

PL ISSN 0324-833X

**POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE**

**TOM 10 - NR 2  
1983 (65-156)**

# **Postępy Biologii Komórki**

**PWN - WARSZAWA**

<http://rcin.org.pl>



Kwartalnik  
Polskiego Towarzystwa Anatomicznego  
wydawany z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK, Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA

Komitet Redakcyjny

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Jerzy KAWIAK,  
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,  
Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

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

---

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 528 + 92 egz. Ark. wyd. 7,25. Ark. druk. 5,75. Papier druk. sat. III zł. 80 g, 70 × 100.  
Oddano do składania w marcu 1983 r. Podpisano do druku w czerwcu 1983 r. Druk ukoń-  
czono w czerwcu 1983 r. Zam. 2115/83. Cena zł 80,—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4



## ROLA MANGANU W CHLOROPLASTACH

## ROLE OF MANGANESE IN CHLOROPLASTS

Joanna GEMEL

Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii,  
Uniwersytet Warszawski, Warszawa

*Streszczenie.* W artykule przedstawiono ogólną charakterystykę manganu występującego w chloroplastach z uwzględnieniem takich zagadnień, jak: jego zawartość, kompleksy z białkami, lokalizacja. Przedyskutowano udział manganu: (1) w fotosyntetycznym wydzielaniu tlenu, (2) w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz (3) jego funkcję strukturalną.

*Summary.* The characteristics of chloroplast manganese has been presented. This article deals with the manganese content, its complexes with peptides and its localization. It was discussed: (1) manganese participation in photosynthetic oxygen evolution, (2) its role in superoxide dismutase activity, (3) structural function.

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- Ant2p — 2-(3-chloro-4-trifluorometylo)-anilino-3,5-dinitrotiofen  
CCCP — karbonylocyjanek-m-chlorofenylohydrazonu  
DCIP i DCIPH<sub>2</sub> — utleniona i zredukowana forma 2,6-dichlorofenolindofenolu  
EDTA — etylenodiaminotetraoctan  
EPR — skrót literowy od ang. Electron Paramagnetic Resonance (elektronowy rezonans paramagnetyczny)  
NMR — skrót literowy od ang. Nuclear Magnetic Resonance (jądrowy rezonans magnetyczny)  
PS I — I układ fotosyntezy  
PS II — II układ fotosyntezy  
SOD — dysmutaza ponadtlenkowa  
Tris — tris-(hydroksymetylo)-aminometan



## WSTĘP

Przypuszczenie o udziale manganu w fotosyntezie wysunięto po raz pierwszy w 1937 r. na podstawie obserwacji hamowania fotosyntezy u glonu *Ankistrodesmus* pozbawionego manganu przy nie zmienionej zawartości chlorofilu oraz szybkości oddychania [68]. W trakcie dalszych badań okazało się, że mangan jest niezbędny w procesie fotosyntezy u wszystkich organizmów przeprowadzających ją z wydzieleniem tlenu [68, 83].

Zahamowanie luminescencji u *Ankistrodesmus* pozbawionego manganu sugerowało rolę tego metalu w PS II [49]. Potwierdziło ją hamowanie w tych warunkach reakcji Hilla<sup>1</sup> oraz nie zmieniona aktywność PS I w chloroplastach izolowanych z roślin wyższych hodowanych na pożywkach nie zawierających manganu [79]. Wykazano również, że mikroelementu tego nie można zastąpić jonami kobaltowymi, żelazowymi, magnezowymi ani cynkowymi w stężeniach równych, a nawet 5-krotnie wyższych niż optymalne stężenia manganu [12, 51, 81].

## ZAWARTOŚĆ MANGANU W CHLOROPLASTACH

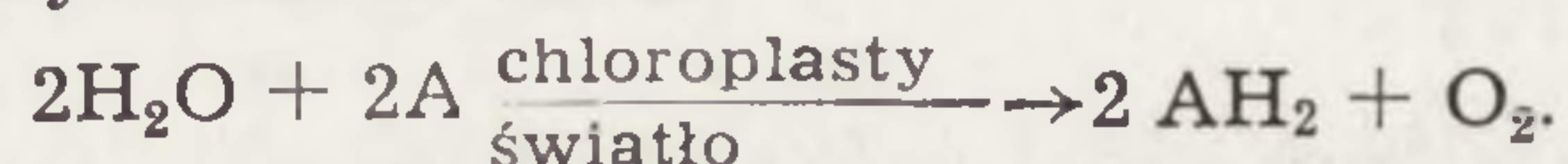
Dane dotyczące zawartości manganu w chloroplastach są zazwyczaj wyrażane w gramoatomach manganu/gramocząsteczkę chlorofilu, a ostatnio coraz powszechniej w gramoatomach manganu/400 gramocząsteczek chlorofilu stanowiących jednostkę fotosyntetyczną [2]. Cytowane w literaturze dane wahają się w granicach 4–9 gramoatomów manganu/400 gramocząsteczek chlorofilu (tabela 1).

Występowanie manganu w chloroplastach jest ograniczone do PS II [1, 10]. Wykazano to rozdzielając oba układy fotosyntezy za pomocą wirowania różnicowego chloroplastów szpinaku traktowanych digitoniną. Frakcja bogata w cząstki PS II zawierała około 4,5 razy więcej manganu niż frakcja bogata w cząstki PS I [1].

## PULE MANGANU

Siła wiązania manganu z błonami tylakoidów chloroplastów jest zróżnicowana. Na podstawie obserwacji, że 0,8 M bufor Tris o pH 8,0

<sup>1</sup> Reakcja Hilla polega na redukcji sztucznego akceptora elektronów (A) w chloroplastach poddawanych oświetlaniu. W obecności wody jako donora elektronów obserwuje się wydzielanie tlenu:



Naturalnym akceptorem elektronów jest NADP<sup>+</sup>. Natomiast w układzie in vitro chloroplasty