzrostu łagiewki pyłkowej i zapłodnienia u *Petunia hybrida* prowadzili ostatnio Yistra i wsp. [98]. Wykazano aktywność związanej ze ścianą komórkową inwertazy i pobieranie cukru przez łagiewkę w postaci monosacharydów. Z pyłku petuni wyizolowano transporter monosacharydów: *pml* (*petunia monosacharide transporter 1*), który należy do małej rodziny genów specyficznych dla męskiego gametofitu. Gen ten jest aktywowany po pierwszej mitozie w mikrosporze, a wysoki poziom mRNA obserwuje się w dojrzałym i kielkującym pyłku.

Fundamentalnym problemem w biologii rozmnażania roślin okrytonasiennych jest zrozumienie, jakie procesy regulują rozwój zarodka i endospermy. Ponieważ szczegółowe omówienie tych zagadnień przekraczałoby zakres niniejszego opracowania, ograniczyliśmy się do zasygnalizowania kilku wybranych kwestii.

Rozwój zygoty i wczesna embriogeneza są z powodzeniem badane na poziomie molekularnym u niektórych zwierząt doświadczalnych (*Drosophila*, mysz). Wiedza na ten temat jest obecnie bardzo obszerna, a szczególnie wiele informacji uzyskano dzięki analizie mutantów rozwojowych u zwierząt. Mutanty tego typu są również znane i intensywnie badane u roślin (głównie u *Arabidopsis thaliana* i *Zea mays*). Studia te dostarczyły wielu danych na temat genetycznych i molekularnych mechanizmów regulujących embriogenezę [6, 16, 17, 32, 33, 36, 37, 41, 51-53, 57, 58, 64, 68, 83]. Okolicznością utrudniającą rozpoznanie i badanie mutantów rozwojowych w warunkach *in situ* jest lokalizacja zarodka głęboko we wnętrzu tkanek zalążka. Metoda zapłodnienia *in vitro* stworzyła nowe szanse dokładniejszego badania aberacji rozwojowych u roślin. Dotyczy to przede wszystkim mutantów u kukurydzy, bowiem u tego gatunku zygota otrzymana w wyniku fuzji izolowanych gamet jest zdolna do podziałów i kontynuowania rozwoju analogicznego do embriogenezy zygotycznej *in situ*. System zapłodnienia *in vitro* daje możliwość badania mecha-

nizmów molekularnych związanych z podwójnym zapłodnieniem i wyodrębnienia genów odpowiadających za rozwój zygoty i zarodka. Może zatem stanowić istotne uzupełnienie studiów wykorzystujących mutacje rozwojowe, zjawisko somatycznej embriogenezy i androogenezy.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania badaczy bielmem. Z badań tych wyłania się bardziej kompleksowy obraz interakcji między zarodkiem i bielmem (omówienie [3, 67]). Cennych informacji na temat inicjacji i rozwoju endospermy dostarczyły badania nad mutantami *Arabidopsis*, u których następuje rozwój bielma i nasion bez zapłodnienia (*fie* – *fertilization-independent endosperm*; *fis* – *fertilization-independent seed*) [10, 11, 44, 54, 66]. Zaobserwowano, że zapłodnienie komórki jajowej i centralnej mutanta *f644* plemnikami pochodzącymi z normalnej rośliny powodowało zahamowanie rozwoju zarodka oraz nadprodukcję endospermy. Wykazano także, że sklonowany gen *F644* jest identyczny z genem *MEDEA*, którego allel pochodzenia matczynego jest wymagany dla embriogenezy. Mutacje tego genu są letalne i powodują śmierć zarodka. Przypuszcza się, że *MEDEA* może być czynnikiem remodelującym chromatynę. [33, 72, 82]. Geny matczynego efektu są dobrze znane u zwierząt, natomiast są zupełnym *novum* u roślin. Badania te dopiero się rozpoczęły. Mogą one przynieść wiele nowych informacji na temat imprintingu u roślin wyższych oraz przyczynić się do wyjaśnienia rozpowszechnionego u wielu roślin zjawiska apomiksji, czyli wytwarzania nasion bez zapłodnienia.

Innym modelowym obiektem badań nad bielmem są zboża (głównie kukurydza i pszenica). Prowadzone prace dotyczą m.in. molekularnych i cytologicznych procesów różnicowania się bielma, endoreduplikacji i programowanej śmierci komórkowej [39, 63, 65, 81, 99].

PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Opracowana w ostatnich latach technika zapłodnienia *in vitro* z użyciem izolowanych gamet roślin okrytonasiennych pozwala na badania z zakresu biochemii i ekspresji genów specyficznych dla komórki jajowej, plemnikowej i zygoty. Stwarza ona możliwość śledzenia procesów rozwojowych zachodzących w czasie aktywacji komórki jajowej, w stadium zygoty i podczas wczesnych etapów rozwojowych zarodka w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach fizjologicznych wolnych od oddziaływań wynikających z obecności tkanek rośliny macierzystej. Ograniczenia w badaniach nad tymi zagadnieniami są nadal powodowane niewielką liczbą izolowanych komórek jajowych, synergid i komórek centralnych, jaką jednorazowo mogą dysponować eksperymentatorzy.

Izolacja genów z bibliotek cDNA niezapłodnionych komórek jajowych i zygot jest pierwszym krokiem na drodze do poznania molekularnych procesów zapłodnienia i początkowych faz rozwoju zarodka. Połączenie techniki kultur pojedynczych komórek z metodami molekularnymi daje możliwość wyizolowania i opisanie genów ulegających ekspresji w gametach żeńskich i zygotach roślin wyższych. Dla bardziej precyzyjnego zbadania i poznania zachodzących procesów niezbędna jest jednak większa ilość bibliotek cDNA z różnych faz rozwojowych zygoty i prazarodka. Udoskonalone metody PCR pozwalają dzisiaj na badanie ekspresji genów nawet w pojedynczych komórkach. Daje to możliwość sprecyzowania czasu ekspresji genów przed, w trakcie i po zapłodnieniu. Nieodległa wydaje się perspektywa, kiedy manipulacje komórkami gametofitowymi będą wykorzystywane w doskonaleniu odmian roślin użytkowych [26, 97].

LITERATURA

- [1] ALESSA L, KROPF DL. F-actin marks the rhizoid pole in living *Pelvetia compressa* zygotes. *Development* 1999; **126**: 201–209.
- [2] BAKER SC, ROBINSON-BEERS K, VILLANUEVA JM, GAISER JC, GASSER CS. Interactions among genes regulating ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 1997; **145**: 1109–1124.
- [3] BERGER F. Endosperm development. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 28–32.
- [4] BERGER F, BROWNLEE C. Ratio confocal imaging of free cytosolic calcium gradients in polarising and polarised *Fucus* zygotes. *Zygote* 1993; **1**: 9–15.
- [5] BISGROVE SR, KROPF DL. Alignment of centrosomal and growth axes is a late event during polarization of *Pelvetia compressa* zygotes. *Dev Biol* 1998; **194**: 246–256.
- [6] BRETON C, CHABAUD A, MATTHYS-ROCHON E, BATES EE, COCK JM, FROMM H, DUMAS C. PCR-generated cDNA library of transition-stage maize embryos: cloning and expression of calmodulin genes during early embryogenesis. *Plant Mol Biol* 1995; **27**: 105–113.
- [7] BROWNLEE C. Signal transduction during fertilisation in algae and vascular plants. *New Phytol* 1994; **127**: 399–423.
- [8] CHABAUD A, PEREZ R. Generative cells and male gametes: isolation, physiology, and biochemistry. *Int Rev Cytol* 1992; **140**: 205–232.
- [9] CHABAUD A, PEREZ R, DIGONNET C, DUMAS C. Gamete recognition in angiosperms: model and strategy for analysis [w] Perspectives in plant cell recognition. JA Callow, JR Green (red.) Cambridge University Press, Cambridge 1992; s. 59–77.
- [10] CHAUDHURY AM, LOU M, MILLER C, CRAIG C, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4223–4228.
- [11] CHAUDHURY AM, CRAIG S, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 26–31.
- [12] CHEN F, HAYES PM, MULROONEY DM, PAN A. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant J* 1994; **6**: 835–843.
- [13] CHRISTENSEN CA, SUBRAMANIAN S, DREWS GN. Identification of gametophytic mutations affecting female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 1998; **202**: 136–151.

- [14] CORDTS S, KRANZE, BRETTSCHEIDER R, LÖRZ H, DRESSELHAUS T. Isolation and characterization of genes which are specifically expressed in the unfertilized egg cell of maize (*Zea mays*). Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 21.
- [15] DEHAAN RL. Forum: How does a zygote become an embryo? Gap junction communication and cell adhesion in development. *Zygote* 1994; **2**: 183–188.
- [16] DE JONG AJ, SCHMIDT ED, DE VRIES SC. Early events in higher-plant embryogenesis. *Plant Mol Biol* 1993; **22**: 367–377.
- [17] DE VRIES SC. Making embryos in plants. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 451–452.
- [18] DIGONNET C, ALDON D, LEDUC N, DUMAS C, ROUGIER M. First evidence of calcium transient in flowering plant at fertilization. *Development* 1997; **124**: 2867–2874.
- [19] DRESSELHAUS T, LÖRZ H, KRANZE. Representative cDNA libraries from few plant cells. *Plant J* 1994; **5**: 605–610.
- [20] DRESSELHAUS T, HAGEL CH, LÖRZ H, KRANZ E. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of *in vitro* zygotes of maize. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 23–34.
- [21] DRESSELHAUS T, CORDTS S, LÖRZ H. A transcript encoding translation initiation factor eIF-5a is stored in unfertilized egg cells of maize. *Plant Mol Biol* 1999; **34**: 1–9.
- [22] DRESSELHAUS T, CORDTS S, HEUER S, BANTIN J, LÖRZ H, KRANZ E. Gene expression during fertilization and zygote development in maize (*Zea mays* L.) Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 25.
- [23] DRESSELHAUS T, CORDTS S, HEUER S, SAUTER M, LÖRZ H, KRANZ E. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Mol Gen Genet* 1999; **261**: 416–427.
- [24] DREWS GN, LEE D, CHRISTENSEN CA. Genetic analysis of female gametophyte development and function. *The Plant Cell* 1998; **10**: 5–17.
- [25] DUMAS C, BERGER C, FAURE JE, MATTHYS-ROCHON E. Gametes, fertilization and early embryogenesis in flowering plants. [w] *Advances in Botanical Research*. JA Callow (red.) London, Academic Press, 1998.
- [26] DUMAS C, FAURE JE. Use of *in vitro* fertilization and zygote culture in crop improvement. *Curr Opin Biotech* 1995; **6**: 183–188.
- [27] FAURE JE, DIGONNET C, DUMAS C. An *in vitro* system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* 1994; **263**: 1598–1600.
- [28] FAURE JE, DIGONNET C, MÖL R, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. *In vitro* pollination and fertilization in maize (*Zea mays* L.): technical procedure and prospects for the dissection of the double fertilization process. *Plant Sci* 1994; **104**: 1–10.
- [29] FOLZ KR, SHILLING FM. Forum: How does a spermatozoon activate an oocyte? Receptor-mediated signal transduction and egg activation. *Zygote* 1993; **1**: 276–279.
- [30] FRIEDEN DJ, PETERSON PA. Sperm preference in fertilization. Plant Reproduction 1996, 14th International Congress on Plant Reproduction, 18–23 February 1996, Cumberland Resort, Lorn, Victoria, Australia, s. 139.
- [31] FRIEDMAN WE. Expression of the cell cycle in sperm of *Arabidopsis*: implications for understanding patterns of gametogenesis and fertilization in plants and other eukaryotes. *Development* 1999; **126**: 1065–1075.
- [32] GOLDBERG RB, BARKER SJ, PEREZ-GRAUL. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 1989; **56**: 149–160.
- [33] GROSSNIKLAUS U, VIELLE-CALZADA J-P. ... response: Parental conflict and infanticide during embryogenesis. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 328.
- [34] HABLE WE, KROPF DL. Roles of secretion and the cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes. *Dev Biol* 1998; **198**: 45–56.
- [35] HARADA JJ. Signaling in plant embryogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 23–27.

- [36] HARADA JJ, LOTAN T, FISCHER RL, GOLDBERG RB. ...response: Embryos without sex. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 452–453.
- [37] HECK GR, PERRY SE, NICHOLS KW, FERNANDEZ DE. AGL15, a MADS domain expressed in developing embryos. *The Plant Cell* 1995; **7**: 1271–1282.
- [38] HEUER S, LÖRZ H, DRESSELHAUS T. Characterization of novel maize MADS box expressed in egg cells and during pollen tube growth. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 31.
- [39] HEUROS G, VAROTTO S, SALAMINI F, THOMPSON RD. Molecular characterization of BET1, a gene expressed in the endosperm transfer cells of maize. *The Plant Cell* 1995; **9**: 747–757.
- [40] HOGBEN M, PARRINGTON J, SHEVCHENKO V, SWANN K, LAI FA. Calcium oscillations, sperm factors and egg activation at fertilization. *J Mol Med* 1998; **76**: 548–554.
- [41] HOLDSWORTH M, KURUP S, MCKIBBIN R. Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends in Plant Sci* 1999; **4**: 275–280.
- [42] JÜRGENS G, GREBE M, STEINMANN T. Establishment of cell polarity during early plant development. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 849–852.
- [43] JÜRGENS G, MAYER U, BUSCH M, LUKOWITZ W, LAUX T. Pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: a genetic perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1995; **350**: 19–25.
- [44] KIYOSUE T, OHAD N, YADEGARI R, HANNON M, DINNENY J, WELLS D, KATZ A, MARGOSSIAN L, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISCHER RL. Control of fertilization-independent endosperm development by the *MEDEA* polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4186–4191.
- [45] KLUCHER KM, CHOW H, REISER L, FISHER RL. The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell* 1996; **8**: 137–153.
- [46] KRANZE, VON WIEGEN P, LÖRZ H. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following *in vitro* fertilization with angiosperm gametes. *Plant J* 1995; **8**: 9–23.
- [47] KRISTOF Z, TIMAR O, IMRE K. Changes of calcium level in *Torenia* embryo sac during fertilization. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 36.
- [48] KROPF DL. Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. *Microb Rev* 1992; **56**: 316–339.
- [49] KROPF DL. Cytoskeletal control of cell polarity in plant zygote. *Dev Biol* 1994; **165**: 361–371.
- [50] LIBIK M. Kalretikulina – charakterystyka biochemiczna i funkcje w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 501–509.
- [51] LIN X, HWANG GJ, ZIMMERMAN JL. Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1365–1374.
- [52] LIU CM, MEINKE DW. The titan mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and cell cycle control during seed development. *Plant J* 1998; **16**: 21–31.
- [53] LOTAN T, OHTO M, YEE KM, WEST MA, LO R, KWONG RM, YAMAGISHI K, FISHER RL, GOLDBERG RB, HARADA JJ. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 1998; **26**: 1195–205.
- [54] LOU M, BILDENAU P, KOLTUNOV A, DENNIS ES, PEACOCK WJ, CHAUDHURY AM. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 296–301.
- [55] MALESZEWSKI M. Molekularne mechanizmy zapłodnienia u ssaków. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 85–87.
- [56] MAYER U, JÜRGENS G. Pattern formation in plant embryogenesis: a reassessment. *Semin Cell Dev Biol* 1998; **9**: 187–193.

- [57] MAYER U, TORRES RA, BERLETH T, MISÉRA S, JÜRGENS G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 1991; **353**: 402–407.
- [58] MEINKE DW. Molecular genetics of plant embryogenesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1995; **46**: 369–394.
- [59] MENZEL D. The role of the cytoskeleton in polarity and morphogenesis of algal cells. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 38–42.
- [60] MESSERLI M, ROBINSON KR. Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsatile growth rates in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1269–1278.
- [61] MOGENSEN HL, HOLM PB. Dynamics of nuclear DNA quantities during zygote development in barley. *Plant Cell* 1995; **7**: 487–494.
- [62] MOGENSEN HL, LEDUC N, MATTHYS-ROCHON E, DUMAS C. Nuclear DNA amounts in the egg and zygote of maize (*Zea mays* L.). *Planta* 1995; **197**: 641–645.
- [63] MONTAG K, SALAMINI F, THOMPSON RD. ZENa, a member of a novel group of MADS box genes, is alternatively spliced in maize endosperm. *Nucl Acid Res* 1995; **23**: 2168–2177.
- [64] MORDHORST AP, TOONEN AAJ, DE VRIES SC. Plant embryogenesis. *Crit Rev Plant Sci* 1997; **16**: 535–576.
- [65] MUELLER M, BALCONI C, SALAMINI F, THOMPSON RD. Nitrogen and hormonal responsiveness of the 22 kDa alpha-zein and b-32 genes in maize endosperm is displayed in the absence of the transcriptional regulator Opaque-2. *Plant J* 1997; **12**: 281–291.
- [66] OHAD N, YADEGARI R, MARGOSSIAN L, HANNON M, MICHAELI D, HARADA JJ, GOLDBERG RB, FISHER RL. Mutation in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *The Plant Cell* 1999; **11**: 407–416.
- [67] OLSEN O-A. Endosperm developments. *The Plant Cell* 1998; **10**: 485–488.
- [68] PERRY SE, NICHOLS KW, FERNANDEZ DE. The MADS domain protein AGL15 localizes to the nucleus during early stages of seed development. *The Plant Cell* 1996; **8**: 1977–1989.
- [69] PIERSON ES, MILLER DD, CALLAHAM DA, VANAKEN J, HACKETT G, HEPLER PK. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Dev Biol* 1996; **174**: 160–173.
- [70] POPIELARSKA M, PRZYWARA L. Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (*Angiospermae*). I. Zapłodnienie *in vitro* z użyciem izolowanych gamet. *Post Biol Kom* 1999; **26**: xx–xx.
- [71] QUANTRANO RS, SHAW SL. Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Sci* 1997; **2**: 15–21.
- [72] RAY A. New paradigm in plant embryogenesis: maternal control comes in different flavours. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 325–327.
- [73] RICHERT J, KRANZ E, LÖRZ H, DRESSELHAUS T. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for gene expression studies at the single cell level. *Plant Sci* 1996; **114**: 93–96.
- [74] RUSSELL SD. Double fertilization. *Intern Rev Cytol* 1992; **140**: 357–387.
- [75] RUSSELL SD. Attraction and transport of male gametes for fertilization. *Sex Plant Reprod* 1996; **9**: 337–342.
- [76] SAUTER M, VON WIEGEN P, LÖRZ H, KRANZ E. Cell cycle regulatory genes from maize are differentially controlled during fertilization and first embryonic cell division. *Sex Plant Reprod* 1998; **11**: 41–48.
- [77] SAXE CL III. Forum: How does a zygote become an embryo? Signal that make you different: receptor-mediated signal transduction in early development. *Zygote* 1994; **2**: 170–183.
- [78] SCHMIDT ED, DE JONG AJ, DE VRIES SC. Signal molecules involved in plant embryogenesis. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1305–1313.
- [79] SCHNEITZ K. The molecular and genetic control of ovule development. *Curr Opin Plant Biology* 1999; **2**: 13–17.
- [80] SCHNEITZ K, BALASUBRAMANIAN S, SCHIEFTHALER U. Organogenesis in plants: the molecular and genetic control of ovule development. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 468–472.

- [81] SCHWEIZER L, YERK-DAVIS GL, PHILLIPS RL, SRIENC F, JONES RJ. Dynamics of maize endosperm development and DNA endoreduplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7070–7074.
- [82] SCOTT RJ, VINKENOOG R, SPIELMAN M, DICKINSON HG. Medea: murder or mistral? *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 460–461.
- [83] SHERIDAN WF, CLARK JK 1993. Mutational analysis of morphogenesis of the maize embryo. *Plant J* 1993; **5**: 605–610.
- [84] SUN MX, YANG HY, ZHOU C, KOOP HU. Single-pair fusion of various combinations between female gametoplasts and other protoplasts in *Nicotiana tabacum*. *Acta Bot Sin* 1995; **37**: 106.
- [85] SUN MX, MOSCATELLI A, YANGHY, CRESTI M. *In vitro* double fertilization in tobacco, compared with somatic protoplast fusion toward understanding gamete-specific characters. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 51.
- [86] SWANN K. Forum: How does a spermatozoon activate an oocyte? The soluble sperm oscilligen hypothesis. *Zygote* 1993; **1**: 273–276.
- [87] SWOPE RE, KROPFDL. Pronuclear positioning and migration during fertilization in *Pelvetia*. *Dev Biol* 1993; **157**: 269–276.
- [88] TIAN HQ, RUSSELL SD. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 1997; **202**: 93–105.
- [89] TICHTINSKY G, TAVARES R, TAKVORIAN A, SCHWEBEL-DUGUÉ N, TWELL D, KREIS M. An evolutionary conserved group of plant GSK-3/shaggy-like protein kinase genes preferentially expressed in developing pollen. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1442**: 261–273.
- [90] TIRLAPUR UK, KRANZE, CRESTI M. Characterization of isolated egg cells, *in vitro* fusion products and zygotes of *Zea mays* L. using the technique of image analysis and confocal laser scanning microscopy. *Zygote* 1995; **3**: 57–64.
- [91] TIRLAPUR UK, SCALI M, MOSCATELLI A, DEL CASINO C, CAIG, TIEZZI A, CRESTI M. Confocal image analysis of spatial variations in immunocytochemically identified calmodulin during pollen hydration, germination and pollen tube tip growth in *Nicotiana tabacum* L. *Zygote* 1994; **2**: 63–68.
- [92] TIRLAPUR UK, VAN WENT JL, CRESTI M. Visualisation of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs *in situ* and isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L. *Ann Bot* 1993; **71**: 161–167.
- [93] WILHELMI LK, PREUSS D. The mating game: pollination and fertilization in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 18–22.
- [94] WILLIAMS CM, ZHANG G, MICHALAK M, CASS DD. Calcium-induced protein phosphorylation and changes in levels of calmodulin and calreticulin in maize sperm cells. *Sex Plant Reprod* 1997; **10**: 83–88.
- [95] XU H, SWOBODA I, BHALLA PL, SINGH MB. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 2554–2558.
- [96] XU H, SWOBODA I, BHALLA PL, SINGH MB. Male gametic cell-specific expression of H2A and H3 histone genes. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 607–614.
- [97] YANG HY, ZHOU C. Experimental plant reproductive biology and reproductive cell manipulation in higher plants: now and the future. *Am J Bot* 1992; **79**: 354–363.
- [98] YLSTRA B, GARRIDO D, BUSSCHER T, VAN TUNEN AJ. Hexose transport in growing petunia pollen tubes and characterization of a pollen-specific putative monosaccharids transporter. *Plant Physiol* 1998; **118**: 297–304.
- [99] YONG TE, GALLIE DR. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Mol Biol* 1999; **39**: 915–926.
- [100] ZHANG G, LIU D, CASS DD. Calcium-induced sperm fusion in *Zea mays* L. *Sex Plant Reprod* 1997; **10**: 74–82.

- [101] ZHANG Z, TIAN HQ, RUSSEL SD. Immunocalization of myosin on the surface of isolated sperm cells of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and its relation to sperm cell transport. Abstracts XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction, Wageningen, August 16–21, 1998; s. 118.
- [102] ZHANG G, WILLIAMS CM, CAMPENOT MK, MCGANN LE, CUTLER AJ, CASS DD. Effects of calcium, magnesium, potassium, and boron on sperm cells isolated from pollen of *Zea mays* L. *Sex Plant Reprod* 1995; **8**: 113–122.
- [103] ZHAO J, ZHOU C, YANG HY. Distribution of membrane-bound calcium and activated calmodulin in isolated zygotes and young embryos of *Triticum aestivum*. *Acta Bot Sin* 1998; **40**: 28–32.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 30.04. 1999 r.

Przyjęto: 19.07. 1999 r.

Adres autora: ul. Grodzka 52, 31-044 Kraków

RECEPTOR LULIBERYNY (LHRH-R) – STRUKTURA I FUNKCJA

LULIBERIN RECEPTOR (LHRH-R) – STRUCTURE AND FUNCTION

Apolinary SZEWCZUK*, Ewa KUROWSKA*, Zbigniew SZEWCZUK**

*Laboratorium Biochemii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,

**Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego we Wrocławiu

Streszczenie: Luliberyna (hormon uwalniający lutropinę) jest decapeptydem syntetyzowanym w podwzgórz. W przysadce oraz w innych narządach i tkankach luliberyna wiąże się ze swoistym receptorem rozpoczynając kaskadę zdarzeń biochemicznych, wynikiem czego jest między innymi synteza lutropiny i folitropiny. W pracy przedstawiono budowę i fizjologiczną rolę receptora luliberyny. Opisano także mutanty tego receptora występujące w niektórych stanach chorobowych. Omówiono znaczenie analogów luliberyny w terapii.

(Postępy Biologii Komórki 1999; 26: 827–840)

Słowa kluczowe: luliberyna, hormon uwalniający lutropinę, receptor luliberyny, receptor gonadoliberyny, analogi luliberyny.

Summary: Luliberin (luteinizing hormone – releasing hormone) is a decapeptide synthesized in hypothalamus. In pituitary and in other organs and tissues luliberin binds to specific receptor starting a cascade of biochemical events resulting in synthesis of lutropin and follitropin. In this review structure and physiological role of luliberin receptor were presented. Mutants of this receptor found in some clinical conditions were described. Significance of LHRH analogs for therapy was also presented.

(Advances in Cell Biology 1999; 26: 827–840)

Key words: luliberin, luteinizing hormone – releasing hormone, luliberin receptor, gonadoliberin receptor, luliberin analogues.

Wykaz stosowanych skrótów: **LHRH** (lutropin hormone – releasing hormone) – luliberyna (hormon uwalniający lutropinę), **GnRH** (gonadotropin releasing hormone) – gonadoliberyna, **LHRH-R** – receptor luliberyny, **FSH** (follicle stimulating hormone) – folitropina, **LH** (lutropin hormone) – lutropina, **PCR** (polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy, **RT** (reverse transcriptase) – odwrotna transkryptaza. Skrót aminokwasów podano wg [49].

LULIBERYNA

Luliberyna, zwana także hormonem uwalniającym lutropinę (LHRH) lub gonadoliberyną (GnRH), została wydzielona z owczych i wieprzowych podwzgórz. W 1971 roku dwa zespoły badawcze, kierowane przez R. Guillemina i A. Schallego, zidentyfikowały sekwencję tego decapeptydu (tab. 1) [1]. Obecność LHRH wykazano także u innych ssaków [38].

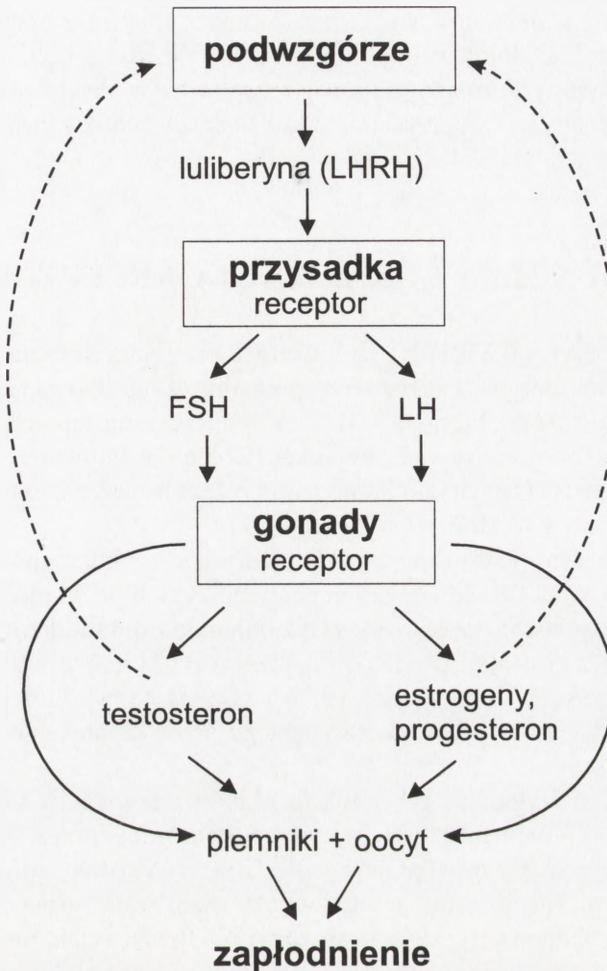
Uważa się, że LHRH jest syntetyzowany w formie preproLHRH będącego 92-aminokwasowym polipeptydem, który ulega następnie enzymatycznemu rozszczepieniu na: peptyd sygnałowy, czynnik hamujący uwalnianie prolaktyny i proLHRH. Z tego ostatniego po odszczepieniu tripeptydu i modyfikacji decapeptydu (cyklizacja Glu i amidacja Gly) powstaje luliberyna. Hormon ten może również ulec hydroksylacji tworząc [hydroksyproliło⁹]LHRH [25]. Niedawno odkryto ludzki gen kodujący decapeptyd (GnRH II) różniący się od wcześniej wydzielonej luliberyny (GnRH I) innych ssaków trzema resztami aminokwasowymi [67]. Decapeptydowe hormony stwierdzono także u kurcząt, łososia, zębaczka, śledzia, minoga, psa morskiego i osłonicy. W porównaniu z sekwencją LHRH ssaków mają one różne reszty aminokwasowe w pozycjach 5, 6, 7 lub 8. Ich sekwencje przedstawiono w tabeli 1.

LHRH jest uwalniany w sposób pulsacyjny (w odstępach 60–120 min), ponieważ ulega biodegradacji pod wpływem metaloproteaz [44] oraz mRNA kodujący preproLHRH jest szybko rozkładany (czas połowicznego rozkładu 5–3 min) [47]. Z podwzgórzca luliberyna przedostaje się do przedniego płata przysadki mózgowej,

TABELA 1. Sekwencje aminokwasowe GnRH różnych gatunków kręgowców wg [14, 48, 67] zmodyfikowano

| Źródło | Sekwencja |
|-----------------------------|---|
| Ssaki (GnRH-I) (GnRH-II) | pGlu ¹ -His ² -Trp ³ -Ser ⁴ -Tyr ⁵ -Gly ⁶ -Leu ⁷ -Arg ⁸ -Pro ⁹ -Gly ¹⁰ -NH ₂ pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Gly-Trp ⁷ -Tyr ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Kurczak I | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Gln ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Kurczak II | pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Gly-Trp ⁷ -Tyr ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Łosoś | pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Glu ⁶ -Trp ⁷ -Leu ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Zębacz | pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Gly-Leu-Asn ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Śledź II | pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Gly-Leu-Ser ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Minóg III | pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Asp ⁶ -Trp ⁷ -Lys ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| Pies morski III | pGlu-His-Trp-Ser-His ⁵ -Gly-Trp ⁷ -Leu ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| O słonica I | pGlu-His-Trp-Ser-Asp ⁵ -Tyr ⁶ -Phe ⁷ -Lys ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |
| O słonica II | pGlu-His-Trp-Ser-Leu ⁵ -Cys ⁶ -His ⁷ -Ala ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ pGlu-His-Trp-Ser-Leu ⁵ -Cys ⁶ -His ⁷ -Ala ⁸ -Pro-Gly-NH ₂ |

Wyróżnione aminokwasy wskazują miejsca występowania różnic w sekwencji w porównaniu z sekwencją GnRH-I ssaków. Cyfry rzymskie oznaczają numer GnRH pochodzącego z danego źródła.



RYSUNEK 1. Udział luliberyny i jej receptora w działaniu osi podwzgórze-przysadka-gonady

gdzie wiążąc się ze swoistym receptorem (LHRH-R) stymuluje uwalnianie lutropiny (LH) i folitropiny (FSH) (rys. 1). Oba te hormony są heterodimerycznymi glikoproteinami mającymi wspólną podjednostkę α i różne, lecz homologiczne podjednostki β . W jajnikach i jądrach lutropina i folitropina wiążą się z receptorami (LH-R i FSH-R) indukując syntezę progesteronu, testosteronu i estradiolu. Te steroidowe hormony płciowe umożliwiają zapłodnienie oocytu przez plemniki, a także, na zasadzie sprzężenia zwrotnego regulują wydzielanie luliberyny [5, 38]. Ludzka lutropina w prawie niezmienionej formie jest wydalana w moczu, a wyraźny wzrost stężenia tego hormonu (≥ 2 ng/ml) występuje przed owulacją [41]. Obecność izoform

LH i LH-R oraz ich mutantów stwierdzono między innymi u nieplodnych kobiet oraz u przedwcześnie dojrzewających dzieci [29, 60, 62].

Udział luliberyny i lutropiny oraz ich receptorów w działaniu osi: podwzgórze-przysadka-gonady (rys. 1) przedstawiono w licznych publikacjach przeglądowych [12, 28, 37, 61].

IZOLACJA I LOKALIZACJA RECEPTORA

Receptor luliberyny (LHRH-R) izolowano z przysadki szczura wykorzystując interakcję awidyna-biotyna. Do roztworu preparatu solubilizowanego detergentem dodano biotynylowanego agonistę – [D-Lys⁶]GnRH, a następnie przesączono go przez kolumnę z immobilizowaną awidyną. Kolumnę eluowano roztworem soli z dodatkiem agonisty. Otrzymano homogeny receptor oczyszczony 10–15 tysięcy razy, lecz zaledwie z 4–10% wydajnością [27].

Receptor luliberyny usiłowano wydzielić stosując również chromatografię powinowactwa. Po solubilizacji detergentem jonowym błon komórek z przysadki owczej, uzyskany roztwór przesączono przez kolumnę z immobilizowanym agonistą LHRH – [D-Lys⁶, Pro⁹-NH₂]LHRH. Po przemyciu kolumnę eluowano buforem o niskim pH uzyskując białko o m. cz. 67 kDa, które wiązało luliberynę, lecz różniło się sekwencją od receptora otrzymanego przez klonowanie genu LHRH-R [23].

Aby otrzymać poliklonalne przeciwciała skierowane przeciw GnRH-R, króliki immunizowano komplementarnym peptydem (kodowany przez komplementarny DNA) o sekwencji: Ser-Arg-Ala-Gln-Ser-Ile-Gly-Pro-Val-Leu, sprzężonym z nośnikiem białkowym. Stosując otrzymaną antyosurowicę wykryto receptor luliberyny w solubilizowanych błonach przysadki szczura [52]. Przeciwciała zastosowano także do immunohistochemicznej lokalizacji LHRH i jego receptora w cienkich skrawkach łożyska ludzkiego. Preparaty poddane uprzednio działaniu RT i PCR wykazywały silniejszą reakcję histochemiczną [68]. Obliczono, iż na jedną komórkę GH₃ z przysadki szczura przypada 32000 cząsteczek LHRH-R [46].

BUDOWA RECEPTORA LULIBERYNY

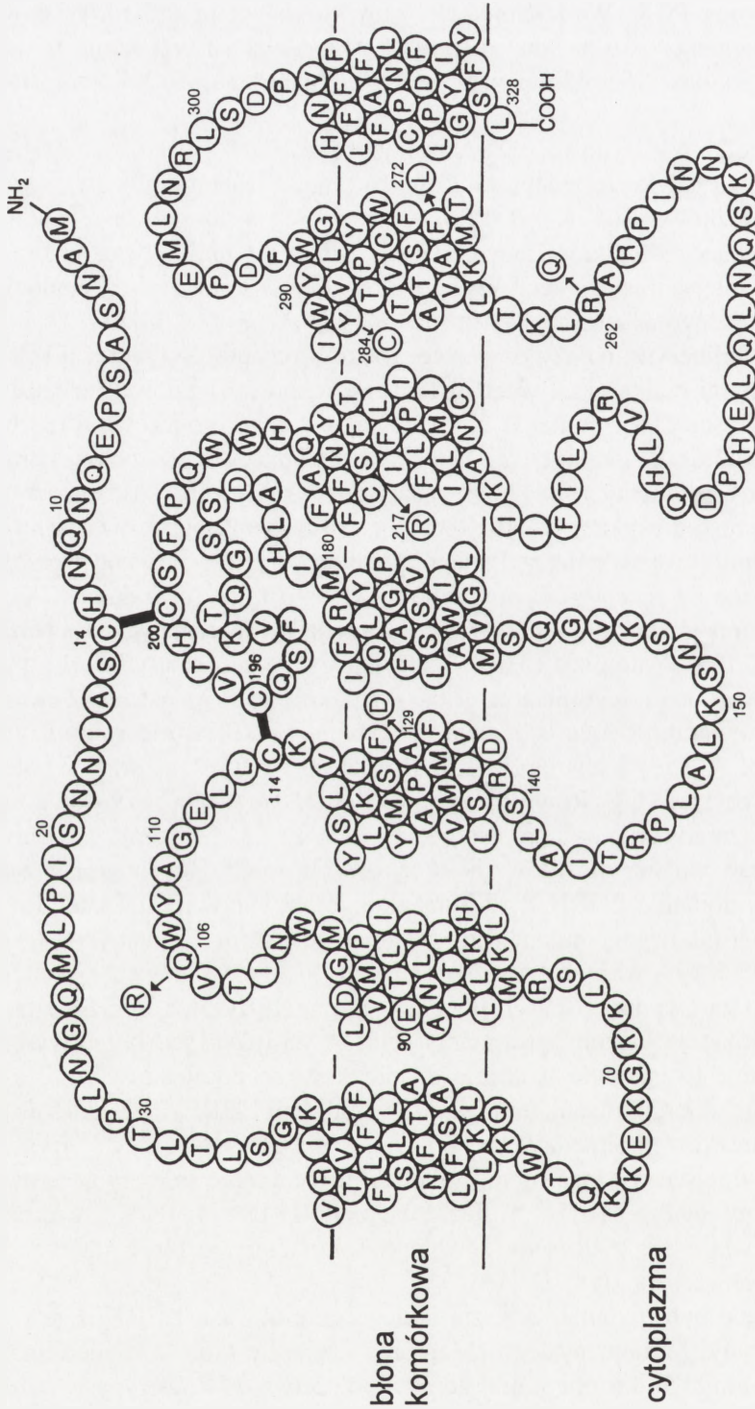
Sekwencję aminokwasową receptora luliberyny wyznaczano najczęściej z sekwencji nukleotydowej odpowiedniego mRNA lub cDNA z przysadki. Na matrycy RNA syntetyzowano DNA. cDNA dla receptora luliberyny identyfikowano stosując jako sondę fragment mRNA tego receptora o ustalonej sekwencji, a następnie po-

wielano metodą PCR. Wydzielony DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi, a powstałe fragmenty rozdzielano i identyfikowano elektroforetycznie w żelu agarowym lub polioakrylamidowym, po czym poddano analizie sekwencyjnej [7, 8, 34, 59].

Z sekwencji nukleotydowej cDNA kodującego LHRH-R wyznaczono sekwencję aminokwasową ludzkiego receptora. Zawiera on 328 reszt aminokwasowych i dwa mostki disiarczkowe [16, 34, 59]. W podobny sposób ustalono sekwencję owczego LHRH-R będącego białkiem zawierającym 328 reszt aminokwasów oraz 5 potencjalnych miejsc fosforylacji. Wykazuje on $\geq 85\%$ homologii z analogicznymi receptorami człowieka, myszy i szczura [8, 33].

Receptor luliberyny należy do licznej rodziny receptorów sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami G, ważnymi przekaźnikami sygnałów. Receptory te zawierają najczęściej trzy domeny: N-kończową zewnątrzkomórkową, przezbłonową złożoną z siedmiu α -helikalnych segmentów przechodzących przez błonę komórkową oraz C-kończową domenę cytoplazmatyczną. Białka G aktywują cyklazę adenylanową, fosfolipazy i fosfodiesterazy [2, 70]. Receptory luliberyny ssaków mają tylko domenę zewnątrzkomórkową z trzema pętlami polipeptydowymi oraz domenę przezbłonową. Różnią się one od receptorów innych kręgowców (np. ryb) brakiem C-końcowej domeny cytoplazmatycznej [16, 34]. Trzecia pętla cytoplazmatyczna związana jest z białkiem G [66]. Natomiast LHRH-R afrykańskiego zębacza (*Clarias gariepinus*) ma C-kończową domenę cytoplazmatyczną składającą się z 51 reszt aminokwasowych. Od receptorów ssaków różni się także sekwencją II i VII segmentu domeny przezbłonowej [6, 33, 59] i zawiera 4 glikozylowane reszty Asn oraz 3 potencjalne miejsca fosforylacji [63]. Również receptor LHRH kurczęcia ma C-końcowy fragment cytoplazmatyczny, którego usunięcie zwiększa jego wiązanie z agonistą [55]. Aby wykazać wpływ mostków disiarczkowych znajdujących się w zewnątrzkomórkowej domenie LHRH-R szczura na jego aktywność, cDNA tego receptora poddano ukierunkowanej mutageniezie zamieniając kolejno Cys na Ala w pozycjach: 14, 114, 195 i 199. Mutanty Cys14Ala i Cys199Ala wykazywały obniżone powinowactwo zarówno do LHRH, jak i do jego agonisty oraz obniżoną produkcję fosforanu inozytolu. Natomiast mutanty Cys114Ala i Cys195Ala nie wiązały agonisty. Sugeruje to istnienie wiązania disiarczkowego pomiędzy Cys¹¹⁴ a Cys¹⁹⁵ [13]. Stosując ukierunkowaną mutageniezę w ludzkim LHRH-R zlokalizowano dwa mostki disiarczkowe pomiędzy Cys¹⁴ i Cys²⁰⁰ oraz Cys¹¹⁴ i Cys¹⁹⁶ (rys. 2) [16]. Aby ustalić miejsce wiążące ligand w ludzkim receptorze luliberyny zastosowano fotoreaktywny analog LHRH: ¹²⁵I[azidobenzoilo-D-Lys⁶]LHRH. Stwierdzono, że analog ten wiąże się z domeną zewnątrzkomórkową receptora między 12 i 18 resztą aminokwasową (rys. 2) [16].

Interesujące było pytanie, z resztą jakiego aminokwasu LHRH-R jest wiązana Arg⁸ luliberyny. Mutant mysiego receptora, w którym Glu³⁰¹ zamieniono na Gln (Glu301Gln) miał 56-krotnie mniejsze powinowactwo do luliberyny w porównaniu



z receptorem typu „dzikiego” z równoczesnym ponad 10-krotnie zwiększonym powinowactwem do $[\text{Glu}^8]\text{LHRH}$. Wyniki te potwierdzają pogląd, iż $\text{Glu}^{301}\text{LHRH-R}$ oddziałuje elektrostatycznie z Arg^8LHRH [22]. Aby stwierdzić wpływ reszt różnych aminokwasów ligandu na wiązanie z receptorami z przysadki szczura, owcy i kury, zbadano wiązanie luliberyny ssaków, a także GnRH kurczęcia, łososia i minoga morskiego. W przypadku LHRH ssaków kluczowe znaczenie mają reszty aminokwasów występujące w pozycjach 5, 7 i 8 ligandu, a zastąpienie ich resztami innych aminokwasów zmienia wiązanie z receptorami [48]. Aminokwasy występujące w pozycjach 1–4 i 9–10 znajdują się we wszystkich hormonach GnRH kręgowców (tab. 1) [14]. Zastąpienie w receptorze ludzkim Lys^{121} przez Gln^{121} spowodowało, iż powinowactwo do GnRH zostało zredukowane o trzy rzędy wielkości, a wartość EC_{50} (stężenie ligandu wywołujące połowę maksymalnej odpowiedzi) z $2,4 \pm 0,2$ nM wzrosła do 282 ± 52 nM. Natomiast w przypadku zamiany Lys^{121} na Arg^{121} zwiększenie EC_{50} było nieznaczne [69].

Istotną rolę w wiązaniu LHRH i jego agonistów z receptorem ludzkim odgrywa Asn^{102} zlokalizowana w drugiej pętli domeny przezbłonowej. Zamiana tej reszty na Ala^{102} powoduje 95–750-krotne zmniejszenie stymulacji produkcji fosforanu inozytoli przez LHRH. W przypadku zastosowania analogu z C-końcowym etyloamidem zmniejszenie to było tylko 2,4–11-krotne. Sugeruje to, iż pętla II w LHRH-R tworzy kieszeń dla C-końca luliberyny [15]. Aby wykazać, która część LHRH wiąże się z receptorem otrzymano dwa syntetyczne analogi luliberyny związane kowalencyjnie z biotyną poprzez Gln^1 lub D-Lys^6 . Pierwszy z tych analogów jest wiązany przez LHRH-R i działa jako antagonist, lecz jego kompleks ze streptawidyną nie jest wiązany przez receptor. Wiązanie drugiego z nich $[\text{D-Lys}^6]\text{LHRH}$ stymuluje działania fosfolipazy i produkcję inozytoli. Na podstawie uzyskanych wyników można zakładać, iż luliberyna wiąże się z receptorem swoim N-końcem oraz przypuszczalnie także z C-końcem [9]. Wykazano, że estradiol zwiększa ekspresję genu LHRH-R owcy, zaś progesteron nie wykazuje tego działania [65]. U niektórych kręgowców, jak np.: kura (*Gallus domesticus*), przegowana ryba akwaryjna (*Brachydonio verio*), karaś złoty (*Carassius auratus*), jaszczurka (*Agama atra*), afrykańska żaba szponiasta (*Xenopus leavis*), stwierdzono DNA kodujący 2–3 formy receptora LHRH, różniące się resztami aminokwasów w trzeciej pętli domeny pozakomórkowej [64].

FUNKCJA RECEPTORA LULIBERYNY

Ekspresję informacyjnego RNA receptora LHRH szczura stwierdzono w przysadce, jądrach i jajnikach. Receptor ten zawiera 327 reszt aminokwasowych o ustalonej sekwencji [35]. Dużym zaskoczeniem było wykrycie mRNA w mózgu szczura

[32]. Zdaniem autorów obecność receptora w ośrodkowym układzie nerwowym może stanowić czynnik wspomagający rozród.

Wiązanie LHRH z receptorem inicjuje szereg zdarzeń polegających na aktywacji białkowej kinazy C i fosfolipaz (A, C i D). W wyniku działania hormonu uwalniane są między innymi: fosforan inozytoli, diacyloglicerol i kwas arachidonowy [56, 57]. Ten ostatni stymuluje ekspresję genu kodującego podjednostkę α gonadotropiny [4, 51]. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z zastosowaniem linii komórkowej GGH₃ sugerują, iż LHRH i cAMP aktywują transkrypcję genu LHRH-R [45]. Aktywujący wpływ luliberyny na transkrypcję genu tego receptora został również potwierdzony w badaniach na linii komórkowej α T3-1 myszy [53].

ZNACZENIE RECEPTORÓW LULIBERYNY W PATOLOGII

Obecność receptorów LHRH wykazano w ludzkich nowotworach jajników, gruczołu krokowego, piersi i śluzówki macicy [20, 42]. Stosując metodę RT-PCR, swoiste primery i analizę metodą Southerna (Southern blot), w liniach komórkowych nowotworów stwierdzono ekspresję tych receptorów. W ten sposób wykazano wiązanie ¹²⁵I[D-Trp⁶]LHRH do receptora luliberyny w liniach komórkowych następujących nowotworów: gruczołu krokowego DU-145, LNCaP, jajników OV-1063, piersi MCF-7, MDA-MB-231, śluzówki macicy HEC-1-A i nabłonika kosmówkowego JAR [42]. Wykazano, iż agonista GnRH – *Leuprolide* w stężeniu 10 nmol/ml zmniejsza o 90% proliferację komórek nowotworowych macicy [31]. Nie stwierdzono jednak obecności mRNA receptora w nowotworach szyjki macicy [30]. Linia komórkowa HepG2 ludzkiego raka wątroby posiada także LHRH-R wiążący luliberynę, agonistę [D-Lys⁶]GnRH oraz peptydy GnRH ryb (łososia, minoga i zębacza). Peptydy te hamują proliferację komórek HepG2 mierzoną wcielaniem [³H]-tymidyny, z czego autorzy wnioskowali, iż analogi te można będzie stosować w terapii raka wątroby [54]. Wzrost komórek nowotworów gruczołu krokowego i piersi, posiadających receptory luliberyny, jest hamowany przez koniugaty LHRH z bydlęcą RNA-zą. Wolne składniki tych koniugatów (luliberyna i RNA-za) nie mają wpływu na proliferację tych komórek. Jednak koniugaty te nie działają cytotoksycznie na komórki nowotworów nie mających LHRH-R [26]. Cytotoksyczne działanie na komórki ludzkiego nowotworu gruczołu krokowego stwierdzono stosując koniugat agonisty [D-Lys⁶]LHRH z doksorubicyną (AN-201) [39]. Wyniki doświadczeń wykonanych na ludzkiej, embrionalnej linii komórkowej EcRG273, wykazującej ekspresję receptora luliberyny o zwiększonym powinowactwie do LHRH, świadczą, iż agonista i antagonist (Tryptorelin i Antide) hamują wzrost i proliferację tych nowotworowych komórek [36].

MUTANTY LUDZKIEGO RECEPTORA LULIBERYNY

Zmutowany ludzki LHRH-R, różni się od receptora typu dzikiego zamianą Phe²⁷² na Leu (Phe272Leu), w VI segmencie domeny przezbłonowej. Tak zmutowany receptor wiązał się z agonistą i antagonistą luliberyny z tym samym powinowactwem jak „dziki” LHRH-R, lecz jego ilość na powierzchniach komórek wyraźnie wzrosła [50].

U rodziny cierpiącej na zespół Kallmanna, charakteryzujący się wtórnym hipogonadyzmem połączonym z brakiem węchu, wykryto cDNA dwóch genetycznych mutantów LHRH-R. U matki ujawniono mutację Gln106Arg, spowodowaną zmianą kodonu CAA na CGA w mRNA, natomiast u ojca i córki mutację Arg262Gln. Pierwszy z wymienionych mutantów bardzo słabo wiązał zarówno LHRH, jak i agonistę ([¹²⁵I-Tyr⁵-D-Ala⁶, Pro⁹-NH₂] LHRH), natomiast oba w połączeniu z luliberyną słabiej aktywowały fosfolipazę C w porównaniu z receptorem typu „dzikiego”. Każdego z trzech pacjentów należy zaliczyć do heterozygot, ponieważ znaleziono u nich także DNA receptora typu „dzikiego” [17]. U rodziny z hipogonadyzmem oprócz mutantu Arg262Gln stwierdzono także mutant Tyr284Cys receptora luliberyny. Tak zmutowany receptor różnił się od typu „dzikiego” znacznym zmniejszeniem zdolności wiązania antagonisty (z 240 fmol/mg do 50 fmol/mg) [43]. Oprócz opisanych już przypadków u chorych z hipogonadyzmem wykryto także mutant Ser217Arg [18]. W przypadku rodzeństwa z zahamowaniem dojrzewania płciowego stwierdzono w receptorze zamianę Ala¹²⁹ na Asp (Ala129Asp) [10]. Do badania powinowactwa zmutowanych receptorów zaproponowano użycie [¹²⁵I[D-Tyr⁶]LHRH [24]. Zmutowany mRNA receptora luliberyny wykryto także w niektórych gruczolakach ludzkiej przysadki. Ten informacyjny RNA zamiast cytozyny w pozycji 453, która w tryplecie koduje Ser¹⁵¹, zawiera tyminę [40].

ZASTOSOWANIE ANALOGÓW LULIBERYNY JAKO INHIBITORÓW LHRH-R W TERAPII

To, iż LHRH jest decapeptydem ułatwiło otrzymanie kilku tysięcy syntetycznych analogów tego hormonu, w których aminokwasy konfiguracji L zastąpiono naturalnymi lub syntetycznymi D-aminokwasami. Zmieniając Gly⁶ i Gly¹⁰ w cząsteczce luliberyny otrzymano wiele związków będących agonistami LHRH, natomiast zamiana reszt głównie w pozycjach 1–3 dostarczyła licznych antagonistów hormonu. Pierwsze z nich łączą się z receptorem w sposób podobny do luliberyny i dopiero po dłuższym podawaniu wywołują efekt hamujący, antagoniści działają natychmiast jako inhibitory receptora. Do agonistów należy zaliczyć: *Buserelin* (*Superfact*), *De-*

stlorelin, Fertirelin, Goserelin (Zoladex), Histerelin, Meterelin, Leuprorelin (Leuprolid), Nafarelin (Synarel), Tryptorelin (Decapeptyl). Natomiast do znanych związków będących antagonistami LHRH zalicza się: *Acyline, Antide (Nal-Lys), Azaline, Cetrorelix (SB75), Detirelix, Ganirelix, Nal-Glu, Ramorelix* i inne. Zastosowano je w leczeniu niektórych nowotworów: gruczołu krokowego, piersi, nabłonka jajnika, macicy oraz w leczeniu przedwczesnego dojrzewania i w antykoncepcji, jak również w weterynarii i hodowli zwierząt [19, 21, 58]. Zarówno luliberyna, jak i jej agoniści ulegają szybkiej biodegradacji w przewodzie pokarmowym i dlatego peptydy te podaje się pacjentom zazwyczaj dożylnie, domięśniowo lub rzadziej donosowo [21]. Lepszym rozwiązaniem jest zamknięcie agonisty w mikrogranulkach kopolimerów, z których peptydy podane domięśniowo są wolno uwalniane [21, 58]. Bardziej odporne na biodegradację są związki będące antagonistami, lecz również należy je podawać pozajelitowo [3]. Ostatnio grupa japońska otrzymała niepeptydowy inhibitor receptora luliberyny: T-98475, będący pochodną oksotienopirydyny połączoną z trzema pierścieniami fenylowymi. Połowiczne hamowanie ludzkiego receptora luliberyny przez tę substancję ($IC_{50}=0,2$ nM) jest bardzo zbliżone do hamowania agonisty *Leuprorelin* ($IC_{50}=0,3$ nM) i 50-krotnie wyższe niż LHRH ($IC_{50}=10$ nM), a co najważniejsze T-98475 nie ulega biodegradacji i można go podawać doustnie [11].

PODSUMOWANIE

Receptory luliberyny wykryto w liniach komórkowych nowotworów jajników, macicy, piersi i gruczołu krokowego. Proliferacja tych komórek może być zahamowana przez niektóre analogi luliberyny, które znalazły już zastosowanie w ginekologii i terapii nowotworowej. Z uwagi na aplikacyjny charakter badań nad receptorami LHRH należy oczekiwać, iż w przyszłości będą one kontynuowane w wielu laboratoriach, stanowiąc wyzwanie dla badaczy wielu specjalności. Szczególnie interesujące będą, rozpoczęte stosunkowo niedawno, badania nad mutantami receptora luliberyny oraz ich związkiem ze stanami patologicznymi.

LITERATURA

- [1] BAILEY PD. The structure of LH-RH. An introduction to peptide chemistry. UJ. Wiley and Sons, Chichester, New York, 1990; 152–166.
- [2] BARAŃSKA J. Współzależność między szlakami przekazywania sygnałów w komórce – rola białek G w tych procesach. *Post Hig Med Dośw* 1999; **53**: 133–146.
- [3] BEHRE HM, KLIESCH S, PUHSE G, REISSMANN T, NIESHLAG E. High loading and low maintenance doses of a gonadotropin-releasing hormone antagonist effectively suppress serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 1403–1408.

- [4] BEN-MENACHEM D, SHVAGA-LEVINE Z, LIMAR R, NAOR Z. Arachidonic acid and lipoxygenase products stimulate gonadotropin α -subunit mRNA levels in pituitary α T3-1 cell line: role in gonadotropin releasing hormone action. *Biochemistry* 1994; **33**: 12795–12799.
- [5] BILIŃSKA B. Regulacja procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga ssaków. Rola białka StAR. *Post Biol Kom* 1997; **24**: 183–202.
- [6] BLOMENRÖHR M, BOGERD J, LEURS R, SCHULZ RW, TENSEN CP, ZANDBERGEN MA, GOOS HJ. Differences in structure-function relations between nonmammalian and mammalian gonadotropin-releasing hormone receptors. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; **238**: 517–522.
- [7] BOTTÉ MC, CHAMAGNE AM, CARRÉ MC, COUNIS R, KOTTLER ML. Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* 1998; **159**: 179–189.
- [8] BROOKS J, TAYLOR PL, SAUNDERS PTK, EIDNE KA, STRUTHERS WJ, MCNEILLY AS. Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during the estrous cycle. *Mol Cell Endocrinol* 1993; **94**: R23–R27.
- [9] BYRNE B, KLAHN S, TAYLOR PL, EIDNE KA. Functional analysis of GnRH receptor ligand binding using biotinylated GnRH derivatives. *Mol Cell Endocrinol* 1998; **144**: 11–19.
- [10] CARON P, CHAUVIN S, CHRISTIN-MAITRE S, BENNET A, LAHLOU N, COUNIS R, BOUCHARD P, KOTTLER ML. Resistance of hypogonadic patients with mutated GnRH receptor genes to pulsatile GnRH administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 990–996.
- [11] CHO N, HARADA M, IMAEDA T, IMADA T, MATSUMOTO H, HAYASE Y, SASAKI S, FURUYA S, SUZUKI N, OKUBO S, OGI K, ENDO S, ONDA H, FUJINO M. Discovery of a novel, potent, and orally active nonpeptide antagonist of the human luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor. *J Med Chem* 1998; **41**: 4190–4195.
- [12] CONN PM, CROWLEY WF (Jr). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 1994; **45**: 391–405.
- [13] COOK JVF, EIDNE KA. An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology* 1997; **138**: 2800–2806.
- [14] CRAIG AG, FISCHER WH, PARK M, RIVIER JE, MUSSELMAN BD, POWELL JFF, RESKA-SKINNER SM, PRAKASH MO, MACKIE GO, SHERWOOD NM. Sequence of two gonadotropin releasing hormones from tunicate suggest an important role of conformation in receptor activation. *FEBS Lett* 1997; **413**: 215–225.
- [15] DAVIDSON JS, MCARDLE CA, DAVIES P, ELARIO R, FLANAGAN CA, MILLAR RP. Asn¹⁰² of the gonadotropin-releasing hormone receptor is a critical determinant of potency for agonists containing C-terminal glycineamide. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15510–15514.
- [16] DAVIDSON JS, ASSEFA D, PAWSON A, DAVIES P, HAPGOOD J, BECKER I, FLANAGAN C, ROESKE R, MILLAR R. Irreversible activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor by photoaffinity cross-linking: localization of attachment site to Cys residue in N-terminal segment. *Biochemistry* 1997; **36**: 12881–12889.
- [17] DE ROUX N, YOUNG J, MISRAHI M, GENET R, CHANSON P, SCHAISON G, MILGROM E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *New Engl J Med* 1997; **337**: 1597–1602.
- [18] DE ROUX N, YOUNG J, BRAILLY-TABARD S, MISRAHI M, MILGROM E, SCHRAISON G. The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**: 567–572.
- [19] EMONS G, SCHALLY A. The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum Reprod* 1994; **9**: 1364–1379.
- [20] EMONS G, MÜLLER V, ORTMANN O, SCHULZ KD. Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1998; **65**: 199–206.

- [21] FILICORIM M. Gonadotrophin-releasing hormone agonists. A guide to use and selection. *Drugs* 1994; **48**: 41–58.
- [22] FLANAGAN CA, BECKER II, DAVIDSON JS, WAKEFIELD IK, ZHOU W, SEALFON SC, MILLAR RP. Glutamate 301 of the mouse gonadotropin-releasing hormone receptors confers specificity for arginine-8 of mammalian gonadotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22636–22641.
- [23] FLANAGAN CA, TETAZ T, SMITH AT, MILLAR RP. Development of methods for purification of membrane associated gonadotropin-releasing hormone binding proteins. *Biomed Chromatogr* 1996; **10**: 83–88.
- [24] FLANAGAN CA, FROMME BJ, DAVIDSON JS, MILLAR RP. A high affinity gonadotropin-releasing hormone (GnRH) tracer, radioiodinated at position 6, facilitates analysis of mutant GnRH receptors. *Endocrinology* 1998; **139**: 4115–4119.
- [25] GAUTRON JP, POULIN B, KORDON C, DROUVA SV. Characterization of [hydroxyproline⁹] luteinizing hormone-releasing hormone and its smallest precursor forms in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone — secreting neurons (GT1-7), and evaluation of their mode of action on pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995; **110**: 161–173.
- [26] GHO YS, CHAE CB. Luteinizing hormone releasing hormone-RNase A conjugates specifically inhibit the proliferation of LHRH-receptor-positive human prostate and breast tumor cells. *Mol Cells* 1999; **9**: 31–36.
- [27] HAZUM E. Purification of gonadotropin releasing hormone receptors using the avidin-biotin technique. *J Chromatogr* 1990; **510**: 233–238.
- [28] HERBISON AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin--releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 1998; **19**: 302–330.
- [29] HUHTANIEMI I, PETTERSSON K. Mutations and polymorphisms in the gonadotrophin genes; clinical relevance. *Clinl Endocrinol* 1998; **48**: 675–682.
- [30] IMAI A, HORIBE S, TAKAGI A, OHNO T, TAMAYA T. Frequent expression of Fas in gonadotropin-releasing hormone receptor-bearing tumors. *Eur J Obstet Gynecol* 1997; **74**: 73–78.
- [31] IMAI A, TAKAGI A, HORIBE S, TAKAGI H, TAMAYA T. Fas and Fas ligand system may mediate antiproliferative activity of gonadotropin-releasing hormone receptor in endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 1998; **13**: 97–100.
- [32] JENNES L, EYIGOR O, JANOVICK JA, CONN PM. Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Prog Horm Res* 1997; **52**: 475–491.
- [33] KAISER UB, CONN PM, CHIN WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. *Endocr Rev* 1997; **18**: 46–70.
- [34] KAKAR SS, MUSGROVE LC, DEVOR DC, SELLERS JC, NEILL JD. Cloning, sequencing and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 289–295.
- [35] KAKAR SS, GRANTHAM K, MUSGROVE LC, DEVOR D, SELLERS JC, NEILL JD. Rat gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: tissue expression and hormonal regulation of tissue expression and hormonal regulation of its mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 1994; **101**: 151–157.
- [36] KAKAR SS. Inhibition of growth and proliferation of EcRG293 cell line expressing high-affinity gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor under the control of an inducible promoter by GnRH agonist (D-Lys⁶)GnRH and antagonist (Antide). *Cancer Res* 1998; **58**: 4558–4560.
- [37] KOCHMAN K, GAJEWSKA A. Biosynthesis of gonadotropins in vivo. *Acta Neurobiol Exp* 1996; **56**: 753–756.
- [38] KÖNIG W. Gonadoliberin, thyroliberin, gonadotropins, thyrotropin. [w] Peptide and Protein Hormones [red.] König W. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim-New York-Basel-Cambridge, 1993; 11–36.

- [39] KOPPAN M, NAGY A, SCHALLY AV, PLONOWSKI A, HALMOS G, ARENCIBIA JM, GROOT K. Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits the growth of PC-82 human prostate cancer in nude mice. *Prostate* 1999; **38**: 151–158.
- [40] KOTTLER ML, SERET-BEGUE D, LAHLOU N, ASSAYAG M, CARRE MC, LAGARDE JP, AJZENBERG CH, CHRISTIN-MAITRE S, BOUCHARD P, MIKOL J, COUNIS R, WARNET A. The GnRH receptor gene is preferentially expressed in functioning gonadotroph adenomas and displays a Mae III polymorphism site. *Clin Endocrinol* 1998; **49**: 115–123.
- [41] KUROWSKA E, KOCHANOWSKA IE, BORATYŃSKI J, SZEWCZUK A. Investigations on human lutropin from pituitary gland and urine. *Arch Immunol Ther Exp* 1997; **45**: 329–334.
- [42] LAMHARZI N, HALMOS G, ARMATIS P, SCHALLY AV. Expression of mRNA for luteinizing hormone-releasing hormone receptors and epidermal growth factor receptors in human cancer cell lines. *Int J Oncol* 1998; **12**: 671–675.
- [43] LAYMAN LC, COHEN DP, JIN M, XIE J, LI Z, REINDOLLAR RH, BOLBOLAN S, BICK DP, SHERINS RR, DUCK LW, MUSGROVE LC, SELLERS JC, NEILL JD. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* 1998; **18**: 14–15.
- [44] LEW RA, COWLEY M, CLARKE IJ, SMITH AI. Peptidases that degrade gonadotropin-releasing hormone: influence on LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol* 1997; **9**: 707–712.
- [45] LIN X, CONN PM. Transcriptional activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene by GnRH and cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology* 1998; **139**: 3896–3902.
- [46] LIN X, JANOVICK JA, CONN PM. Mutations at the consensus phosphorylation sites in the third intracellular loop of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor: effects on receptor ligand binding and signal transduction. *Biol Reprod* 1998; **59**: 1470–1476.
- [47] MAURER JA, WRAY S. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons maintained in hypothalamic slice explant cultures exhibit a rapid LHRH mRNA turnover rate. *J Neurosci* 1997; **17**: 9481–9491.
- [48] MILLAR RP, FLANAGAN CA, MILTON RC, KING JA. Chimeric analogues of vertebrate gonadotropin-releasing hormones comprising substitutions of the variant amino acids in position 5, 7 and 8. Characterisation of requirements for receptor binding and gonadotropin release in mammalian and avian pituitary gonadotropes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 21007–21013.
- [49] MORAWIECKI A. Polskie Słownictwo Biochemiczne. PWN Warszawa 1974; 29–32.
- [50] MYBURGH DB, PAWSON AJ, DAVIDSON JS, FLANAGAN CA, MILLAR RP, HAPGOOD JP. A single amino acid substitution in transmembrane helix VI results in overexpression of the human GnRH receptor. *Eur J Endocrinol* 1998; **139**: 438–447.
- [51] NAOR Z, HARRIS D, SHACHAM S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca^{2+} protein kinase C. *Front Neuroendocrinol* 1998; **19**: 1–19.
- [52] NERI C, BAN E, TARAGNAT C, CALDONI M, HAOUR F, CALAS B, MARTIN PM. GnRH complementary peptide antibodies: outcome in GnRH receptor immunoanalysis. *Pept Res* 1991; **4**: 26–31.
- [53] NORWITZ ER, CARDONA GR, JEONG KH, CHIN WW. Identification and characterization of the gonadotropin-releasing hormone response elements in the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 1999; **274**: 867–880.
- [54] PATI D, HABIBI HR. Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology* 1995; **136**: 75–84.
- [55] PAWSON AJ, KATZ A, SUN YM, LOPES J, ILLING N, MILLAR RP, DAVIDSON JS. Contrasting internalization kinetics of human and chicken gonadotropin-releasing hormone receptors mediated by C-terminal tail. *J Endocrinol* 1998; **156**: R9–12.
- [56] POULIN B, RICH N, MITEV Y, GAUTRON JP, KORDON C, ENJALBERT A, DROUVA SV. Differential involvement of calcium channels and protein kinase-C activity in GnRH-indu-

- ced phospholipase-C, -A₂ and -D activation in a gonadotrope cell line (T3-1). *Mol Cell Endocrinol* 1996; **122**: 33–50.
- [57] SAUNDERS BD, SABBAGH E, CHIN WW, KAISER UB. Differential use of signal transduction pathways in the gonadotropin-releasing hormone mediated regulation of gonadotropin subunit gene expression. *Endocrinology* 1998; **139**: 1835–1843.
- [58] SCHALLY AV, COMARU-SCHALLY AM. Rational use of agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in the treatment of hormone-sensitive neoplasms and gynaecologic conditions. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; **28**: 157–169.
- [59] SEALFON SC, WEINSTEIN H, MILLAR RP. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 1997; **18**: 180–205.
- [60] SOBKOWIAK A, WIERZBICKI A, TRZECIAK WH. Budowa i funkcja receptora lutropiny (LH/hCG). *Post Biol Kom* 1997; **24**: 67–82.
- [61] SZEWCZUK A, KOCHANOWSKA IE, KUROWSKA E. Ludzki hormon luteinizujący (hLH). *Post Hig Med Dośw* 1994; **48**: 491–504.
- [62] SZEWCZUK A, KOCHANOWSKA IE, KUROWSKA E. Izoforny hormonu luteinizującego. *Post Hig Med Dośw* 1996; **50**: 9–20.
- [63] TENSEN C, OKUZAWA K, BLOMENROHR M, REBERS F, LEURS R, BOGERD J, SCHULZ R, GOOS H. Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur J Biochem* 1997; **243**: 134–140.
- [64] TROSKIE B, ILLING N, RUMBALE E, SUN YM, HAPYOD J, SEALFON S, CONELIN D, MILLER R. Identification of three putative GnRH receptors subtypes in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 1998; **112**: 296–302.
- [65] TURZILLO AM, CLAPPER JA, MOSS GM, NETT TM. Regulation of ovine GnRH receptor gene expression by progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil* 1998; **113**: 251–256.
- [66] ULLOA-AGUIRRE A, STANISLAUS D, ARORA V, VAANANEN J., BROTHERS S, JANOVICK A, CONN M. The third intracellular loop of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor couples the receptor to G_s- and G_{q/11}-mediated signal transduction pathways: evidence from loop fragment transfection in GGH₃ cells. *Endocrinology* 1998; **139**: 2472–2478.
- [67] WHITE RB, EISEN JA, KASTEN TL, FERNALD RD. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 305–309.
- [68] WOLFAHRT S, KLEINE B, ROSSMANITH WG. Detection of gonadotrophin releasing hormone and its receptor mRNA in human placental trophoblasts using in-situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod* 1998; **10**: 999–1006.
- [69] ZHOU W, RODIC V, KITANOVIC S, FLANAGAN CA, CHI L., WEINSTEIN H, MAAYANI S, MILLAR RP, SEALFON SC. A locus of the gonadotropin-releasing hormone receptor that differentiates agonist and antagonist binding sites. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18853–18857.
- [70] ŻYLIŃSKA L, RĘBAS E, LACHOWICZ A, LACHOWICZ L. Białka G – najważniejsze sygnalizatory komórkowe? *Post Biochem* 1998; **44**: 158–163.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.06. 1999 r.

Przyjęto: 21.07. 1999 r.

Adres autora: ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław

ROLA HETERODIMERU CD79 α /CD79 β I KOMPLEKSU CD19/CD21/CD81 W ROZWOJU I CZYNNOŚCI RECEPTORA DLA ANTYGENU NA KOMÓRCZE B

THE ROLE OF THE CD79 α /CD79 β HETERODIMER
AND OF THE CD19/CD21/CD81 COMPLEX
IN THE DEVELOPMENT AND BIOLOGIC FUNCTION
OF B CELL ANTIGEN RECEPTOR

Zofia Monika Rupniewska¹, Magdalena Dmoszyńska²

¹Katedra i Klinika Hematologii Akademii Medycznej w Lublinie;

²Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Streszczenie: Kompleks receptora komórki B jest multimerycznym związkiem złożonym z błonowej immunoglobuliny (bł Ig) połączonej niekowalencyjnie w błonie komórkowej z heterodimerem CD79 α /CD79 β . Jak wykazano heterodimer ten jest istotny dla ekspresji na powierzchni komórki bł Ig. Cytoplazmatyczny koniec CD79 α /CD79 β pełni czynności sygnalizacyjne. CD19 jest białkiem błony komórkowej występującym wyłącznie na komórkach B. Częsteczką tą jest członkiem nadrodziny immunoglobulin związanej z receptorem antygeny komórki B. Związanie CD19 z bł IgM około 100-krotnie zmniejsza liczbę cząsteczek IgM, których zwiążanie jest konieczne dla wywołania syntezy DNA. CD19 stanowi rdzeń wielocząsteczkowego kompleksu transdukcji sygnałów na powierzchni komórki B. Kompleks ten zawiera cztery znane białka, takie jak: CD19, CD21 (receptor dopełniacza typu 2), CD81 (białko z rodziny „tetraspan”) i Leu-13, jak również jeszcze inne niesprecyzowane białka. Związek między CD19 a CD21 umożliwia powstanie połączenia między kompleksem CD19 a kompleksem receptora komórki B za pośrednictwem kompleksów antygeny i fragmentów C3. Nie jest wykluczone, że następstwa tej reakcji odgrywają istotną rolę w powstawaniu naturalnej i nabytej odporności podczas rozwoju komórki B i w odpowiedzi immunologicznej.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 841–861)

Słowa kluczowe: receptor antygeny komórki B, cząsteczki CD79 α i CD79 β , kompleks CD19/CD21/CD81, immunoglobuliny powierzchniowe komórek B, transdukcja sygnałów.

Summary: The B-cell receptor complex (BCR) is a multimeric complex which consists of a membrane immunoglobulin (mIg) molecule and the non-covalently associated CD79 α /CD79 β heterodimer. It has been shown that this heterodimer is both essential and sufficient for the surface expression of mIg. Cytoplasmic tails of CD79 α and CD79 β have a signaling capacity. CD19 is a B cell-restricted membrane protein of the immunoglobulin superfamily that associates with the BCR. Coligating globulin CD19 to mIgM reduces by 100-fold the threshold number of mIgM molecules that must be ligated to induce synthesis of DNA. CD19 is a core member of a multimolecular cell surface signal-transduction complex, with contains four identified proteins including CD19, CD21 (complement receptor type 2), CD81 (tetraspan family of membrane proteins), and Leu-13 as well as other unidentified proteins. The association between CD19 and CD21 provides mechanism for binding the CD19 complex with the BCR through complexes Ag and C3 fragments. This is likely to have important consequences for the development of natural and acquired immunity during B cell development and immune responses. (*Advances in Cell Biology 1999; 26: 841–861*)

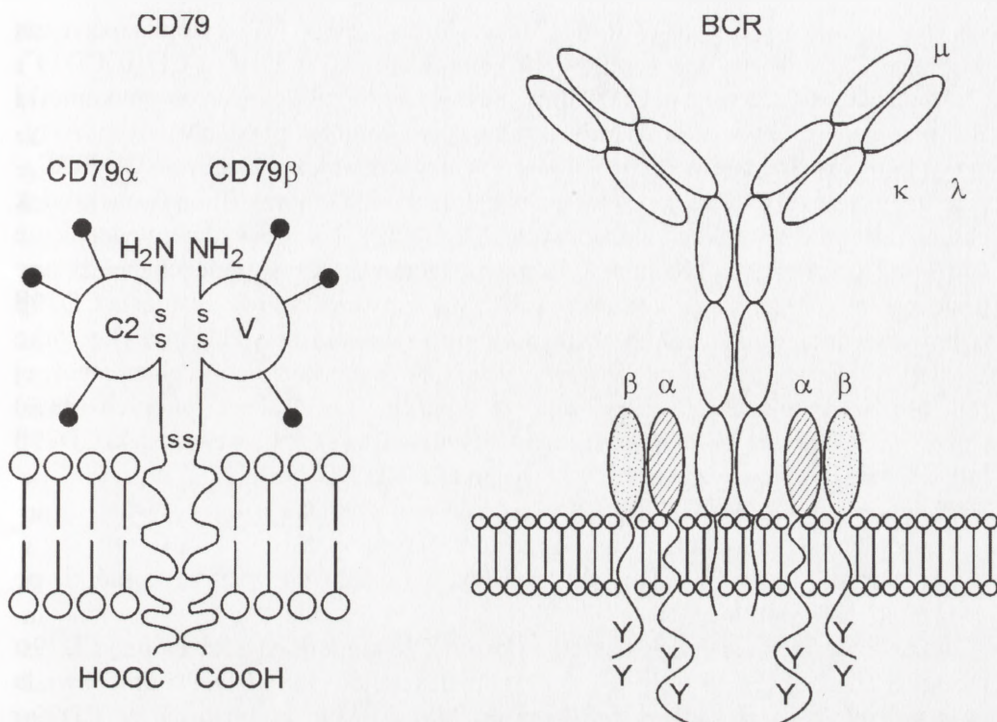
Key words: B-cell receptor, CD79 α and CD79 β molecules, CD19/CD21/CD81 complex, membrane immunoglobulins, signal transduction.

I. WSTĘP

Konwencjonalne limfocyty B powstają i różnicują się w wyspecjalizowanym środowisku, które w życiu płodowym u ssaków znajduje się w wątrobie, a u osobników dorosłych – w szpiku. Linia limfocytów B, podobnie jak i inne linie komórek hemopoetycznych pochodzi od wspólnej wielopotencjalnej limfo-hemopoetycznej komórki macierzystej, która u płodu powstaje w przyaortalnej okolicy trzewno-opłucnowej [20, 61, 72]. Komórki potomne stopniowo tracą zdolność do wielokierunkowego rozwoju, aż wreszcie powstają poszczególne linie komórek zdolnych do odpowiedzi immunologicznej, takich jak: limfocyty B i T, naturalne komórki cytotoksyczne i komórki dendrytyczne prezentujące antygen [31]. Linie te zachowują swoją odrębność, chociaż bardzo wczesne rozwojowo linie komórki B mogą jeszcze przekształcać się w linię makrofagów [44]. Podobnie jak w innych liniach komórkowych, drogę różnicowania komórki B monitorują geny regulujące rozwój, a ich czynność warunkują kompleksy odpowiednich receptorów powierzchni.

II. HETERODIMER CD79 α /CD79 β – SKŁADNIK KOMPLEKSU RECEPTORA ANTYGENU KOMÓRKI B

Cząsteczki CD79 α i CD79 β (wcześniejsze nazwy Ig α i Ig β) należą do nadrodziny immunoglobulin, przy czym zewnątrzkomórkowa immunoglobulinopodobna CD79 α jest typu C2, a CD79 β – typu V [66] (rys. 1). Obie cząsteczki przez wiązanie dwusiarczkowe tworzą heterodimer, który w błonie komórkowej jest połączony



RYSunEK 1. Struktura heterodimeru CD79 α /CD79 β [wg 66] i receptora antygenu komórki B (BCR) [modyfikacja wg 75]; (i) cząsteczki CD79 α i CD79 β przez wiązanie dwusiarczkowe tworzą heterodimer. Immunoglobulinopodobna część zewnątrzkomórkowa CD79 α jest typu C2, zaś CD79 β typu V; (ii) w cytoplazmatycznych domenach heterodimeru występuje motyw ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) zaznaczony na rysunku po stronie prawej jako Y – Y; ITAM odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów z BCR do wnętrza komórki; procesy fosforylacji mediowane przez kinazy (Lyn, Fos, Blk, Btk, Syk i fosfatydyloinozytolo-3-kinaza) związane z BCR włączają położone niżej układy sygnalizacyjne, co w rezultacie prowadzi do aktywacji komórki B, jej różnicowania, a w niektórych wypadkach do apoptozy; (iii) heterodimer CD79 α /CD79 β występuje już na komórce pre-B wchodząc w skład jej pra-receptora

niekwalencyjnie z błonową immunoglobuliną (bł Ig) [69]. Przy pomocy transfekcji wykazano, że wszystkie izotypy bł Ig występują w łączności z CD79 α /CD79 β [101]. Kompleks złożony z bł Ig i CD79 α /CD79 β tworzy receptor antygeny komórki B (*B-cell receptor* – BCR) [57, 69, 70]. Integralność receptora dla antygeny na komórkach pre-B i B odgrywają kluczową rolę w ich rozwoju. Utrata genów *mb-1* i *B29*, które odpowiednio kodują CD79 α i CD79 β może zablokować rozwój komórki pre-B [34, 75]. Geny te, specyficzne dla komórek B, u człowieka znajdują się w chromosomach 17q23 (gen CD79 α) i 19q13.2 (gen CD79 β) [66].

Heterodimer CD79 występuje wyłącznie na komórkach linii B, przy czym jego ekspresję wykryto zarówno w cytoplazmie, jak i na powierzchni komórki. Cytoplazmatyczna ekspresja CD79 wyprzedza ekspresję łańcucha ciężkiego μ i ujawnia

się w okresie komórki pro-B [69]. Comans-Bitter i wsp. [17] cytoplazmatyczną ekspresję CD79 wykryli w szpikowych komórkach TdT^+CD19^+ i $CD10^+CD19^+$. Cytoplazmatyczna ekspresja CD79 utrzymuje się przez cały okres rozwoju komórki B i występuje nawet w części młodych rozwojowo komórek plazmatycznych. Aktywacja komórki B zmniejsza (*downregulate*) cytoplazmatyczną ekspresję CD79, dlatego np. ekspresja CD79 α jest większa w cytoplazmie komórek B mankietu grudek chłonnych niż w ośrodkach rozrodczych [57, 68, 69]. Jak się wydaje, wystąpienie CD79 na powierzchni koreluje z ekspresją błonowej formy łańcucha ciężkiego μ , co ma miejsce na etapie komórki pre-B [66]. Powierzchniowa ekspresja CD79 β (i prawdopodobnie także CD79 α) utrzymuje się po zmianie izotypu Ig przez komórkę B i ulega zmniejszeniu w końcowym okresie różnicowania do komórki plazmatycznej [68, 69]. Interesująca jest obserwacja, że komórki B większości chorych (83%) z przewlekłą białaczką limfatyczną charakteryzuje niska ekspresja cząsteczki CD79 β lub występują mutacje genu *B29*, który koduje CD79 β [93].

Heterodimer CD79 α /CD79 β pełni co najmniej dwójaką rolę:

- po pierwsze: uczestniczy w dojrzewaniu komórki B,
- po drugie: jest konieczny dla transdukcji sygnału do wnętrza komórki, po związaniu antygeny z biał Ig.

Jeszcze w latach osiemdziesiątych wykazano, że komórki B pozbawione CD79 α nie mają także ekspresji biał Ig μ [36, 37]. Transfekcja cDNA CD79 α umożliwiła ekspresję biał Ig μ na powierzchni komórki [38]. Wyniki te sugerują, że CD79 α umożliwia transport IgM na powierzchnię komórki. Niedawno skonstruowano model doświadczalny myszy z niedoborem CD79 α i CD79 β i u zwierząt tych badano różnicowanie się komórki B. Zwierzęta, które zostały pozbawione większości tzw. „ogona” peptydowego w części cytoplazmatycznej CD79 α charakteryzowało zablokowanie rozwoju obwodowych komórek B [96]. Natomiast myszy pozbawione CD79 β (myszy CD79 $\beta^{-/-}$) miały zablokowany rozwój na etapie komórki pro-B. Wprawdzie występowała rearanżacja segmentów genów D_H i J_H łańcuchów ciężkich Ig, ale nie dochodziło do rekombinacji V_H z DJ_H i ekspresji mRNA Ig [34]. Tak więc obecność CD79 β jest konieczna już we wczesnym okresie rozwoju komórki B dla całkowitej rekombinacji VDJ_H . Powyższe wyniki sugerują, że w rozwoju komórki B CD79 α i CD79 β pełnią odmienne role.

Podczas rekombinacji VDJ_H ma miejsce wyłączenie alleliczne (*allelic exclusion*) [3]. Zjawisko wyłączenia allelicznego powoduje, że określona komórka B wytwarza tylko jeden rodzaj łańcuchów ciężkich i lekkich, co znakomicie ułatwia proces selekcji klonalnej. Wykazano, że receptor z mutacją, w której następstwie zostaje przerwany kontakt między biał Ig μ a CD79 α - CD79 β jest niezdolny do wywołania wyłączenia allelicznego, jak również do wpływu na dalszy rozwój komórki B [74].

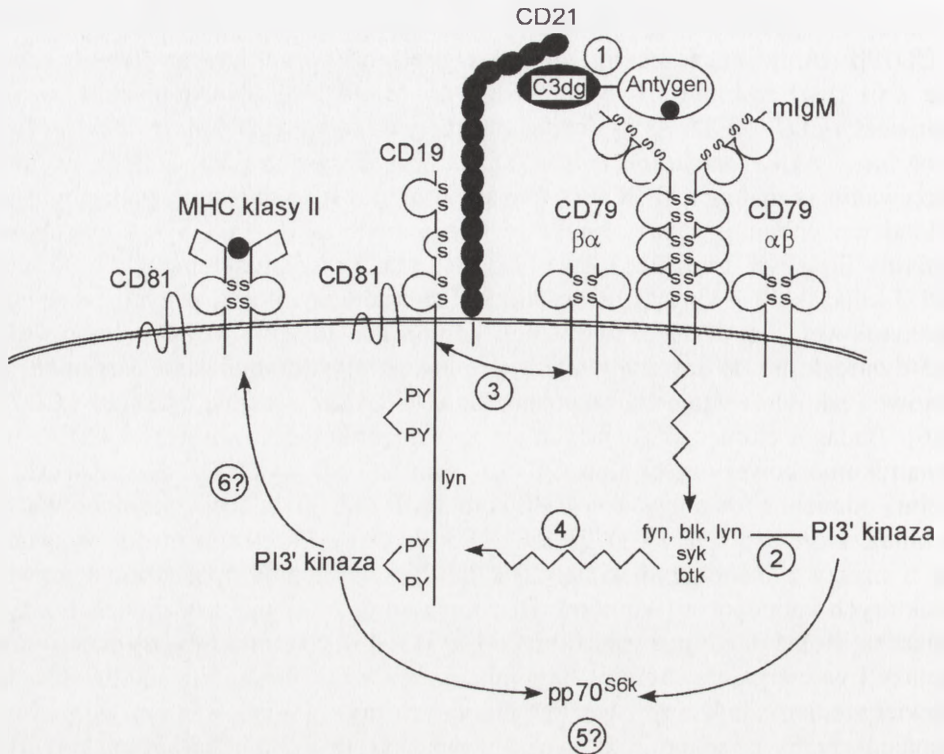
Udział CD79 α /CD79 β w transdukcji sygnału do wnętrza komórki może być wyjaśniony już na podstawie struktury kompleksu BCR, a to z uwagi na fizyczną łączność między heterodimerem a biał Ig μ , a także dlatego, że biał Ig mają krótkie

domeny cytoplazmatyczne [76] (rys. 1). Chociaż cytoplazmatyczne domeny CD79 α i CD79 β też nie są szczególnie długie (cytoplazmatyczna domena CD79 α składa się z 61 reszt aminokwasowych, a CD79 β – z 48) [66]. W cytoplazmatycznych domenach CD79 α /CD79 β występuje tzw. motyw aktywacji ITAM (*immunoreceptor tyrosine – based activation motif*) [76], który odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów z BCR do wewnątrzkomórkowego układu sygnalizacyjnego. Układ ten obejmuje kinazy białkowe tyrozynowe, takie jak: Syk i członkowie rodziny Src (Fyn, Lyn, Blk i Btk) [33, 41], a także fosfatydyloinozytolo-3-kinazę (PI 3-kinaza). PI 3-kinaza fosforyluje fosfatydyloinozytol w 3 pozycji pierścienia inozytoloowego, a w czasie stymulacji komórki fosforyluje fosfatydyloinozytolo-4,5-dwufosforan do fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforanu. Istnieją różnice ilościowe i jakościowe między zespołami kinaz Src, które asocjują z CD79 α i CD79 β [16]. Badania chimer składających się z zewnątrzkomórkowej części CD8 i wewnątrzkomórkowej części albo CD79 α , albo CD79 β wykazały, że cząsteczki te pełnią odmienne funkcje w aktywacji komórki B [47, 90]. Chociaż czynność każdej z kinaz, które asocjują z CD79 α i CD79 β nie jest do końca poznana, wykazano, że u myszy z niedoborem kinazy Btk lub Syk występuje upośledzenie rozwoju niektórych subpopulacji komórek B, co sugeruje, że sygnały pochodzące z tych kinaz są istotne dla dojrzewania komórek B [15, 45]. Natomiast myszy pozbawione kinazy Lyn cierpią na choroby autoimmunologiczne z obecnością autoprzeciwciał, powiększeniem śledziony i węzłów chłonnych oraz występowaniem kłębkowego zapalenia nerek, co sugeruje, że Lyn odrywa jakąś rolę w eliminacji autoreaktywnych komórek B [71].

III. KOMPLEKS CD19/CD21/CD81/Leu-13

Z BCR związane są jeszcze inne cząsteczki błony komórkowej, takie jak: kompleks CD19/CD21/CD81/Leu-13, cząsteczka CD22 oraz CD5 [67]. Ta ostatnia występuje tylko na niewielkiej subpopulacji komórek B, tzw. komórek B-1, gdzie jak się wydaje pełni rolę negatywnego regulatora sygnałów pochodzących z BCR [8].

Na powierzchni dojrzałych komórek B CD19 stanowi rdzeń wielocząsteczkowego kompleksu sygnalizacyjnego, który obejmuje jeszcze CD21, CD81, Leu-13, jak również inne nie do końca zidentyfikowane białka [10, 58, 89] (rys. 2). W kompleksie tym przybliżony stosunek molowy CD19 do CD21 wynosi jak 1:1. Na błonie komórkowej CD19 występuje w nadmiarze w stosunku do CD21 [26]. Względne ilości CD81 w kompleksie z CD19 nie są znane, ale CD81 na powierzchni komórki B znajduje się w większych ilościach niż CD19 lub CD21, przy czym CD81 może występować albo jako niezależna jednostka, albo w związku z cząsteczkami MHC klasy II [83]. Ekspresja Leu-13 jest zmienna, zależnie od linii komórki B, przy



RYSUNEK 2. Trzy główne kompleksy występujące na komórce B obejmują: (i) receptor antygenowy komórki B (*BCR-B cell receptor*) złożony z błonowej immunoglobuliny (bł Ig) i heterodimeru CD79 α /CD79 β (prawa strona rysunku), (ii) kompleks CD19/CD21/CD81, którego rdzeń stanowi CD19 (środkowa część rysunku), (iii) kompleks cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy II z CD81 (lewa strona rysunku) [modyfikacja wg 26]; 1) Po przedimmunologicznym rozpoznaniu immunogenu przez układ dopełniacza CD21 (CR2) wiąże fragmenty C3, co umożliwia pośrednie sieciowe związanie (*cross-linking*) CD19 z bł Ig. Sieciowe związanie CD19 z bł Ig zmniejsza na komórce B liczbę cząsteczek Ig (z 10000 do 100), jakie muszą zostać związane, aby wystąpiła synteza DNA. 2) Interakcja między CD19 a kompleksem BCR aktywuje kilka niereceptorowych kinaz białkowych tyrozynowych, łącznie z kinazą Lyn, która m.in. aktywuje fosfatydyloinozytolo-3-kinazę (PI3-kinazę). 3) Część tych kinaz białkowych tyrozynowych wywołuje fosforylację reszt tyrozynowych w wielkiej 242-aminokwasowej domenie cytoplazmatycznej CD19. 4) Fosforylację domeny cytoplazmatycznej CD19 może również wywołać stała (*constitutive*) interakcja między cytoplazmatycznymi częściami CD19 a CD79 α /CD79 β (w immunoprecypitatach CD19 występują także precipitaty CD79 α /CD79 β i niereceptorowej kinazy białkowej tyrozynowej Syk). 5) Fosforylacja reszt tyrozynowych CD19 aktywuje również PI3-kinazę (która wiąże się z dwoma odpowiednimi fosfotyrozynami CD19). Interakcja CD19-PI3-kinaza może nasilać aktywację pp70^{S6k} wywołaną przez kompleks kinaza Lyn-PI3-kinaza (?). 6) Fosforylacja cytoplazmatycznej części CD19 poprzez PI3-kinazę może także przyspieszać przebieg niektórych zdarzeń w błonie komórkowej, takich jak: przyłączenie peptydu antygenowego do MHC klasy II (?). (Taki kompleksy komórki B złożone z białek reprezentujących różne rodziny umożliwiają komórce m.in. odpowiedź na niskie stężenie antygeny, nawet przy małym powinowactwie antygeny do BCR, co ma np. miejsce przy pierwotnej odpowiedzi immunologicznej)

czym obecność tej cząsteczki nie jest niezbędna dla czynności kompleksu CD19/CD21/CD81. Zresztą udział CD21 w tym kompleksie jest także dyskusyjny, ponieważ sam CD19 lub łącznie z CD81 może zapewnić sygnalizację zależną od BCR [26].

W interakcji CD19-CD21 uczestniczą: domeny zewnątrzkomórkowe i transbłonowa, natomiast rejon cytoplazmatyczny nie odgrywa żadnej roli. Dla powstania kompleksu CD19-CD81 konieczna jest tylko zewnątrzkomórkowa domena CD19 [26].

Każda z cząsteczek kompleksu CD19/CD21/CD81 może tworzyć kompleksy z jeszcze innymi cząsteczkami. W immunoprecypitach CD19 występują precypitaty CD79 α i CD79 β , których reszty tyrozynowe ulegają fosforylacji równocześnie z fosforylacją tyrozyny CD19 po związaniu z białym Ig [26]. Ponadto CD19 na komórkach B tworzy czapeczki (*capping* – biegunowa akumulacja usieciowanych receptorów) z cząsteczką CD38. Jednakże czapeczki, niezależnie od siebie, tworzą z białym Ig zarówno CD19, jak i CD38. CD38 należy do nadrodziny cząsteczek cyklazy rybozylu adenylozynodifosforanu (*ADP – ribosyl cyclase*). W dojrzałej komórce B cząsteczka CD38 dostarcza sygnałów aktywujących i zapobiega apoptozie komórek z ośrodków rozrodczych. Kontrowersyjnie CD38 ułatwia śmierć prekursorów komórki B w szpiku [54]. Interakcja CD19-CD38 sugeruje obecność na powierzchni komórki B dużych skupisk cząsteczek obejmujących: białe Ig/CD79 α /CD79 β , CD19/CD21/CD81 oraz CD19/CD38 [29].

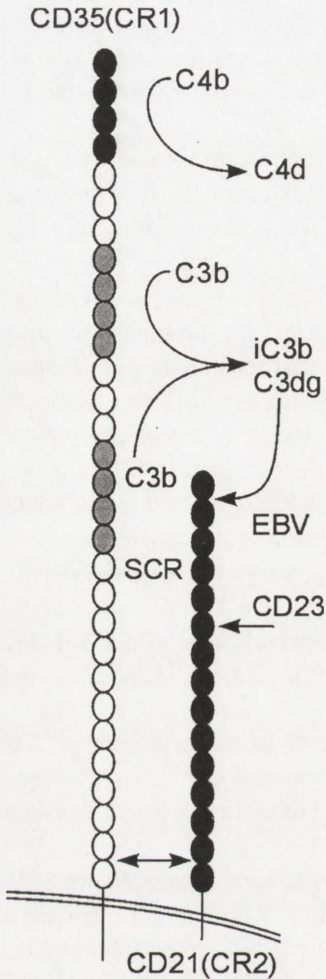
CD21 poza udziałem w kompleksie CD19/CD21/CD81 łączy się jeszcze z CD35 [10, 58, 97]. Kompleks CD21/CD35 wymaga jedynie zewnątrzkomórkowych domen tych dwu receptorów dla dopełniacza [9, 59]. (CD21 jest receptorem dla dopełniacza typu 2, a CD35 – typu 1) (rys. 3).

CD81 na komórkach B tworzy immunoprecypitaty m.in. z cząsteczkami MHC klasy II [83]. Wydaje się, że kompleks CD81/MHC klasy II nie zawiera cząsteczki CD19 i odwrotnie – w immunoprecypitach CD19 nie występują cząsteczki MHC klasy II. Na komórkach T CD81 współtworzy kompleksy z cząsteczkami CD4 i CD8, które pełnią rolę koreceptorów [39].

Z kolei należy poświęcić więcej uwagi poszczególnym członkom kompleksu CD19/CD21/CD81.

IV. CZĄSTECZKA CD19

CD19 jest glikoproteina błony komórkowej, należąca do nadrodziny immunoglobulin i występująca wyłącznie na komórkach linii B. CD19 pojawia się już na komórkach pro-B, mniej więcej w tym samym czasie, kiedy ma miejsce rearanżacja genów łańcucha ciężkiego μ Ig. Ekspresja CD19 utrzymuje się przez wszystkie



RYSUNEK 3. Kompleks CD21/CD35 [fragment i modyfikacja rysunku wg 26]: (i) CD35 (receptor dla dopełniacza typu 1) katalizuje konwersję C4b do C4d, a także C3b do iC3b oraz C3dg; fragmenty iC3b oraz C3dg są ligandami dla CD21 (receptor dla dopełniacza typu 2). (ii) Przy końcu $-NH_2$ CD21 znajdują się dwie sekwencje (SCR – *short consensus repeats*), z którymi wiążą się iC3b oraz C3dg a także wirus Epsteina-Barr (EBV). (iii) CD23 wiąże się z innymi SCR. (iiii) Interakcja CD35 – CD21 zachodzi w części przybłonowej rejonów zewnątrzkomórkowych

okresy różnicowania komórki B i jest tracona dopiero na etapie komórki plazmatycznej [64, 65]. Ekspresja CD19 zwiększa się pod wpływem interleukiny – 7 (IL-7) [104]. Nie ustalono, czy w okresie komórki pro-B i pre-B CD19 działa samodzielnie, czy współdziała z pra-receptorem komórki pre-B [pra-receptor, podobnie jak BCR ma łańcuch μ , ale zamiast łańcuchów lekkich występuje surogat, który kodują 2 geny: V pre B i $\lambda 5$ (u myszy) lub 14.1 (u człowieka)]. Wydaje się, że podczas dalszego rozwoju komórki B w pewnym mikrośrodowisku CD19 jest ligandem dla CD77 [55]. CD77 występuje niemal wyłącznie na limfocytach B z ośrodków rozrodczych grudek chłonnych, zwłaszcza w migdałkach, a także na niektórych nabłonkach i śródbłonkach. Sugeruje się, że CD77 uczestniczy w sygnalizacji transbłonowej prowadzącej do apoptozy komórek B z ośrodków rozrodczych grudek chłonnych zwłaszcza w migdałkach, a także na niektórych na-

blonkach i śródblonkach. Sugeruje się, że CD77 uczestniczy w sygnalizacji transblonowej prowadzącej do apoptozy komórek B z ośrodków rozrodczych [103].

U człowieka gen CD19 zlokalizowano w chromosomie 16p11.2. W rejonie tym leżą także geny dla CD43, CD11a, CD11b, CD11c i gen receptora dla IL-4 [73]. Gen CD19 u człowieka i myszy składa się z 15 egzonów, z których aż dziewięć koduje rozległą 242-aminokwasową domenę cytoplazmatyczną, pieczętowiec konserwowaną podczas ewolucji [82]. Czynniki transkrypcyjne BSAP, specyficzny dla komórki B, kodowany przez gen Pax-5 reguluje ekspresję CD19 [1, 48].

Badania „*in vitro*” sugerują, że CD19 pełni rolę regulatora transdukcji sygnałów pochodzących z BCR [7, 58]. Na komórce B CD19 pozostaje w bezpośrednim sąsiedztwie z BCR. Tą fizyczną bliskość potwierdza stały udział CD19 w sygnalizacji pochodzącej z BCR. Tak np. w następstwie sieciowego związania biał Ig występuje fosforylacja tyrozyny w wielkiej cytoplazmatycznej domenie CD19. Proces ten jest mediowany przez kinazy białkowe tyrozynowe [99, 100].

Sieciowe związanie CD19 przez monoklonalne przeciwciała:

- 1 – wywołuje aktywację kinaz białkowych tyrozynowych i fosforylację tyrozyny w cytoplazmatycznej części CD19, chociaż fosforylacja ta (podobnie jak przy sieciowym związaniu innych białek) nie jest tak znamienna, jak przy związaniu biał Ig [98]; związanie samej cząsteczki CD19 aktywuje kinazy białkowe tyrozynowe działające na produkt proto-onkogenu *vav* (powstaje kompleks sygnalizacyjny CD19/*vav*/PI 3-kinaza) [102];
- 2 – aktywuje fosfolipazę C, chociaż stopień aktywności fosfolipazy C jest większy, gdy równocześnie zostanie związana biał Ig; reakcję hamują inhibitory kinaz białkowych tyrozynowych [13];
- 3 – powoduje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Ca^{2+} jest uniwersalnym modyfikatorem transdukcji sygnałów, które m.in. wpływają na takie funkcje komórki, jak: proliferacja, różnicowanie, adhezja, ruchliwość i sekrecja.

Jeśli nastąpi równoczesne związanie CD19 z biał IgM na komórce B przez specyficzne monoklonalne przeciwciała w obecności IL-4, ulega zmniejszeniu z 10000 do 100 liczba cząsteczek IgM, których stymulacja jest konieczna dla wzbudzenia syntezy DNA [12].

Fosforylacja tyrozyny CD19 (niezależnie od tego, czy jest wywołana sieciowym związaniem CD19 czy biał Ig) prowadzi do związania i aktywacji PI 3-kinazy. PI 3-kinaza jest dimerem złożonym z podjednostki łącznikowej (*adaptor*) – p85 i podjednostki katalitycznej (*catalytic*) – p110 [98]. Podjednostka p85 ma dwie niezwykle ważne domeny SH 2 (*Src homology region 2*) – domeny homologiczne z rejonem 2 kinazy Src i efektywnie wiąże się z dwiema odpowiednimi fosfotyrozynami CD19, co aktywuje p110 [6, 85]. Jak się wydaje, interakcja CD19-PI 3-kinaza pełni dwojaką funkcję: aktywuje pp70^{S6K} oraz reguluje ruchliwość (*trafficking*) cząsteczek w błonie komórkowej w relacji do przetwarzanego antygeny [26] (rys. 2).

Dzięki skonstruowaniu doświadczalnego modelu myszy z niedoborem CD19, a także szczepów transgenicznych myszy z ludzkim genem CD19, które charakteryzuje nadmierna ekspresja CD19, uzyskano nowe dane odnośnie roli CD19: 1 – w aktywacji komórki B, 2 – w jej rozwoju [25, 78, 109].

Ad. 1. Komórki myszy z ludzkim genem CD19 są nadreaktywne wobec różnych transbłonowych sygnałów [25, 81, 109], czemu towarzyszy podwyższony poziom surowiczych Ig [25], wzrost poziomu endogennych przeciwciał anti-DNA i czynnika reumatoidalnego [80] oraz rozwój układowych chorób autoimmunologicznych. Nadreaktywność charakteryzuje nawet te komórki B, które wykazują wzrost ekspresji CD19 tylko o 10–25% [80]. Sato i wsp. [80] sugerują, że defekt u myszy z nadmierną ekspresją CD19 wynika raczej z zaburzonej regulacji sygnałów w komórce, a nie z nieprawidłowego repertuaru przeciwciał.

Przeciwnie, u myszy z niedoborem CD19 komórki B charakteryzuje znamienne obniżona odpowiedź na antygeny zależne od pomocniczych komórek T. Myszy te tracą także zdolność wytwarzania ośrodków rozrodczych w tkankach chłonnych, a poziom surowiczych przeciwciał jest obniżony [25, 78]. Tak więc CD19 odgrywa istotną rolę zarówno w regulacji odpowiedzi komórki B na antygeny zależne od komórki T, jak i w dojrzewaniu i/lub selekcji aktywnych komórek B do komórek pamięci.

Ad. 2. Jeśli idzie o wpływ cząsteczki CD19 na rozwój komórek B, to jej nadmierna ekspresja hamuje rozwój „konwencjonalnych” komórek B w szpiku na etapie komórki pre-B [25], co sugeruje, że CD19 odgrywa rolę w negatywnej selekcji podczas szpikowego rozwoju komórki B [109]. Natomiast u myszy z niedoborem CD19 rozwój „konwencjonalnych” komórek B nie jest zaburzony [25, 78].

U myszy, a być może także u człowieka, cząsteczka CD19 jest konieczna dla prawidłowego rozwoju komórek B-1. Komórki B-1 tworzą małą, samoodnawiającą się subpopulację w linii komórki B, która u myszy jest łatwa do odróżnienia od dominującej populacji „konwencjonalnych” komórek B-2 na podstawie kilku cech fenotypowych, takich jak: obecność cząsteczki CD5, silna ekspresja białka IgM, słaba lub nieistotna ekspresja IgD, słaba ekspresja B220, brak ekspresji CD23. Komórki B-1 występują głównie w jamie otrzewnowej dorosłych myszy i nie ma ich w szpiku, który zasiedlają prekursorzy komórki B-2. Uważa się, że komórki B-1 reprezentują najwcześniejszy okres limfopojezy w życiu zarodkowym ssaków i wykazują takie cechy „atawistyczne”, jak: trwałość ekspansywnych klonów i zdolność do samoodnowy. Komórki B-1 wytwarzają większość surowiczych IgM, a także przeciwciała klasy IgG3. Obie klasy tych immunoglobulin cechuje niskie powinowactwo wobec antygenów i wielospecyficzność, tzn. że określone przeciwciało jest zdolne do wiązania różnych antygenów bakteryjnych, polisacharydów, lipidów, białek, a także autoantygenów [43, 79]. Ekspansja niektórych klonów komórki B-1 ma znaczenie w patogenezie chorób autoimmunologicznych [106].

U myszy z niedoborem CD19 zostaje upośledzony rozwój populacji komórek B-1, przeciwnie natomiast – u myszy z nadmierną ekspresją CD19 wzrasta liczba komórek B CD5 dodatnich w jamie otrzewnowej i w śledzionie [80]. Obserwacje powyższe sugerują, że CD19 pełni rolę głównego regulatora odpowiedzi immunologicznej, który ustala próg sygnałów koniecznych dla wczesnej selekcji klonalnej, ekspansji obwodowych komórek B, rozwoju populacji B-1 i tworzenia autoprzeciwciał.

Obok niedoboru CD19, także delecje genetyczne kilku innych cząsteczek uczestniczących w transdukcji sygnałów mogą upośledzać rozwój komórek B-1. I tak u myszy z celowym rozbiciem (*targeted disruption*) protoonkogenu *Vav* także występuje zmniejszona liczba komórek B-1 [91, 102, 107]. Podobnie rozwój populacji komórek B-1 zostaje w znacznym stopniu upośledzony przy destrukcji genu *Btk* [45, 46]. Gen *Btk* koduje niereceptorową kinazę białkową tyrozynową Btk, uczestniczącą w transdukcji sygnałów pochodzących z BCR. Przeciwnie natomiast, homozygotyczne myszy tzw. myszy „zjedzone przez mole” (*motheaten*) (szczep recesywny *me/me* i żywotny – *viable motheaten me^v/me^v*), obok innych nieprawidłowości hematologicznych, charakteryzuje proliferacja komórek B CD5⁺ i zwiększone wytwarzanie IgM i IgG3 [86-88]. U zwierząt tych rozwijają się choroby autoimmunologiczne i giną one średnio w 3 tygodniu (szczep *me/me*) lub w 9 tygodniu (szczep *me^v/me^v*) życia. Proliferacja komórek B CD5⁺ u myszy *me/me* i *me^v/me^v*, jak się wydaje, wynika bezpośrednio z nieprawidłowej aktywności fosfatazy białkowej tyrozynowej komórki hemopoetycznej, którą koduje gen *hcph* (*hematopoietic cell protein – tyrosine phosphatase gene*) [87]. Fosfataza ta ma dwie tworzące tandem domeny SH2 (*SH2 domain – containing tyrosine phosphatase – SHP1*) i przypuszczalnie jest negatywnym regulatorem sygnalizacji pochodzącej z BCR [21, 35].

Udział cząsteczek CD19, *Vav*, *Btk* i *SHP1* w rozwoju komórki B-1 sugeruje, że działają one na podobnych lub zalegających się drogach [46, 88, 91, 107]. Białko *Vav* reaguje z cytoplazmatyczną domeną CD19 [102]. Być może także *Btk* uczestniczy w interakcji z jedną z reszt tyrozynowych znajdujących się w domenie cytoplazmatycznej CD19 [108]. *SHP1* dzięki domenom SH2 może wiązać się z CD19 po jego fosforylacji, względnie *SHP1* może regulować czynność CD19 poprzez defosforylację. U myszy *me/me* i *me^v/me^v* z defektem *SHP1*, skutek zaburzonej regulacji sygnałów w komórce, rozwijają się układowe choroby autoimmunologiczne, podobnie jak u myszy z nadmierną ekspresją CD19. Istnieją pewne podobieństwa między niektórymi objawami, jakie występują u myszy *me/me* i *me^v/me^v* a obrazem klinicznym ludzkiej przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej, w której to chorobie także proliferują komórki B CD5⁺ [11]. Ludzkim odpowiednikiem genu *hcph* myszy jest gen *PTP N6* (*protein-tyrosine phosphatase nonreceptor type 6*), który zlokalizowano w krótkich ramionach chromosomu 12 (12p12 – p13) [105]. W przewlekłej białaczce limfatycznej B-komórkowej trisomia

12 jest jedną z częstszych nieprawidłowości cytogenetycznych i wiąże się ze złą prognozą [19, 60].

V. CZĄSTECZKA CD21

CD21 (inne nazwy: CR2 – receptor dopełniacza typu 2; EBV-R – receptor wirusa Epsteina-Barr) jest członkiem rodziny białek regulujących czynność dopełniacza, do której należą jeszcze CD35 (CR1 – receptor dopełniacza typu 1), CD46 (*MCP – membrane cofactor protein*), CD55 (*DAF – decay-accelerating factor*) oraz białka plazmatyczne: białko wiążące C4 i czynnik H [18, 49]. Geny kodujące te białka leżą tuż przy sobie w 1q32 [18]. Sugeruje się nawet, że geny CD21 i CD35 powstały wskutek duplikacji wspólnego genu – przodka [94].

Na powierzchni komórek B CD21 pojawia się znacznie później niż CD19, bo dopiero na dojrzałych komórkach [18, 94]. Szpikowe komórki B mają bardzo słabą, lub nie wykazują żadnej ekspresji CD21 [94]. Po stymulacji „*in vitro*” spoczynkowych komórek B ekspresja CD21, łącznie z ekspresją IgD stopniowo zanika. Natomiast limfoblastoidalne linie komórkowe transformowane EBV, pomimo morfologii komórki blastycznej zachowują CD21. W tkankach limfoidalnych umiarkowanego stopnia ekspresję CD21 obserwuje się na komórkach B ze strefy płaszczka grudki chłonnej, zaś w strefie brzeżnej ekspresja jest silna. Komórki B z ośrodków rozrodczych grudek chłonnych są w większości CD21 ujemne [95], chociaż CD21 występuje na grudkowych komórkach dendrytycznych. Na tych ostatnich CD21 łączy się z kompleksami immunologicznymi, w skład których wchodzi odpowiednie fragmenty trzeciej składowej dopełniacza, co jak się wydaje wpływa na rozwój ośrodków rozrodczych i zachowanie komórek B pamięci immunologicznej [77].

Poza dojrzałymi komórkami B i grudkowymi komórkami dendrytycznymi, CD21 występuje jeszcze na subpopulacji tymocytów, komórkach T, a także niektórych komórkach nabłonkowych [95]. Z wyjątkiem limfocytów B na żadnym z wymienionych rodzajów komórek nie wykryto cząsteczki CD19.

Jak już wspomniano, CD21 jest receptorem dla fragmentów trzeciej składowej dopełniacza (iC3b, C3dg oraz C3d). Domena zewnątrzkomórkowa CD21 składa się z 15 powtarzalnych krótkich zgodnych sekwencji (*SCR – short consensus repeat*). Każda SCR jest niezależną strukturą złożoną z 60–70 aminokwasów. Dwie SCR znajdujące się przy końcu N są konieczne dla związania C3d [42, 52]. Cytoplazmatyczna część CD21 jest krótka, bo złożona tylko z 34 aminokwasów, co sugeruje, że CD21 może funkcjonować tylko dzięki połączeniom z innymi białkami błony komórkowej (rys. 3). Jednakże zarówno u ludzi, jak i u myszy domena cytoplazmatyczna jest pieczołowicie przechowywana i u obu gatunków występuje 80% identyczności sekwencji aminokwasów [27, 63].

W kompleksie CD19/CD21/CD81/Leu-13 cząsteczka CD21 jest związana niekovalencyjnie z przybłonową częścią zewnątrzkomórkowego rejonu CD19, a także z transbłonowym rejonem tej cząsteczki. CD21 umożliwia nieimmunologiczne wiązanie CD19. Mianowicie CD21 wiążąc antygen opłaszczony fragmentem C3d dopełniacza pośrednio poprzez CD19 zwiększa aktywację komórki B [23, 58]. Znaczenie CD21 w kompleksie CD19 potwierdzają także badania myszy z niedoborem CD21 [2]. Jedną z charakterystycznych cech tych zwierząt, podobnie zresztą jak myszy z niedoborem CD19, jest istotne zmniejszenie się liczby komórek B-1 CD5⁺ w jamie otrzewnowej dorosłych myszy [43]. Z drugiej strony CD21 wiążąc specyficznie składowe dopełniacza i/lub EBV może samodzielnie zwiększyć aktywację komórki B przez wybiórczy łańcuch sygnalizacyjny zależny od *c-fos* [53]. Silna ekspresja CD21 na komórkach B strefy brzeżnej w śledzionie sugeruje, że właśnie ta subpopulacja jest dobrze przygotowana do szybkiej i łatwej aktywności w pierwotnej odpowiedzi immunologicznej [94].

Na wszystkich rodzajach komórek, które noszą CD21, cząsteczka ta wiąże EBV przez miejsce, które częściowo (choć nie całkowicie) zążebia się z miejscem wiążącym iC3b, C3dg oraz C3d [56, 62]. Konsekwencją zakażenia tych komórek przez EBV [14, 51, 92] może być ich unieśmiertelnienie i udział w onkogenezie, chociaż do końca nie ustalono, czy zakażenie komórek B zachodzi przez CD21. CD21 niezależnie od CD4 może ułatwiać zakażenie limfocytów przez ludzkiego wirusa niedoboru immunologicznego (HIV), jeśli jest opłaszczony fragmentami C3 [22, 24, 32].

CD21 może także wiązać się z CD23, chociaż miejsce w zewnątrzkomórkowej domenie CD21, które wiąże CD23 nie pokrywa się z miejscem wiążącym iC3b, C3dg oraz C3d [4, 5]. CD23 jest lektyno-podobnym białkiem występującym na błonie komórkowej lub w postaci rozpuszczalnej. Interakcja CD21-CD23 odgrywa rolę we współdziałaniu komórki B z komórką T i kontroluje wytwarzanie IgE [5, 30].

VI. CZĄSTECZKA CD81

CD81 (inna nazwa *TAPA 1 – target for antiproliferative antigen-1*) należy do ciągle jeszcze powiększającej się rodziny transbłonowych białek o czterech łączach z błoną komórkową (*TM 4 – tetraspan transmembrane proteins*). Do rodziny tej należą jeszcze CD9, CD37, CD53, CD63 i CD82. Podobnie jak inni członkowie tej rodziny, CD81 ma cztery domeny wystarczająco długie, aby czterokrotnie przekraczać błonę komórkową. Oba krótkie końce karboksylowy i aminowy leżą w cytoplazmie [40]. CD81 podobnie jak i inni członkowie rodziny TM 4 ma także pojedyncze reszty asparaginowe w trzeciej i czwartej domenie transbłonowej. U myszy i ludzi występuje 92% zgodności sekwencji aminokwasów w strukturze

CD81, przy czym w domenach transbłonowych i cytoplazmatycznych identyczność sekwenencji osiąga 100% [50].

Większość komórek B na wszystkich szczeblach różnicowania charakteryzuje względnie wysoki poziom ekspresji CD81. Przy tym w warunkach aktywacji „*in vitro*” ekspresja CD81 wzrasta trzy- lub czterokrotnie. Ekspresja CD81 jest także większa na komórkach B w ośrodkach rozrodczych grudek chłonnych niż na otaczających limfocytach B [40]. CD81 występuje również na grudkowych komórkach dendrytycznych [28]. Ekspresja CD81 charakteryzuje większość limfocytów T, tymocyty, naturalne komórki cytotoksyczne, eozynofile i niektóre monocyty. W hodowli większość komórek śródnabłonkowych i zrębowych nosi cząsteczkę CD81 [40].

Strukturalne cechy cząsteczki CD81 sugerują jej czynności sygnalizacyjne, co zgadza się ze zdolnością CD81 do wywoływania homotypowej agregacji komórkowej i do hamowania proliferacji niektórych stransformowanych linii limfocytów [10, 28]. Jednakże chociaż CD81 ma działanie antyproliferacyjne, to nie wywołuje apoptozy. Pogląd, że CD81 jest cząsteczką transdukcji sygnałów, potwierdza obserwacja, że sieciowe związanie CD81 na komórkach B indukuje fosforylację tyrozyny białek komórkowych [84], zaś zdolność CD81 do wywoływania agregacji komórkowej jest hamowana przez inhibitory kinaz białkowych tyrozynowych [26]. Specyficzne połączenia między CD81 i CD19 lub między CD81 i cząsteczkami MHC klasy II sugerują, że CD81 może odgrywać jakąś rolę w wytwarzaniu sygnałów przez te cząsteczki [9].

VII. WNIOSKI

Transdukcja sygnałów przez wielocłonowe kompleksy cząsteczek (kompleks CD79 α /CD79 β /b1 Ig, kompleks CD19/CD21/CD81/Leu-13, kompleks CD81/MHC klasy II, kompleks CD21/CD35 itp.) zależnie od specyfiki tych cząsteczek ułatwia elastyczność komórek wobec zewnątrzkomórkowych sygnałów oraz może wywoływać wielorakie skutki. Tak np. CD19 pełni kluczową rolę w integrowaniu informacji pochodzących z dopełniacza (interakcja z CD21) z informacją pochodzącą z BCR (interakcja z heterodimerem CD79 α /CD79 β).

PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS B, DORFLER P, AGUZZI A, KOZMIK Z, URBANEK P, MAURER-FOGY J, BUSSLINGER M. Pax 5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* 1992; 6: 1589–1607.
- [2] AHEARN JM, FISCHER MB, CROIX D, GOERG S, MA M, XIA J, ZHOU X, HOWARD RG, ROTHSTEIN TI, CARROLL MC. Disruption of the *Cr 2* locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* 1996; 4: 251–262.

- [3] ALT FW. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J* 1984; **3**: 1209–1219.
- [4] AUBRY JP, POCHON S, GAUCHAT J-F, NUEDA-MARIN A, HOLERS V, GRABER P, SIEGFRIED C, BONNEFOY JY. CD23 interacts with a new functional extracytoplasmic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. *J Immunol* 1994; **152**: 5806–5813.
- [5] AUBRY JP, POCHON S, GRABER P, JANSEN KU, BONNEFOY JY. CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* 1992; **358**: 505–507.
- [6] BACKER JM, MYERS M Jr, SHOELSON SE, CHIN DJ, SUN XJ, MIRALPEIX M, HU P, MARGOLIS B, SKOLNIK EY, SCHLESSINGER J, WHITE M. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992; **11**: 3469–3479.
- [7] BARRETT TB, SHU GL, DRAVES KE, PEZZUTTO A, CLARK EA. Signaling through CD19, Fc receptors or transforming growth factor- β : each inhibits the activation of resting human B cells differently. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1053–1059.
- [8] BIKAH G, CAREY J, CIALLELLA JR, TARAKHOVSKY A, BONDADA S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996; **274**: 1906–1909.
- [9] BRADBURY LE, GOLDMACHER VS, TEDDER TF. The CD19 signal transduction complex of B lymphocytes. Deletion of the CD19 cytoplasmic domain alters signal transduction but not complex formation with TAPA-1 and Leu 13. *J Immunol* 1993; **151**: 2915–2927.
- [10] BRADBURY LE, KANSAS GS, LEVY S, EVANS RL, TEDDER TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes induces the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* 1992; **149**: 2841–2850.
- [11] CALIGARIS-CAPPIO F. B-chronic lymphocytic leukemia: a malignancy of anti-self B cells. *Blood* 1996; **87**: 2615–2620.
- [12] CARTER RH, FEARON DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; **256**: 105–107.
- [13] CARTER RH, TUVESON DA, PARK DJ, RHEE SG, FEARON DT. The CD19 complex of B lymphocytes. Activation of phospholipase C by a protein tyrosine kinase-dependent pathway that be enhanced by the membrane IgM complex. *J Immunol* 1991; **147**: 3663–3671.
- [14] CHAN LC, SRIVASTAVA G, PITTALUGA S, KWONG YL, LIU HW, YUEN HL. Detection of clonal Epstein-Barr virus in malignant of peripheral blood CD3⁺CD8⁺ T cells. *Leukemia* 1992; **6**: 952–956.
- [15] CHENG AM, ROWLEY B, PAO W, HAYDAY A, BOLEN JB, PAWSON T. Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* 1995; **378**: 303–306.
- [16] CLARK MR, CAMPBELL KS, KAZLAUSKAS A, JOHNSON S.A., HERTZ M, POTTER TA, PLEIMAN C, CAMBIER JC. The B cell antigen receptor complex: association of Ig-alpha and Ig-beta with distinct cytoplasmic effectors. *Science* 1992; **258**: 123–126.
- [17] COMANS-BITTER WM, DE BRUIN-VERSTEEG S, BROE MK, DE GROOT R, DE VRIES E, VAN DONGEN JJM. CD79 Workshop: Intracellular CD79 expression in precursor B cells tested with the CD79 Panel of monoclonal antibodies. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 182–184.
- [18] COOPER NR, MOORE MD, NEMEROW GR. Immunobiology of CR2, the B lymphocyte receptor for Epstein-Barr virus and the C3d complement fragment. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 85–113.
- [19] CRIEL A, VERHOEF G, VLIETINCK R, MECUCCI C, BILLIET J, MICHAUX L, MEEUS P, LOUWAGIE A, VAN ORSHOVEN A, VAN HOOFF A, BOOGAERTS M, VAN DEN BERGHE H, DE WOLF-PEETERS C. Further characterization of morphologically defined

typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haemat* 1997; **97**: 383–391.

- [20] CUMANO A, DIETERLEN-LIEVRE F, GODIN I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 1996; **86**: 907–916.
- [21] CYSTER JG, GOODNOW CC. Protein tyrosine phosphatase 1C negatively regulates antigen receptor signaling in B lymphocytes and determines thresholds for negative selection. *Immunity* 1995; **2**: 13–24.
- [22] DELIBRIAS CC, KAZATCHKINE MD, FISCHER E. Evidence for the role of CR1 (CD35), in addition to CR2 (CD21), in facilitating infection of human T cells with opsonized HIV. *Scand J Immunol* 1993; **38**: 183–189.
- [23] DEMPSEY PW, ALLISON MED, AKKARAJU S, GOODNEW CC, FEARON DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1996; **271**: 348–350.
- [24] DIERICH MP, EBENBICHLER CF, MARSCHANG P, FUST G, THIELENS NM, ARLA-UND GJ. HIV and human complement: mechanisms of interaction and biological implication. *Immunol Today* 1993; **14**: 435–440.
- [25] ENGEL P, ZHOU L-J, ORD DC, SATO S, KOLLER B, TEDDER TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice lack overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity* 1995; **3**: 39–50.
- [26] FEARON DT, CARTER RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; **13**: 127–149.
- [27] FINGEROTH JD. Comparative structure and evolution of murine CR2. The homolog of the human C3d/EBV receptor (CD21). *J Immunol* 1990; **144**: 3458–3467.
- [28] FREEDMAN A, PHIFER JS, SVAHN J. Expression of cell surface antigens on follicular dendritic cells and their role in B-cell-germinal centre adhesion. [w] Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Sliverstein R, Springer T, Tedder TF, Toold RF [red.] *Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press, Oxford 1995: 732–733.
- [29] FUNARO A, DE MONTE LB, DIANZANI U, FORNI M, MALAVASI F. Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2407–2411.
- [30] GAGRO A, RABATIC S. Allergen-induced CD23 on CD4⁺ T lymphocytes and CD21 on B lymphocytes in patients with allergic asthma: evidence and regulation. *Eur J Immunol* 1994; **24**: 1109–1114.
- [31] GALY A, TRAVIS M, CEN Z, CHEN B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; **3**: 459–473.
- [32] GRAS G, RICHARD Y, ROQUES P, OLIVIER R, DORMONT D. Complement and virus-specific antibody-dependent infection of normal B lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1. *Blood* 1993; **81**: 1808–1818.
- [33] GOLD MR, DE FRANCO AL. Biochemistry of B lymphocyte activation. *Adv Immunol* 1994; **55**: 221–295.
- [34] GONG S, NUSSENZWEIG MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig β . *Science* 1996; **272**: 411–414.
- [35] GOODNOW CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 2264–2271.
- [36] HERMANSON GG, EISENBERG D, KINCADE PW, WALL R. B29: a member of the immunoglobulin gene superfamily exclusively expressed on B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6890–6894.

- [37] HOMBACH J, LECLERCQ L, RADBRUCH A, RAJEWSKY K, RETH M. A novel 34-kD protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *EMBO J* 1988; **7**: 3451–3456.
- [38] HOMBACH J, TSUBATA T, LECLERCQ L, STAPPERT H, RETH M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class. *Nature* 1990; **343**: 760–762.
- [39] IMAI T, YOSHIE O. C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol* 1993; **151**: 6470–6481.
- [40] JONES M, MASON DY. CD81 Workshop Panel report. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 187–189.
- [41] JUSTEMENT LB, BROWN VK, LIN J. Regulation of B-cell activation by CD45: a question of mechanism. *Immunol Today* 1994; **15**: 399–406.
- [42] KALLI KR, AHEARN JM, FEARON DT. Interaction of iC3b with recombinant isotypic and chimeric forms of CR2. *J Immunol* 1991; **147**: 590–594.
- [43] KANTOR AB, HERZENBERG LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 501–538.
- [44] KEE BL, PAIGE CJ. *In vitro* tracking of IL-7 responsiveness and gene expression during commitment of bipotent B-cell / macrophage progenitors. *Curr Biol* 1996; **6**: 1159–1169.
- [45] KERNER JD, APPLEBY MW, MOHR RN, CHIEN S, RAWLINGS DJ, MALISZEWSKI CR, WHITTE ON, PERLMUTTER RM. Impaired expansion of mouse B cell progenitors lacking Btk. *Immunity* 1995; **3**: 301–312.
- [46] KHAN WN, ALT FW, GERSTEIN RM, MALYNN BA, LARSSON J, RATHBUN G, DAVIDSON L, MULLER S, KANTOR AB, HERZENBERG LA, ROSEN FS, SIDERAS P. Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity* 1995; **3**: 283–299.
- [47] KIM KM, ALBER G, WEISER P, RETH M. Differential signaling through the Ig-alpha and Ig-beta components of the cell antigen receptor. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 911–916.
- [48] KOZMIK Z, WANG S, DORFLER P, ADAMS B, BUSSLINGER M. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 2662–2672.
- [49] KRYCH M, ATKINSON JP, HOLERS VM. Complement receptors. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 8–13.
- [50] LEVY S, NGUYEN VQ, ANDRIA ML, TAKAHASHI S. Structure and membrane topology of TAPA-1. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14597–14602.
- [51] LINDHOUT E, LAKEMAN A, MEVISSSEN MLCM, DE GROOT C. Functionally active Epstein-Barr virus-infected follicular dendritic cell lines. *J Exp Med* 1994; **179**: 1173–1184.
- [52] LOWELL CA, KLICKSTEIN LB, CARTER RH, MITCHELL JA, FEARON DT, AHEARN JM. Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J Exp Med* 1989; **170**: 1931–1946.
- [53] LUXEMBOURG AT, COOPER NR. Modulation of signaling via the B cell antigen receptor by CD21, the receptor for C3dg and EBV. *J Immunol* 1994; **153**: 4448–4457.
- [54] MALAVASI F. CD38. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 1137–1138.
- [55] MALONEY MD, LINGWOOD CA. CD19 has a potential CD77 (globotriaryl ceramide) – binding site with sequence similarity to verotoxin B-subunits: implications of molecular mimicry for B cell adhesion and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *J Exp Med* 1994; **180**: 191–202.

- [56] MARTIN DR, YURYEV A, KALII KR, FEARON DT, AHEARN JM. Determination of the structural basis for selective binding of Epstein-Barr virus to human complement receptor type 2. *J Exp Med* 1991; **174**: 1299–1311.
- [57] MASON DY, CORDELL JL, BROWN MH, BORST J, JONES M, PULFORD K, JAFFE E, RALFKIAER E, DALLENBACH F, STEIN H, PILERI S, GATTER KC. CD79: A novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood* 1995; **86**: 1453–1459.
- [58] MATSUMOTO AK, KOPICKY-BURD J, CARTER RH, TUVESON DA, TEDDER TF, FEARON DT. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med* 1991; **173**: 55–64.
- [59] MATSUMOTO AK, MARTIN DR, CARTER RH, KLINKSTEIN LB, AHEARN JM, FEARON DT. Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med* 1993; **178**: 1407–1417.
- [60] MATUTES E, OSCIER D, GARCIA-MARCO J, ELLIS J, COPPLESTONE A, GILLINGHAM R, HAMBLIN T, LENS D, SWANSBURY GJ, CATOVSKY D. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haemat* 1996; **92**: 382–388.
- [61] MEDVINSKY A, DZIERZAK E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; **86**: 897–906.
- [62] MOLINA H, BRENNER C, JACOBI S, GORKA J, CAREL JC, KINOSHITA T, HOLERS VM. Analysis of Epstein-Barr virus-binding sites on complement receptor 2 (CR2/CD21) using human-mouse chimeras and peptides. At least two distinct sites are necessary for ligand – receptor interaction. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12173–12179.
- [63] MOLINA H, KINOSHITA T, INOUE K, CAREL JC, HOLERS VM. A molecular and immunochemical characterization of mouse CR2. Evidence for a single gene model of mouse complement receptors 1 and 2. *J Immunol* 1990; **145**: 2974–2983.
- [64] NADLER LM, ANDERSON KC, MARTI G, BATES M, PARK E, DALEY JF, SCHLOSSMAN SF. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol* 1983; **131**: 244–250.
- [65] NADLER LM, KORSMEYER SJ, ANDERSON KC, BOYD AW, SLAUGHENHOPT B, PARK E, JENSEN J, CORAL F, MAYER RJ, SALLAN SE, RITZ J, SCHLOSSMAN SF. B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. *J Clin Invest* 1984; **74**: 332–340.
- [66] NAKAMURA T. CD79 Workshop Panel report. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 180–182.
- [67] NAKAMURA T. CD79 α and CD79 β . [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 1172–1173.
- [68] NAKAMURA T, KOYAMA M, KOIKE Y, MIYAZAKI K, YONEYAMA A, HIGASHIHARA M, AZUMA M, KUROKAWA K. Suppression of humoral immunity by monoclonal antibody to CD79, an invariant component of antigen receptors on B lymphocytes. *Int J Hematol* 1996; **64**: 39–46.
- [69] NAKAMURA T, KUBAGAWA H, COOPER MD. Heterogeneity of immunoglobulin-associated molecules on human B cells identified by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8522–8526.
- [70] NAKAMURA T, SEKAR MC, KUBAGAWA H, COOPER MD. Signal transduction in human B cells initiated via Ig beta ligation. *Int Immunol* 1993; **5**: 1309–1315.

- [71] NISHIZUMI H, TANIUCHI J, YAMANASHI Y, KITAMURA D, JLIC D, MORI S, WATANABE T, YAMAMOTO T. Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* 1995; **3**: 549–560.
- [72] NUEZ C, NISHIMOTO N, GARTLAND GL, BILLIPS LG, BURROWS PD, KUBAGAWA H, COOPER MD. B cells are generated throughout life in humans. *J Immunol* 1996; **156**: 866–872.
- [73] ORD DC, ELELHOFF S, DUSHKIN H, ZHOU L-J, BEIER DR, DISTECHE C, TEDDER TF. CD19 maps to a region of conservation between human chromosome 16 and mouse chromosome 7. *Immunogenetics* 1994; **39**: 322–328.
- [74] PAPAVALIOU F, MISULOVIN Z, SUH H, NUSSENZWEIG MC. The role of Ig in precursor B cell transition and allelic exclusion. *Science* 1995; **268**: 408–411.
- [75] RAJEWSKY K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996; **381**: 751–758.
- [76] RETH M, HOMBACH J, WIENANDS J, CAMPBELL KS, CHIEN N, JUSTEMENT LB, CAMBIER JC. The B-cell antigen receptor complex. *Immunol Today* 1991; **12**: 196–201.
- [77] REYNES M, AUBERT JP, COHEN JH, AUDOUIN J, TRICOTTET V, DIEBOLD J, KAZATCHKINE MD. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol* 1985; **135**: 2687–2694.
- [78] RICKERT RC, RAJEWSKY K, ROES J. Impairment of T cell-dependent B cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 1995; **376**: 352–355.
- [79] RUPNIEWSKA ZM, ROLIŃSKI J, DMOSZYŃSKA M. Pochodzenie komórek B CD5 dodatnich. *Postępy Biol Kom* 1999; **26**: 119–133.
- [80] SATO S, ONO N, STEEBER DA, PISETSKY DS, TEDDER TF. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* 1996; **157**: 4371–4378.
- [81] SATO S, STEEBER DA, TEDDER TF. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 11558–11562.
- [82] SATO S, TEDDER TF. CD19 Workshop Panel report. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 135–135.
- [83] SCHICK MR, LEVY S. The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules. *J Immunol* 1993; **151**: 4090–4097.
- [84] SCHICK MR, NGUYEN VQ, LEVY S. Ani-TAPA-1 antibodies induce protein tyrosine phosphorylation that is prevented by increasing intracellular thiol levels. *J Immunol* 1993; **151**: 1918–1925.
- [85] SHOELSON SE, SIVARAJA M, WILLIAMS KP, HU P, SCHLESSINGER J, WEISS MA. Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *EMBO J* 1993; **12**: 795–802.
- [86] SHULTZ LD. Hematopoiesis and models of immunodeficiency. *Sem Immunol* 1991; **3**: 397–408.
- [87] SHULTZ LD, SCHWEITZER PA, RAJAN TV, YI T, IHLE JN, MATTHEWS J, THOMAS M, BEIER DR. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (*Hcph*) gene. *Cell* 1993; **73**: 1445–1454.
- [88] SIDMAN CL, SHULTZ LD, HARDY RR, HAYAKAWA K, HERZENBERGLA. Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1⁺ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science* 1986; **232**: 1423–1425.
- [89] TAKAHASHI S, DOSS C, LEVY S, LEVY R. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen. *J Immunol* 1990; **145**: 2207–2213.

- [90] TAKATA M, SABE H, HATA A, INAZU T, HOMMA Y, NUKADA T, YAMAMURA H, KUROSAKI T. Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor – coupled Ca^{2+} mobilization through distinct pathways. *EMBO J* 1994; **13**: 1341–1349.
- [91] TARAKHOVSKY A, TURNER M, SCHAAL S, MEE PJ, DUDDY LP, RAJEWSKY K, TYBULEWICZ VL: Defective antigen receptor – mediated proliferation of B and T cells in the absence of Vav. *Nature* 1995; **374**: 467–470.
- [92] THOMAS JA, COTTER F, HANBY AM, LONG LQ, MORGAN PR, BRAMBLE B, BAILEY BM. Epstein-Barr virus-related oral T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus immunosuppression. *Blood* 1993; **81**: 3350–3356.
- [93] THOMPSON AA, TALLEY JA, DO HN, KUNKEL L, BERENSON J, COOPER MD, SAXON A, WALL R. Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1997; **90**: 1378–1394.
- [94] TIMENS W. CD21 Workshop Panel report. [w] Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Sliverstein R, Springer T, Tedder TF, Tood RF [red.] Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, Oxford 1995: 516–518.
- [95] TIMENS W. CD21 Workshop Panel report. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 140–142.
- [96] TORRES RM, FLASWINKEL H, RETH M, RAJEWSKY K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science* 1996; **272**: 1804–1808.
- [97] TUVESON DA, AHEARN JM, MATSUMOTO AK, FEARON DT. Molecular interactions of complement receptors on B lymphocytes: a CR1/CR2 complex distinct from the CR2/CD19. *J Exp Med* 1991; **173**: 1083–1089.
- [98] TUVESON DA, CARTER RH, SOLTOFF SP, FEARON DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 1993; **260**: 986–989.
- [99] UCKUN FM, BURKHARDT AL., JARVIS L, JUN X, STEALEY B, DIBIRDIK I, MYERS DE, TUEL-AHLGREN L, BOLEN JB. Signal transduction through the CD19 receptor during discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem* 1993; **268**: 21172–21184.
- [100] VAN NOESEL CJ, LANKESTER AC, VAN SCHIJNDEL GM, VAN LIER RA. The CR2/CD19 complex on human B cells contains the src-family kinase Lyn. *Int Immunol* 1993; **5**: 699–705.
- [101] VENKITARAMAN AR, WILLIAMS GT, DARIAVACH P, NEUBERGER MS. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* 1991; **352**: 777–781.
- [102] WENG WK, JARVIS L, LE BIEN TW. Signaling through CD19 activates Vav/mitogen-activated protein kinase pathway and induces formation of a CD19/Vav/phosphatidylinositol 3-kinase complex in human B cell precursors. *J Biol Chem* 1994; **269**: 32514–32521.
- [103] WIELS J. CD77 Workshop Panel report. [w] Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEGKr, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, Moretta L, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Zola H [red.] Leucocyte Typing VI. White Cell Differentiation Antigens. Garland Publishing, Inc. 1997: 175–177.
- [104] WOLF ML, WENG WK, STIEGLBAUER KT, SHAN N, LE BIEN TW. Functional effect of IL-7-enhanced CD19 expression on human B cell precursors. *J Immunol* 1993; **151**: 138–148.
- [105] YI T, GILBERT DJ, JENKINS NJ, COPELAND NG, IHLE JN. Assignment of a novel protein tyrosine phosphatase gene (*hcph*) to mouse chromosome 6. *Genomics* 1992; **14**: 793–795.
- [106] YOUNOU PY, LYDYARD PM. Rôle des lymphocytes B-CD5 dans la physiopathologie des maladies autoimmunes. *Presse Méd* 1990; **19**: 199–200.

- [107] ZHANG R, ALT FW, DAVIDSON L, ORKIN SH, SWAT W. Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the *vav* proto-oncogene. *Nature* 1995; **374**: 470–473.
- [108] ZHOU LJ, ORD DC, HUGHES AL, TEDDER TF. Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *J Immunol* 1991; **147**: 1424–1432.
- [109] ZHOU L-J, SMITH HM, WALDSCHMIDT TJ, SCHWARTING R, DALEY J, TEDDER TF. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B lymphocyte development. *Mol Cell Biol* 1994; **14**: 3884–3894.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 22.04. 1999 r.

Przyjęto: 21.06. 1999 r.

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

INTERLEUKINA 15 (IL-15)

INTERLEUKIN 15

Ewa Z. BAŁKOWIEC-ISKRA, Jakub GOŁĄB

Zakład Immunologii Instytutu Biostruktury Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie: IL-15 jest niedawno odkrytą cytokiną, przypominającą funkcjonalnie, ale nie strukturalnie IL-2. Jest ona produkowana przez szereg komórek organizmu, ma zdolność pobudzania proliferacji komórek NK, limfocytów T i B oraz monocytów. Indukuje również syntezę IgM, IgA i IgG₁. W pracy opisano szczegółowo organizację genową, budowę receptora oraz działanie IL-15 na poszczególne komórki układu odpornościowego. Omówiono również potencjalną rolę IL-15 w chorobach.

(*Postępy Biologii Komórki* 1999; 26: 863–875)

Słowa kluczowe: IL-15, IL-15R, komórki NK, limfocyty T, limfocyty B, monocyty, sarkoidoza, reumatoidalne zapalenie stawów, nowotwór.

Summary: Interleukin 15 is a recently described cytokine which appears to be expressed in a variety of tissues and cell types. It shares many activities with IL-2, including growth stimulation of T cells, B cells and natural killer cells and induction of IgM, IgA and IgG₁ synthesis. This review describes genomic architecture, structure of the IL-15 receptor and biological effects of IL-15 on various cells of the immune system. Moreover, involvement of IL-15 in the pathogenesis and potential treatment of numerous human diseases are discussed briefly.

(*Advances in Cell Biology* 1999; 26: 863–875)

Keywords: IL-15, IL-15R, NK cells, T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, sarcoidosis, rheumatoid arthritis, cancer.

Interleukinę 15 (IL-15) odkryto w 1994 roku w trakcie doświadczeń, w których oceniano zdolność supernatantów zbieranych z różnych hodowli komórkowych do pobudzania proliferacji limfoidalnej linii komórkowej CTLL.2 w obecności neutralizujących przeciwciał anti-IL-2 [21]. Z supernatantu jednej z takich hodowli komórkowych, pochodzących z małpiej nerki (CV-1/EBNA), wyizolowano białko o masie cząsteczkowej 14 kDa. Następnie, przy użyciu zdegenerowanych pramerów oligonukleotydowych oraz techniki PCR, wyizolowano gen kodujący nową cytokinę,

którą nazwano IL-15. Równocześnie, z supernatantu ludzkiej białaczki wywodzącej się z komórek T, stransformowanej HTLV-1 (HuT-102), wyizolowano substancję, którą określono mianem IL-T [10]. Dalsze badania dowiodły, iż obie substancje są tą samą cytokiną.

Obecnie wiadomo, iż IL-15 jest cytokiną produkowaną przez wiele komórek organizmu, należących zarówno do układu odpornościowego (monocyty, makrofagi), jak również do innych układów i narządów (łożysko, mięśnie poprzecznie prążkowane, nerka, serce, śledziona, płuca, skóra właściwa)[21]. IL-15 jest cytokiną przypominającą funkcjonalnie, ale nie strukturalnie, IL-2. Podobieństwo działań jest najprawdopodobniej konsekwencją wykorzystywania przez IL-15 łańcuchów β i γ receptora dla IL-2. IL-15 ma zdolność stymulowania proliferacji komórek NK, limfocytów T i B oraz monocytów. Poza działaniem mitogennym wywiera również szereg innych efektów: w limfocytach T indukuje ekspresję mRNA dla perforyny, granzymów A i B, interferonu- γ oraz Fas ligandu. Odgrywa również rolę w dojrzewaniu i różnicowaniu komórek układu odpornościowego (IL-15 i jej receptor są produkowane w tkankach płodowych – wątrobie, nabłonku grasicy, komórkach zrębowych szpiku) [37].

Wiele, omówionych w dalszej części artykułu, właściwości IL-15 czyni ją atrakcyjną kandydatką do wykorzystania w badaniach klinicznych, a być może również w terapii takich zespołów chorobowych, jak: nowotwory czy też zjawiska autoimmunizacyjne.

1. BUDOWA MOLEKULARNA IL-15

1.1. Organizacja genu i regulacja ekspresji genu

Gen ludzkiej IL-15 znajduje się na chromosomie 4q31, natomiast gen mysiej IL-15 zlokalizowany jest w centralnej części chromosomu 8. Składa się on z 8 egzonów i 7 intronów [8]. Sekwencja promotorowa mysiej IL-15 znajdująca się po stronie 5' genu IL-15 mierzy 1227 bp. W regionie tym znaleziono sekwencje wiążące czynniki transkrypcyjne, takie jak: SP-1 (pozycja od 56 do 47), NF- κ B (od 319 do 310), dwa miejsca wiążące NF-IL-6 (od 135 do 126 i od 778 do 769), GAS (od 136 do 128) oraz ISRE (252-240)[50]. Sekwencja ludzkiej IL-15 jest w 97% identyczna z sekwencją małpiej IL-15 i w 73% z mysią [8].

W sąsiedztwie genu dla IL-15 znajdują się również geny kodujące inne cytokiny, czynniki wzrostu i chemokiny (między innymi: IL-8, FGF-2 i FGF-5, EGF). Również gen dla IL-2 znajduje się w pobliskim regionie (4q26-27).

1.2. Budowa IL-15

IL-15, wraz z IL-2 należą do rodziny cytokin czterohelikalnych wiążących się z receptorami hematopoetynowymi. Odpowiednia budowa przestrzenna IL-15 stabilizowana jest 2 mostkami dwusiarczkowymi umieszczonymi między cysteinami Cys 42 a Cys 88 (homologicznie do IL-2) oraz Cys 35 a Cys 91 [44].

Gen *il-15* koduje dwie izoformy białka, zbudowane z 48- lub 21-aminokwasowej sekwencji sygnałowej i 114-aminokwasowego dojrzałego białka ostatecznego. Izofomy te wykazują różną dystrybucję tkankową: 21-aminokwasowa występuje głównie w sercu, jądrze, wyrostku robaczkowym i grasicy, 48-aminokwasowa w mięśniu szkieletowym, łożysku, sercu, płucu, wątrobie, grasicy i nerce [32,41]. Izofomy te mają również inną lokalizację wewnątrzkomórkową: forma 21-aminokwasowa lokalizuje się w cytoplazmie i jądrze, natomiast forma 48-aminokwasowa kierowana jest głównie do siateczki śródplazmatycznej i jest wydzielana na zewnątrz. Izofoma z krótszym odcinkiem sygnałowym najprawdopodobniej nie jest wydzielana przez komórki. Nie jest to typowe zjawisko dla cytokin, które z reguły wywierają szereg efektów biologicznych po związaniu się z receptorami błonowymi, zlokalizowanymi na powierzchni komórek docelowych. Niewykluczone, że wewnątrzkomórkowa IL-15 wywiera efekty biologiczne w komórkach, które ją produkują. Interesujące jest również to, że podjednostka α receptora dla IL-15 (IL-15R) ma sekwencję lokalizacji jądrowej (NLS) [46]. Chociaż dotychczas nie zaobserwowano wiązania się IL-15 z jej receptorem w cytoplazmie komórek produkujących, taka hipoteza, gdyby została potwierdzona, z pewnością byłaby sensacyjna. Można sobie również wyobrazić inne znaczenie wewnątrzkomórkowej, nie wydzielanej IL-15: być może wewnątrzkomórkowa IL-15 jest uwalniana z komórek po ich rozpadzie, na przykład w przebiegu infekcji wirusowej lub bakteryjnej. Gwałtowny, lokalny wzrost stężenia IL-15 mógłby wówczas być sygnałem dla komórek NK i limfocytów T o zagrażającym niebezpieczeństwie.

1.3. Budowa receptora dla IL-15

Receptor dla IL-15 (IL-15R) zbudowany jest z 3 podjednostek: α – charakterystycznej dla IL-15 oraz β i γ . Łańcuch β wykorzystywany jest również przez IL-2, natomiast łańcuch γ znajduje się ponadto w receptorach dla szeregu innych cytokin, takich jak: IL-4, IL-7 i IL-9 [44].

1.3.1. Budowa łańcucha

Gen kodujący łańcuch α receptora dla IL-15 (IL-15R α) zajmuje dystalną część krótkiego ramienia chromosomu 10 (p14-15) [4]. mRNA dla IL-15R α zostało zidentyfikowane w wielu typach komórek. Należą do nich m.in. komórki: śledziony, grasicy, prostaty, jądra, jajnika, limfocyty i monocyty krwi obwodowej, jak również

komórki nowotworowe na przykład komórki czerniaka: IGR3, JUSO, MELP [9,31]. Jedynie komórki tuczne wykazują ekspresję innego typu IL-15R α określanego jako IL-15RX. Do przekazywania sygnału przez ten receptor nie jest konieczna obecność dwóch pozostałych podjednostek IL-2R [45]. IL-15R α jest typowym białkiem błonowym typu I, o masie cząsteczkowej 60 kDa. Zbudowany jest z 32-aminokwasowej sekwencji sygnałowej, 173-aminokwasowej domeny zewnątrz błonowej, 21-aminokwasowej domeny transbłonowej oraz 37-aminokwasowej domeny cytoplazmatycznej. Mimo iż zidentyfikowano 3 izoformy ludzkiego IL-15R α , do tej pory nie udało się wykazać różnic w ich funkcji [46]. Łańcuch α receptora dla IL-15 (IL-15R α) wiąże IL-15 z bardzo wysokim powinowactwem (1000 razy wyższym niż wynosi powinowactwo interleukiny-2 do łańcucha α receptora dla IL-2), wynoszącym $K_{a>}10^{11} M^{-1}$. Powinowactwo to nie zależy od obecności podjednostek $\beta\gamma$ receptora [20]. IL-15R α znajduje się na powierzchni aktywowanych, ale nie spoczynkowych makrofagów, komórek NK, limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺.

1.3.2. Budowa łańcucha β

IL-15 wykorzystuje łańcuch β receptora dla IL-2 [21]. Jest to 70–75 kDa glikoproteina, kodowana przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie 22q11.2-12. Białko to zbudowane jest z 525 aminokwasów, z których 214 stanowi część zewnątrzkomórkową, oddzieloną od 286-aminokwasowej części wewnątrzkomórkowej, 25-aminokwasowym regionem transbłonowym [26].

Zewnątrzkomórkowa część łańcucha β należy do nadrodziny receptorów cytokinowych, zawiera cztery charakterystyczne, stałe reszty cysteinowe i sekwencję WSXWS (literowy skrót aminokwasów). Wewnątrzkomórkowa domena zawiera względnie dużo reszt prolinowych i regionów bogatych w serynę.

1.3.3. Budowa łańcucha γ

Wspólny dla IL-15, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 i IL-13 łańcuch γ to 64 kDa glikoproteina zbudowana z 347 aminokwasów, w tym 232-aminokwasowej domeny zewnątrzkomórkowej, 29-aminokwasowej transbłonowej i 64-aminokwasowej wewnątrzkomórkowej. Kodowana jest przez pojedynczy gen zlokalizowany na chromosomie Xq13 i powstaje z 369-aminokwasowego prekursora. Zewnątrzkomórkowa domena łańcucha γ zawiera charakterystyczną sekwencję WSXWS i cztery stałe reszty cysteinowe, co pozwala zaliczyć ją do nadrodziny receptorów cytokinowych [26].

2. PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU PRZEZ RECEPTOR DLA IL-15

Cytokiny i czynniki wzrostu, które łączą się z receptorami rodziny receptorów hematopoetynowych (cytokinowych) mają zdolność fosforylacji kinaz JAK (ang.

Janus kinases) i czynników transkrypcyjnych STAT (ang. *signal transducers and activators of transcription*). Należy do nich również IL-15.

W aktywowanych limfocytach T JAK3 i JAK1 są funkcjonalnie związane z receptorami zawierającymi γ . Łańcuch β związany jest natomiast z kinazami JAK1 i lck [44]. Przekazanie sygnału przez IL-15R w limfocytach T prowadzi do fosforylacji tyrozyn i translokacji kinaz STAT3 i STAT5 z cytoplazmy do jądra komórkowego. Obejmuje też fosforylację, należących do rodziny *src*, cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych p56^{lck} i p72^{syk} i stymulację kinazowej drogi Ras/Raf/MAP, co prowadzi do aktywacji Fos/Jun [44]. Droga przekazu w komórkach tucznych obejmuje fosforylację JAK2 i STAT5. Nie ma jednak dowodów na bezpośrednie wiązanie się IL-15RX (IL-15R α) z JAK2. Dlatego też sugeruje się występowanie receptora towarzyszącego, oddziałującego z JAK2. Kandydatami są tu fosforylujące kinazę JAK 2, zawierające łańcuch β c receptory IL-3/5/GM-CSF oraz receptor dla erytropoetyny [45].

3. KOMÓRKI PRODUKUJĄCE IL-15

IL-15 produkowana jest przez wiele komórek organizmu zarówno należących do układu immunologicznego, jak i do innych układów. mRNA dla IL-15 znaleziono m.in. w łożysku, nerce, sercu, śledzionie, płucach oraz monocytach, makrofagach i naskórkowych komórkach Langerhansa [21]. Jednym z głównych źródeł IL-15 wydają się jednak być makrofagi. Zwiększenie transkrypcji genu dla IL-15 w makrofagach następuje pod wpływem stymulacji lipopolisacharydem i niektórymi cytokinami, np IFN- γ (interferon- γ) [16]. Do transkrypcji genu IL-15 w makrofagach stymulowanych lipopolisacharydem niezbędne są fragmenty zawierające sekwencje wiążące: czynnik transkrypcyjny NF- κ B (pozycja od 564 do 252) oraz znajdujący się w końcu 5' fragment wiążący czynnik transkrypcyjny SP-1 – GC box. Cytokiny, takie jak: IL-4, IL-13, TGF β (ang. *transforming growth factor*) hamują syntezę IL-15 przez pobudzone IFN- γ i BCG (*Bacille Calmette Guerin*) makrofagi [16]. Natomiast działając na komórki dendrytyczne IL-4 wraz z GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) powoduje zwiększenie mRNA dla IL-15 [23]. Zdolność zwiększania produkcji IL-15 przez makrofagi pobudzone IFN- γ i BCG ma IL-10 [16]. Jest to o tyle nieoczekiwane, że IL-10 należy wraz z IL-4 do cytokin typu Th2, pobudzających odpowiedź typu humoralnego. Ekspresja genu kodującego IL-15 wzrasta również w makrofagach stymulowanych IFN- γ , zainfekowanych *Salmonella cholerae suis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* oraz wirusem opryszczki typu 6 (*human herpes virus HHV-6*) [39].

4. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE IL-15

4.1. Wpływ na komórki NK

IL-15 podobnie do IL-2, spełnia kluczową rolę w dojrzewaniu komórek NK [36]. W zaledwie pikomolarnych stężeniach IL-15 komórki te mogą przeżyć nawet do 8 dni w nieobecności surowicy [13,15]. Cytokina ta pobudza proliferację [49], jak również umożliwia różnicowanie i ekspansję komórek NK CD56⁺ z komórek progenitorowych CD34⁺ [14,28]. IL-15 nasila również adhezję komórek NK do śródbłonna naczyń i podobnie do IL-2, IL-12, IL-8, TNF- α (ang. *tumor necrosis factor* α), MCP-1(ang. *monocyte chemotactic protein*), MCP-3, MIP1- α (ang. *macrophage inflammatory protein*) indukuje aktywne przemieszczanie się spoczynkowych komórek NK [2]. Ilość IL-15 produkowana przez pobudzone monocyty jest wystarczająca do aktywacji komórek NK i do produkowania przez nie IFN- γ [15].

4.2. Wpływ na limfocyty T

IL-15 aktywuje zarówno CD4⁺, jak i CD8⁺ limfocyty pamięci, jak i dziewicze limfocyty CD8⁺, czego dowodem jest pojawianie się na powierzchni tych komórek markerów aktywacji, takich jak: CD69, CD30, TNFR1 i CD40L [25].

IL-15 jest również czynnikiem chemokinetycznym i chemotaktycznym (zwiększa zarówno przypadkową, jak i ukierunkowaną migrację) limfocytów T [51]. Ma ona zdolność indukowania formowania uropodiów na limfoblastach przylegających do fibronektyny oraz cząsteczek immunoglobulinopodobnych VCAM-1 i ICAM-1 [38]. Do uropodiów przemieszczana jest następnie cząsteczka ICAM-3 oraz w znacznie mniejszym stopniu, inne cząsteczki adhezyjne, jak np. ICAM-1, ICAM-2, CD43, CD44. IL-15 powoduje również zwiększenie ekspresji łańcucha α receptora dla IL-2 na ludzkich limfocytach T oraz zmniejszenie ekspresji łańcucha α receptora dla IL-15 na aktywowanych fitohemaglutyniną (PHA) limfocytach T krwi obwodowej [28,40]. Stymuluje też proliferację jelitowych, śródnabłonkowych limfocytów T $\gamma\delta$ u myszy, jak również chroni je przed apoptozą, zwiększając ekspresję Bcl-2 [22]. Proliferacja limfocytów T $\gamma\delta$ stymulowana jest również w przebiegu salmonellozy [39]. IL-15 stymuluje też wzrost naskórkowych T $\gamma\delta$ [17]. Wpływa także na produkcję, przez limfocyty T, cytokin: znacznie wzmacnia wydzielanie IFN- γ , TNF- α oraz IL-10 [27,35].

4.3. Wpływ na limfocyty B

Interleukina 15 silnie pobudza pierwotną, antygenowo swoistą odpowiedź limfocytów B *in vitro*. Wynika to między innymi z pobudzenia proliferacji i różnicowania tych komórek [6]. Pod tym względem dorównuje interleukinie 2. IL-15 indukuje

wydzielanie IgM, IgG, IgA, lecz nie IgG₄ i IgE przez pobudzone limfocyty B [6].

4.4. Wpływ na monocyty i makrofagi

Ludzkie monocyty zaczynają produkcję IL-15 już 5 godzin po aktywacji lipopolisacharydem [3]. Komórki te wykazują konstytutywną ekspresję genów kodujących łańcuchy β i γ receptora dla IL-2 oraz kinazę tyrozynową JAK3, uczestniczącą w przekazywaniu sygnału w odpowiedzi na IL-15 [16]. Ekspresję receptora dla IL-15 na makrofagach zwiększa najsilniejszy ich endogenny aktywator – IFN- γ . Warto zauważyć, że wydzielana przez makrofagi IL-15 jest również autokrynowym czynnikiem pobudzającym te komórki. Synergistycznie z IFN- γ indukuje ona wydzielanie przez nie chemokin, takich jak: MCP-1 oraz IL-8 [7].

W dużych dawkach IL-15 wzmacnia produkcję przez makrofagi cytokin prozapalnych, takich jak: TNF, IL-1, IL-6 oraz cytokin o właściwościach hamujących odpowiedź komórkową, na przykład interleukiny 10. W małych, pikomolarnych dawkach, IL-15 selektywnie hamuje produkcję cytokin prozapalnych, ale nie wpływa na produkcję IL-10 [3].

4.5. Wpływ na komórki tuczne

IL-15 wydaje się spełniać równie ważną co IL-3 i czynnik wzrostu komórek tucznych (MCGF, SCF, c-kitL) rolę w stymulowaniu różnicowania i dojrzewania komórek tucznych. IL-15 może również aktywować i pobudzać do proliferacji spoczynkowe mastocyty. Odpowiedzialna jest także za patologiczny rozrost tych komórek, prowadząc do mastocytozy [45].

4.6. Wpływ na granulocyty obojętnochłonne

IL-15 aktywuje granulocyty obojętnochłonne oraz nasila ich zdolności fagocytarne [19]. Opóźnia apoptozę efektywniej od IL-2, a w wysokich stężeniach aktywuje te komórki równie efektywnie jak GM-CSF.

4.7. Wpływ na komórki śródbłonka

Komórki śródbłonka mają na swojej powierzchni wszystkie trzy podjednostki receptora dla IL-15. Działając na komórki śródbłonka IL-15 indukuje szybką fosforylację reszt tyrozynowych wielu białek (w tym fosforylację kinaz JAK1/JAK3, STAT3/STAT5), co sugeruje, że komórki śródbłonkowe odpowiadają bezpośrednio na IL-15 [5]. IL-15 pobudza również angiogenezę, jednak najprawdopodobniej nie jest to związane z bezpośrednią stymulacją komórek śródbłonka [5].

5. ROLA IL-15 W PATOGENEZIE CHORÓB

5.1. Sarkoidoza płuc

IL-15, podobnie do IL-2 i TNF α powoduje lokalną ekspansję limfocytów T CD4⁺ w płucach, co prowadzi do wzmożenia procesu zapalnego i formowania ziarniniaków [1]. Wysoki poziom IL-15 wykazano również w makrofagach płucnych, pochodzących od pacjentów z aktywną sarkoidozą [1].

5.2. Eozynofilowe zapalenie płuc

Lokalna produkcja IL-15 może być również istotna w eozynofilowym zapaleniu płuc, głównie poprzez indukowanie syntezy IL-5 przez limfocyty T (IL-15 stymuluje transkrypcję genów i syntezę białka ludzkiej IL-5) [35]. Indukowana przez IL-15 produkcja IL-5 może być całkowicie zablokowana przez inhibitor kinazy tyrozynowej – herbimycynę A [35].

5.3. Reumatoidalne zapalenie stawów

IL-15 odgrywa ważną rolę w reumatoidalnym zapaleniu stawów, indukując syntezę TNF- α w limfocytach T [33,34]. Podanie rozpuszczalnej formy łańcucha α IL-15R hamuje rozwój kolagenowego zapalenia stawów, będącego zwierzęcym modelem reumatoidalnego zapalenia stawów, aktywację limfocytów Th1 oraz przeciwkolagenową odpowiedź humoralną [43].

5.4. Zakażenia wirusowe

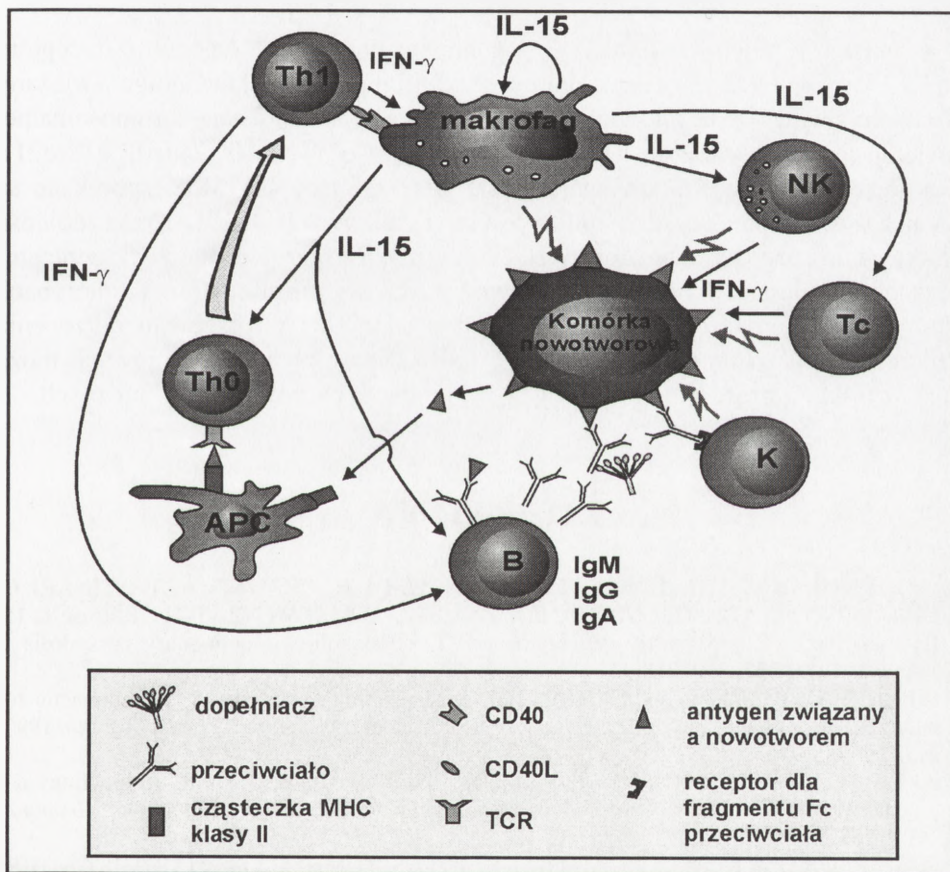
Dzięki zdolności indukowania aktywności cytotoksycznych limfocytów T i komórek NK, IL-15 może być wykorzystana jako adjuwant w szczepionce, stymulującej funkcję tych komórek w przewlekłych zakażeniach wirusowych. Prawdopodobnie interleukina 15 zwiększa liczbę krążących limfocytów CD4⁺, jednocześnie nie aktywując ich, a co za tym idzie nie zwiększając replikacji wirusa HIV [24]. Właściwość tę być może będzie można wykorzystać w leczeniu chorych zainfekowanych tym wirusem.

5.5. Choroby nowotworowe

Ze względu na działanie na komórki układu odpornościowego IL-15 jest potencjalnym kandydatem do wykorzystania w immunoterapii nowotworów. Dotychczasowe badania wykazały, iż stosowanie jej po terapii cyklofosfamidem znacznie wydłuża okres remisji, najprawdopodobniej przez wzmocnienie przeciwnowotworowego działania tego leku [18].

Kombinacja IL-15 z takimi lekami, jak: 5-fluorouracyl i irinotekan [11,12] powoduje znaczne zmniejszenie działań ubocznych chemioterapii, takich jak biegunka i zapalenie błony śluzowej żołądka. Oprócz zmniejszenia toksyczności, IL-15 wzmacnia również aktywność przeciwnowotworową chemioterapeutyków [11,12]. Zmniejszenie toksyczności chemioterapeutyków wynika najprawdopodobniej z bezpośredniego wpływu IL-15 na komórki nabłonkowe błon śluzowych przewodu pokarmowego. Receptory dla IL-15 znaleziono na powierzchni komórek Caco-2 [42], wywodzących się ze śluzówki ludzkiego jelita oraz na powierzchni szczurzych komórek IEC-18, pochodzących z krypt jelitowych [12].

IL-15, podobnie do IL-2 i IL-12, indukuje ekspresję mRNA dla perforyny w komórkach NK i w CD8⁺ limfocytach T pochodzących od pacjentów z nowotworami. Zwiększa również aktywność komórek LAK przeciwko komórkom nowotworowym



RYSUNEK 1. Wpływ IL-15 na mechanizmy efektorowe odpowiedzi przeciwnowotworowej; IL-15 (w tym wypadku produkowana przez makrofagi) działa na szereg populacji komórek układu odpornościowego. Pobudza proliferację i cytotoxiczność limfocytów T i komórek NK, wpływa na różnicowanie limfocytów T pomocniczych w kierunku Th1, pobudza wydzielanie niektórych klas przeciwciał i stymuluje komórki do wydzielania IFN-γ

pochodzącym od pacjentów z czerniakiem. Zwiększa również wydzielanie niektórych cytokin, w tym IFN- γ i TNF- α , które mają bezpośredni wpływ cytotoksyczny/cytostatyczny wobec komórek nowotworowych, aktywują makrofagi i zwiększają ekspresję cząsteczek MHC (rys. 1).

Z zastosowaniem IL-15 w terapii nowotworów u ludzi wiążą się również pewne niebezpieczeństwa. Wiele typów komórek nowotworowych może produkować IL-15, która jest dla nich auto- i parakrynowym czynnikiem wzrostu. Zjawisko takie zaobserwowano między innymi w wypadku czerniaków [9], mięsaków Ewinga, mięsaków wywodzących się z mięśni poprzecznie prążkowanych, kostniakomięsaków [30], raków drobnokomórkowych płuc [32] oraz, jak już wspomniano, wielu białaczek i chłoniaków [48].

5.6. Choroby uwarunkowane genetycznie a IL-15

Z mutacją regionu zawierającego locus genu kodującego łańcuch α receptora dla IL-15 związanych jest szereg chorób, między innymi zespół DiGeorga, związany z brakiem grasicy i gruczołów przytarczycznych [4]. Translokacje chromosomalne, zawierające dystalny region 10p: t(10;11) (p14;q14-q21) i t(10;17) (p13;q12-q21), obejmujący locus, w którym znajduje się gen kodujący IL-15R α , spotykane są również w ostrych białaczkach limfocytowych i szpikowych [48]. IL-15 ma zdolność indukowania rozpuszczalnej formy IL-2R α (sIL-2R α), którego podwyższone stężenia obserwuje się w białaczkach wywodzących się z limfocytów T, chorobach autoimmunizacyjnych, AIDS, stwardnieniu rozsianym i w przebiegu odrzucenia przeszczepu [47]. Pomiar stężenia IL-15 i sIL-2R α w płynach ustrojowych może mieć wysoką wartość diagnostyczną w wymienionych zespołach klinicznych.

LITERATURA

- [1] AGOSTINI C, TRETIN L, FACCO M., SANCETTA R, CERUTTI A, TASSINARI C, CIMAROSTO L, ADAMI F, CIPRIANI A, ZAMBELLO R, SEMENZATO G. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis *J Immunol* 1996; **157**: 910–918.
- [2] ALLAVENA P, GIARDINA G, BIANCHI G, MANTOVANI A. IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. *J Leukocyte Biol* 1997; **61**: 729–735.
- [3] ALLEVA DG, KASER SB, MONROY MA, FENTON MJ, BELLER DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production. *J Immunol* 1997; **159**: 2941–2951.
- [4] ANDERSON DM, KUMAKI S, AHDIEH, BERTLES, TOMETSKO M., LOOMIST A, GIRI J, COPELAND NG, GILBERT DJ, JENKINS NA, VALENTINE V, SHAPIRO DN, MORRIS SW, PARK LS, COSMAN D Functional characterization of the human IL-15 receptor α chain and close linkage of *IL15RA* and *IL2RA* genes. *J Biol Chem* 1995, **270**: 29862–29869.

- [5] ANGIOLILLO AL., KANEGANE H, SGADARI C, REAMAN GH, TOSATO G. IL-15 promotes angiogenesis *in vivo*. *Biochem Bioph Res Co* 1997; **233**: 231–237.
- [6] ARMITAGE RJ, MACDUFF BM, EISENMAN J, PAXTON R, GRABSTEIN KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol* 1995; **154**: 483–490.
- [7] BADOLATO R, PONZI AN, MILLESIMO M., NOTARANGELO LD, MUSSO T. IL-15 induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. *Blood* 1997; **7**: 2804–2809.
- [8] BAMFORD RN, BATTIATA AP, WALDEMANN TA. IL-15: the role of translational regulation in their expression. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 476–480.
- [9] BARZEGAR C, MEAZZA R, PERENO R, POTTIN-CLEMENCEAU C, SCUDELETTI M., BROUTY-BOYE D, DOUCER CH, TAOUFIK Y, RITZ J, MUSSELLI C, MISHAL Z, JASMIN C, INDIVERI F, FERRINI S, AZZARONE B. IL-15 is produced by a subset of human melanoma, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene* 1998; **16**: 2503–2512.
- [10] BURTON JD, BAMFORD RN, PETERS C, GRANT AJ, KURYS G, GOLDMAN CK, BRENNAN J, ROESSLER E, WALDMANN TA. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4940–4944.
- [11] CAO S, BLACK DJ, TROUTT BA, RUSTRUM YM. IL-15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model. *Cancer Res* 1998; **58**: 3270–3274.
- [12] CAO S, TROUTT AB, RUSTRUM MY. IL-15 protects against toxicity and potentiates antitumor activity of 5-Fluorouracil alone and in combination with Leucovorin in rats bearing colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 1695–1699.
- [13] CARSON WE, FEHNIGER TA, HALDAR S, ECKHERT K, LINDEMANN MJ, LAI CHF, CROCE CM, BAUMANN H, CALIGIURI MA. A potential role for IL-15 in the regulation of human NK cell survival. *J Clin Invest* 1997; **99**: 937–943.
- [14] CARSON WE, GIRI JG, LINDERMENN MJ, LINETT ML, AHDIEH M., PAXTON R, ANDERSON D, EISENMANN J, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. IL-15 is a novel cytokine that activates human NK cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 1994; **180**: 1395–1403.
- [15] CARSON WE, ROSS ME, BAICICHI RA, MARIEN MJ, BOIANI N, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. Endogenous production of IL-15 by activated human monocytes is critical for optimal production of INF γ by NK cells *in vitro*. *J Clin Invest* 1995; **96**: 2578–2582.
- [16] DOHERTY TM, SEDER RA, SHER A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* 1996; **156**: 735–741.
- [17] EDELBAUM D, MOHAMADZADEH M., BERGSTRESSER PR, SUGAMURA K, TAKASHIMA A. IL-15 promotes the growth of murine epidermal $\gamma\delta$ T cells by a mechanism involving the β and γ_c chain of the IL-2 receptor. *J Invest Dermatol* 1995; **105**: 837–843.
- [18] EVANS R, FULLER JA, CHRISTIANSON G, KRIPKE DM, TROUTT B. IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor-bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: the potential role of NK cell subpopulations. *Cell Immunol* 1997; **179**: 66–73.
- [19] GIRARD D, PAQUET ME, PAQUIN R, BEAULIEU AD. Differential effects of IL-15 and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15 *Blood* 1996; **8**: 3176–3184.
- [20] GIRI GJ, KUMAKI S, AHDIEH M., FRIEND DJ, LOOMIS A, SHANEBECK K, DUBOSE R, COSMAN D, PARK LS, ANDERSON DM. Identification and cloning of a novel IL-15

- binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995; **15**: 3654–3663.
- [21] GRABSTEIN KH, EISENMAN J, SHANEBECK K, RAUCH CH, SRINIVASAN S, FUNG V, BEERS C, RICHARDSON J, SCHOENBORN MA, AHDIEH M., JOHNSON L, ALDERSON MR, WATSON JD, ANDERSON DM, GIRI JG. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the IL-2R. *Science* 1994; **264**: 965–968.
- [22] INAGAKI-OHARA K, NISHIMURA H, MITANI A, YOSHIKAI Y. IL-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2885–2891.
- [23] JONULEIT H, WIEDEMANN K, MULLER G, DEGWERT J, HOPPE U, KNOP J, ENK AH. Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells. *J Immunol* 1997; **158**: 2610–2615.
- [24] KANAI T, THOMAS EK, YASUHIRO Y, LETVIN NL. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J Immunol* 1996; **157**: 3681–3687
- [25] KANEGANE H, TOSATO G. Activation of naive and memory T cells by IL-15. *Blood* 1996; **1**: 230–235.
- [26] KENNEDY MK, PARK LS. Characterization of IL-15 and the IL-15 receptor complex. *J Clin Immunol* 1996; **16**: 134–143.
- [27] KORHOLZ D, BANNING U, BONIG H, GREWE M., SCHNEIDER M., KORHOLZ-MAUCH CH, VEHNE-KLEIN A, KRUTMANN J, BURDACH S. The role of IL-10 in IL-15 mediated T-cell responses *Blood* 1997; **90**: 4513–4521.
- [28] KUMAKI S, ARMITAGE R, AHDICH M., PARK L, COSMAN D. IL-15 up-regulates IL-2 receptor α chain but down-regulates its own high-affinity binding sites on human T and B cells. *Eur J Immunol*. 1996; **26**: 1235–1239.
- [29] LECLERCQ G, DEBACKER V, DE SMEDT M., PLUM J. Differential effects of IL-15 and IL-2 on differentiation of bipotential T/NK progenitor cells. *J Exp Med* 1996; **184**: 325–336.
- [30] LOLLINI P-L, PALMIERI G, DE GIOVANNI C, LANDUZZI L, NICOLETTI G, ROSSI I, GRIFFONI C, FRABETTIF, SCOTLANDI K, BENINI S, BALDINI N, SANTONI A, NANNI P. Expression of IL-15 in human rhabdomyosarcoma, osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 1997; **71**: 732–736.
- [31] MEAZA R, GAGGERO A, NEGLIA F, BASSO S, SFORZINI S, PERENO R, AZZARONE B, FERRINI S. Expression of two IL-15 mRNA isoforms in human tumors does not correlate with secretion: role of different signal peptides. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 1049–1054.
- [32] MEAZZA R, VERDIANI S, BIASSONI R, COPPOLECCHIA M., GAGGERO A, ORENGO AM, COLOMBO MP, AZZARONE B, FERRINI S. Identification of a novel IL-15 transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene* 1996; **12**: 2187–2192.
- [33] MCINNES IB, AL-MUGHLES J, FIELD M., LEUNG BP, HUANG FP, DIXON R, STURROCK RD, WILKINSON PC, LIEW FY. The role of IL-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996; **2**: 175–182.
- [34] MCINNES IB, LIEW FY. IL-15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today* 1998; **2**: 75–79.
- [35] MORI A, SUKO M., KAMINUMA O, INOUE S, OHMURA T, NISHIZAKI Y, NAGAHORI T, ASAKURA Y, HOSHINO A, OKOMURA Y, SATO G, ITO K, OKUDAIRA H. IL-15 promotes cytokine production of human T helper cells. *J Immunol* 1996; **156**: 2400–2405.
- [36] MRÓZEK E, ANDERSON P., CALIGIURI MA. Role of IL-15 in the development of human CD56⁺ NK cells from CD34⁺ hemetopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; **7**: 2632–2640.
- [37] NGUYEN QH, ROBERTS RL, ANK BJ, LIN SJ, THOMASEK, STIEHMRE. IL-15 enhances ADCC and NK activity in neonatal cells. *Cell Immunol* 1998; **185**: 83–92.
- [38] NIETO M., DEL POZO MA, SANCHEZ-MADRID F. IL-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 1302–1307.

- [39] NISHIMURA H, HIROMATSU K, KOBAYASHI N, GRABSTEIN KH, PAXTON R, SUGAMURA K, BLUESTONE JA, YOSHIKAI Y. IL-15 is a novel growth factor for murine $\gamma\delta$ T cells induced by Salmonella infection. *J Immunol* 1996; **156**: 663–669.
- [40] OHARA-INAGAKI K, NISHIMURA H, MITANI A, YOSHIKAI Y. IL-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor in mice. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 2885–2891.
- [41] ONU A, POHL T, KRAUSE H, BULFONE-PAUS S. Regulation of IL-15 secretion via leader peptide of two IL-15 isoforms *J Immunol* 1997; **158**: 255–262.
- [42] REINECKER H-C, MACDERMOTT RP, MIRAU S, DIGNASS A, PODOLSKY DK. Intestinal epithelial cells both express and respond to interleukin 15. *Gastroenterology* 1996; **111**: 1706–1713.
- [43] RUCHARTZ H, LEUNG BP, XIAO-QING W, MCINNES IB, LIEW FY. Soluble IL-15 receptor α chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: A role for IL-15 in development of antigen-induced immunopathology. *J Immunol* 1998; **160**: 5654–5660.
- [44] TAGAYA Y, BAMFORD RN, DEFILIPPIS AP, WALDMANN TA. IL-15: A pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996; **4**: 329–336.
- [45] TAGAYA Y, BURTON JD, MIYAMOTO Y, WALDMANN TA. Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells. *EMBO J* 1996; **18**: 4928–4939.
- [46] TAGAYA Y, KURYS G, THIES TA, LOSI JM, AZIMI N, HANOVER JA, BAMFORD RN, WALDMANN TA. Generation of secretable and nonsecretable IL-15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14444–14449.
- [47] TREIBER-HELD S, STEWART DM, BARRACLOUGH HA, KURMAN CC, NELSON DL. Release of sIL-2R α from and activation of native human peripheral blood mononuclear cells by recombinant IL-15. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **80**: 67–75.
- [48] TRETIN L, CERUTTI A, ZAMBELLO R, SANCETTA R, TASSINARI C, FACCO M., ADAMI F, RODEGHIERO F, AGOSTINI C, SEMENZATO G. IL-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood* 1996; **8**: 3327–3335.
- [49] WARREN HS, KINNEAR BF, KASTELEIN RL, LANIER LL. Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56^{dim}) human NK cells. *J Immunol* 1996; **156**: 3254–3259.
- [50] WASHIZU J, NISHIMURA H, NAKAMURA N, NIMURA Y, YOSHIKAI Y. The NF- κ B binding site is essential for transcriptional activation of the IL-15 gene. *Immunogenetics* 1998; **48**: 1–7.
- [51] WILKINSON PS, LIEW FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by IL-15. *J Exp Med* 1995; **181**: 1255–1259.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 10.04 1999 r.

Przyjęto: 30.06. 1999 r.

Adres autora: Katedra Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej AM
ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa

KOMUNIKATY

Fundusz stypendialny

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej uprzejmie informuje o założeniu Funduszu Stypendialnego. Celem Funduszu jest zgromadzenie odpowiedniej sumy pieniędzy, od której procent bankowy powinien zapewnić przynajmniej jedno stypendium rocznie. Stypendium będzie przyznawane przez Komisję Fundacji, która bliżej określi warunki starania się o stypendium. Obecnie zostało założone subkonto Fundacji, na które można przekazywać darowizny pieniężne, które potem można odpisać od podatku. Fundacja będzie publikować raz w roku nazwiska ofiarodawców oraz ogólną sumę otrzymanych darowizn, aby można było zorientować się na bieżąco w możliwościach Funduszu.

Konto: Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
Bank Polska Kasa Opieki S. A. IV o/ Warszawa
No 12401053-40006576-2700-401112-002

Podstawą odpisu są:

Ustawa z dnia 26 lipca 1991 r. o podatku dochodowym od osób fizycznych (my wszyscy)

– Art. 26.1. Podstawę obliczenia podatku, z zastrzeżeniem art. 24 ust. 3 i art. 28–30 stanowi dochód ustalony zgodnie z art. 9, art. 24 ust. 1 i 2 oraz art. 25 po odliczeniu kwot: (–)

9) *darowizn:*

a) *na cele naukowe*, naukowo-techniczne, oświatowe, oświatowo-wychowawcze, kulturalne, kultury fizycznej i sportu, ochrony zdrowia i pomocy społecznej, rehabilitacji zawodowej i społecznej inwalidów, a także wspierania inicjatyw społecznych w zakresie budowy dróg i sieci telekomunikacyjnej na wsi oraz zaopatrzenia wsi w wodę – *łącznie do wysokości 15% dochodu*

Ustawa z dnia 15 lutego 1992 r. o podatku dochodowym od osób pranych (spółki, związki kapitałowe i in.)

Art. 18.1 (196) Podstawę opodatkowania, z zastrzeżeniem art. 21 i 22, stanowi dochód ustalony zgodnie z art. 7 albo w art. 7a ust. 1, po odliczeniu:

1/) (197) *darowizn:*

a) (198) *na cele naukowe*, naukowo-techniczne, oświatowe, oświatowo-wychowawcze, kulturalne, kultury fizycznej i sportu, ochrony zdrowia i pomocy społecznej, rehabilitacji zawodowej i społecznej inwalidów, a także wspierania inicjatyw społecznych w zakresie budowy dróg i sieci telekomunikacyjnej na wsi oraz zaopatrzenia wsi w wodę – *łącznie do wysokości nie przekraczającej 15% dochodu*, o którym mowa w art. 7 ust. 3 albo w art. 7a ust. 1.

Poniższy przykład ma na celu przedstawienie skutków, jakie niesie darowizna 15% dochodu na cele naukowe. Jest to oczywiście maksimum, a liczy się każda złotówka.

Przykład:

Jeżeli dla uproszczenia rachunku przyjmiemy, że dana osoba zarabia 1000 zł miesięcznie, czyli 12 000 zł rocznie, to może odliczyć maksymalnie w roku 15% tej sumy, czyli 1 800 zł.

W roku 1998 podatek od zarobków do 25 252 zł rocznie wynosił 19% – 336,60 zł; 19% od 12 000 zł stanowi $2280 - 336,60 = 1\,943,40$ zł; taki podatek trzeba zapłacić.

Jeżeli darowano 1 800 zł, dochód był mniejszy o tę sumę, czyli wynosił $12\,000 - 1\,800 = 10\,200$ zł, podatek od tej sumy wynosi $1\,601,40$ zł.

Dając więc 1 800 zł na cele naukowe obniża się podatek o $1\,943,40 - 1\,601,40 = 342$ zł; pozostała suma, czyli $1\,800 - 342 = 1\,458$ zł jest darowizną, której „odzyskać” z podatku nie można.

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń 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.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

| j. polski | | j. angielski |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------|
| Podstawy zagadnienia: | jedno zdanie | Background: |
| Podtytuły: | do każdego podtytułu 3–5 zdań | Subtitles: |
| Wnioski: | 2 zdania | Conclusions: |
| Słowa kluczowe: | do 8 słów | Key words: |

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

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.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata na rok 2000

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2000 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

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 2000:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 68 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 25 zł.

Jeżeli prenumerata rocznika „Postępy” zostanie opłacona do 31 grudnia 1999 r., cena wyniesie jak dotąd: 60 zł dla instytucji i 20 zł dla osób prywatnych, po 1 stycznia 2000 r. obowiązuje nowa cena podana wyżej.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1999 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;

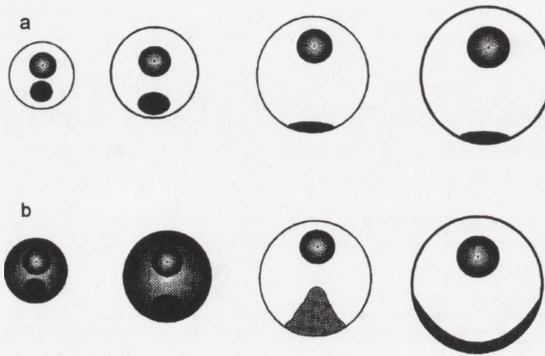
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.

ERRATA

do pracy: *M. Ogielska – Informacja matczyna w oocytach płazów. Post Biol Kom 1999; Supplement 12: (69–72).*

Na str. 71 na rys. 1 nie umieszczono oznaczeń a i b, które są omawiane w podpisie. Rysunek powinien wyglądać następująco:



Ponadto w tekście na s. 70 w wierszach 6,7,8 od dołu i w podpisie pod rysunkiem 1 podano skrót w brzmieniu *Vgl* zamiast *Vgl*, za co Autorkę i Czytelników serdecznie przepraszamy.

TREŚĆ – CONTENTS

NR 1

| | |
|--|-----|
| W tym Zeszycie | 1 |
| Od Redakcji | 2 |
| KOWALCZYK S., JAKUBOWSKA A.: Receptory etylenu, cytokinin i brasinosteroidów – transmembranowymi kinazami białkowymi? Ethylene, cytokinin and brassinosteroids receptors – Are they transmembrane protein kinases? | 3 |
| FABCZAK H., WALERCZYK M., FABCZAK S.: Regulacja ruchu rzęsek i wici w komórkach eukariotycznych przez wapń i cykliczne nukleotydy Calcium and cyclic nucleotides control of ciliary and flagellar activity in eukaryotic cells | 33 |
| MAJEWSKA B.: Jak powstaje przedziałowość neuronu, czyli o transporcie wewnątrzkomór- kowym Basis of neuronal compartmentation. Intracellular transport | 45 |
| KWIATKOWSKA K., SOBOTA A.: Przekazywanie sygnału fagocytarnego: Od agregacji receptorów do przebudowy cytoszkieletu Signal transduction during phagocytosis: From receptor clustering to cytoskeleton reorganization | 59 |
| KUCHANOWICZ A., SAKOWICZ T.: Mechanizmy determinacji płci u roślin Mechanisms of sex determination in plants | 83 |
| WOŁOWIEC D.: p21 ^{WAF1/CIP1} : Rola w fizjologii komórki i w rozrostach nowotworowych p21 ^{WAF1/CIP1} : Role in cell physiology and in malignancies | 101 |
| RUPNIEWSKA Z.M., ROLIŃSKI J., DMOSZYŃSKA M.: Pochodzenie komórek B CD5 dodatnich Origin of CD5 ⁺ B cells | 119 |
| MARSZAŁEK M. T.: Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część I Stem cells in liver and pancreas of animals and humans. Part I | 135 |
| MARSZAŁEK M. T.: Komórki macierzyste wątroby i trzustki u zwierząt i człowieka. Część II Stem cells in liver and pancreas of animals and humans. Part II | 159 |
| PAŚNIK J., BUKOWSKI P., PIETRUSZYŃSKI R.: Rola niektórych receptorów i szlaków transdukcji sygnału w preaktywacji neutrofila przez TNF- α Role of some receptors and signal transduction ways in TNF- α -priming of neutrophil | 181 |
| ZIAJA M.: Pochodzenie mikrogleju Origin of microglia | 201 |
| Komunikaty | 214 |
| Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK i warunki prenumeraty | 216 |

NR 2

| | |
|--|-----|
| W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki | 217 |
| WÓJCIK C., GOŁĄB J.: Od dynamitu do Viagry, czyli rzecz o Nagrodzie Nobla z medycyny i fizjologii w 1998 roku | |
| From dynamite to Viagra – 1998 Nobel Prize in medicine and physiology | 219 |
| TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mechanizmy kwitnienia roślin. I. Uwarunkowania fizjologiczno-środowiskowe | |
| Regulation of flowering in plants. I. Physiological and environmental implications | 231 |
| TRETYN A., KOPCEWICZ J.: Mechanizmy kwitnienia roślin. II. Genetyczna i molekularna kontrola indukcji kwitnienia | |
| Regulation of flowering in plants. II. Genetic and molecular control of flower induction | 249 |
| JAKUBOWICZ-GIL J., GAWRON A.: Rozmieszczenie i rola białek szoku termicznego w komórce zwierzęcej | |
| Localization and function of heat shock proteins in the animal cell | 267 |
| JANIAK M. K., WREMBEL-WARGOCKA J., CHEDA A.: Apoptoza popromienna – Mechanizmy, rola biologiczna i możliwości wykorzystania w terapii nowotworów | |
| Radiation-induced apoptosis: Mechanisms biological relevance and potential application to radiotherapy of cancer | 285 |
| ZIMOWSKI J. G.: Rdzeniowy zanik mięśni – Podłoże molekularne choroby | |
| Spinal muscular atrophy – Molecular background of the disease | 311 |
| SAMARDAKIEWICZ S., WOŹNY A.: Metody wykrywania ołowiu w komórkach roślinnych | |
| The methods of the lead detection in the plant cells | 325 |
| TRETYN A., WIŚNIEWSKA J.: Budowa, właściwości i mechanizm działania kryptochromów – eukariotycznych fotoreceptorów światła niebieskiego | |
| Structure, properties and mechanism of action of the cryptochromes – The blue-light photoreceptors of <i>Eukaryota</i> | 343 |
| LACHOWICZ L., PODKUL T., ŻYLIŃSKA L.: Struktura i funkcje receptora GABA _A | |
| Structure and functions of GABA _A -receptor | 359 |
| SZABLEWSKI L.: Leptyna i jej rola w regulacji masy ciała | |
| Leptin and its role in the regulation of body weight | 375 |
| SZABLEWSKI L.: Rola białek Glut w dyfuzji glukozy do komórek ssaczyh. II. Wpływ insuliny na aktywność Glut 1 i Glut 4 | |
| Role of Glut proteins in glucose transport into mammalian cells. II. The effect of insulin on activity of Glut 1 and Glut 4 | 387 |
| SOBKOWIAK A., TRZECIAK W. H.: Budowa i funkcja receptora folitropiny | |
| Structure and function of follitropin receptor | 401 |
| SZPUNAR G., WAWROCKA-PAWLAK M., DĄBROWSKI R.: Rola komórki tucznej w organizmie człowieka | |
| The role of the mast cell in human body | 427 |
| Recenzja | 437 |
| Sprawozdanie | 439 |
| Komunikaty | 442 |
| Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK oraz warunki prenumeraty | 444 |

NR 3

| | |
|--|-----|
| W tym Zeszycie | 445 |
| MARSZAŁEK A., BŁOTNA-FILIPIAK M., WITT M., BICZYSKO W.: Zespół Kartagenera jako zespół nieruchomych rzęsek – Przegląd wiadomości | |
| The Kartagener's syndrome as an immotile cilia syndrome – An overview | 447 |
| BARTMAŃSKA J.: Rola systemu c-Kit/SCF w regulacji procesu spermatogenezy ssaków | |
| Role of the c-Kit/SCF system in regulation of mammalian spermatogenesis | 461 |
| BOBIŃSKI R., OLCZYK K., KRZYŻOWSKA-BOBIŃSKA E., JANIC W.: Syndekany – Proteoglikany transmembranowe – Syndecans – Transmembrane proteoglycans | 477 |
| LENARTOWICZ E., DĘBSKA G.: Oddziaływania jonów Zn^{2+} w zwierzęcych komórkach niepobudliwych – Action of Zn^{2+} ions in animal nonexcitable cells | 491 |
| MAŁUSZYŃSKA J.: Porównawcze badania organizacji genomu roślinnego | |
| Comparative study of plant genome organization | 507 |
| CZERPAK R., BAJGUZ A.: Aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin w adaptacji roślin do stresów | |
| Physiological and biochemical activity of polyamines in plant adaptation to stresses | 523 |
| CISZAK L., WOŁOWIEC D., KOSMACZEWSKA A., BOĆKO D., FRYDECKA I.: Białkowe inhibitory kinaz cyklicznych z rodziny p16: Budowa, właściwości biochemiczne i rola biologiczna | |
| The p16 family of the protein cyclin-dependent kinase inhibitors: Structure, biochemical properties and biological function | 539 |
| ROŻYŃKOWA D., FILIP A.: Endogenne białka przeciwdziałające apoptozie | |
| Endogenous apoptosis inhibiting proteins | 561 |
| KWIATKOWSKA D., KWIATKOWSKA-KORCZAK J.: Kwas retinowy: jego metabolizm i mechanizm działania | |
| Retinoic acid: Its metabolism and mechanism of action | 579 |
| MROZCKOWSKA J. E.: Bariera krew-mózg –The blood-brain barrier | 593 |
| ŻĄDZIŃSKI R., NOWAK J. Z.: Molekularne podstawy działania i synchronizacji okołodobowego oscylatora biologicznego | |
| Molecular bases of biological circadian oscillator activity and synchronization | 611 |
| KOSMACZEWSKA A., CISZAK L., FRYDECKA I.: Molekularne mechanizmy aktywacji limfocytów T – Przenoszenie sygnału do jądra komórkowego | |
| Molecular events during T cell activation – Signal transduction into the nucleus | 629 |
| KAMIŃSKI R., KOZAR K., GOŁĄB J.: Cyklooksigenazy, niesteroidowe leki przeciwzapalne i raki jelita grubego – Część I | |
| Cyclooxygenases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colon cancers – Part I | 651 |
| KAMIŃSKI R., KOZAR K., GOŁĄB J.: Cyklooksigenazy, niesteroidowe leki przeciwzapalne i raki jelita grubego – Część II | |
| Cyclooxygenases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colon cancers – Part II | 667 |
| Piąte Europejskie Sympozjum: <i>Calcium binding proteins in normal and transformed cells</i> | |
| Nordkirchen/Muenster, Niemcy, 30.07.–2.08.1998 r. | 685 |
| Piąte Międzynarodowe Seminarium: <i>Membrane skeleton. regulatory function in normal and abnormal cells</i> | |
| Szklarska Poręba/Wrocław, 11–13.06. 1998 r. | 691 |
| Komunikat | 695 |
| Wskazówki przygotowania rysunków i warunki prenumeraty | 6 |

NR 4

| | |
|--|-----|
| W tym Zeszycie | 701 |
| Wspomnienie o prof. dr hab. Janie Michejdzie | 703 |
| TRZECIAK A., BŁASIAK J.: Naprawa DNA w komórkach ssaków DNA repair in mammalian cells | 707 |
| CZARNOWSKA E.: Rola neutrofilów w patogenezie zapalenia niedokrwionego i reperfundowanego serca Inflammatory role of neutrophils in ischemic and reperfused heart | 731 |
| GAJDEK P.: Budowa i właściwości mikrocytyn produkowanych przez sinice, metody ich degradacji i chemicznej modyfikacji Structure and properties of microcystins produced by cyanobacteria, methods of their degradation and derivatization | 747 |
| ZIELIŃSKI T. M., WACHOWICZ B.: Chemokiny płytek krwi Chemokines of blood platelets | 759 |
| KLINK M., CEDZYŃSKI M.: Tlenek azotu jako regulator niektórych funkcji układu odpornościowego Nitric oxide as the regulator of some functions of the immune system | 775 |
| POPIELARSKA M., PRZYWARA L.: Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (<i>Angiospermae</i>): I. Zapłodnienie <i>in vitro</i> z użyciem izolowanych gamet Advances in fertilization research in Angiosperms: I. <i>In vitro</i> fertilization with isolated gametes | 793 |
| PRZYWARA L., POPIELARSKA M.: Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (<i>Angiospermae</i>): II. Biochemiczne i molekularne aspekty zapłodnienia Advances in fertilization research in Angiosperms: II. Biochemical and molecular aspects | 809 |
| SZEWCZUK A., KUROWSKA E., SZEWCZUK Z.: Receptor luliberyny (LHRH-R) – Struktura i funkcja Luliberin receptor (LHRH-R) – Structure and function | 827 |
| RUPNIEWSKA Z. M., DMOSZYŃSKA M.: Rola heterodimeru CD79 α /CD79 β i kompleksu CD19/CD21/CD81 w rozwoju i czynności receptora dla antygeny na komórce B The role of the CD79 α /CD79 β heterodimer and of the CD19/CD21/CD81 complex in the development and biologic function of B cell antigen receptor | 841 |
| BAŁKOWIEC-ISKRA E. Z., GOŁĄB J.: Interleukina 15 (IL-15) Interleukin 15 | 863 |
| Komunikaty | 877 |
| Errata | 880 |

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 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają zadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

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 przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 444) powinna być przysyłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów, i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, 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, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) 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). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in Physarium polyccephalum. 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 niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 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. 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. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także o dołączenie do maszynopisu tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

| | | | | | |
|---|------------|------------|---|------------|------------|
| Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin. | tak | nie | Treść pracy nie była uprzednio publikowana nie została wysłana do innej redakcji | tak | nie |
| Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. | tak | nie | Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM | tak | nie |
| Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane 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 "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność redakcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpisy wszystkich autorów

TREŚĆ – CONTENTS

| | |
|--|-----|
| W tym Zeszytcie | 701 |
| Wspomnienie o prof. dr hab. Janie Michejdzie | 703 |
| TRZECIAK A., BŁASIAK J.: Naprawa DNA w komórkach ssaków DNA repair in mammalian cells | 707 |
| CZARNOWSKA E.: Rola neutrofilii w patogenezie zapalenia niedokrwionego i reperfundowanego serca Inflammatory role of neutrophils in ischemic and reperfused heart | 731 |
| GAJDEK P.: Budowa i właściwości mikrocytyn produkowanych przez sinice, metody ich degradacji i chemicznej modyfikacji Structure and properties of microcystins produced by cyanobacteria, methods of their degradation and derivatization | 747 |
| ZIELIŃSKI T. M., WACHOWICZ B.: Chemokiny płytek krwi Chemokines of blood platelets | 759 |
| KLINK M., CEDZYŃSKI M.: Tlenek azotu jako regulator niektórych funkcji układu odpornościowego Nitric oxide as the regulator of some functions of the immune system | 775 |
| POPIELARSKA M., PRZYWARA L.: Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (<i>Angiospermae</i>): I. Zapłodnienie <i>in vitro</i> z użyciem izolowanych gamet Advances in fertilization research in Angiosperms: I. <i>In vitro</i> fertilization with isolated gametes | 793 |
| PRZYWARA L., POPIELARSKA M.: Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (<i>Angiospermae</i>): II. Biochemiczne i molekularne aspekty zapłodnienia Advances in fertilization research in Angiosperms: II. Biochemical and molecular aspects | 809 |
| SZEWCUK A., KUROWSKA E., SZEWCZUK Z.: Receptor luliberyny (LHRH-R) – Struktura i funkcja Luliberin receptor (LHRH-R) – Structure and function | 827 |
| RUPNIEWSKA Z. M., DMOSZYŃSKA M.: Rola heterodimeru CD79 α /CD79 β i kompleksu CD19/CD21/CD81 w rozwoju i czynności receptora dla antygeny na komórce B The role of the CD79 α /CD79 β heterodimer and of the CD19/CD21/CD81 complex in the development and biologic function of B cell antigen receptor | 841 |
| BAŁKOWIEC-ISKRA E. Z., GOŁĄB J.: Interleukina 15 (IL-15) Interleukin 15 | 863 |
| Komunikaty | 877 |
| Errata | 880 |

Indeks 369705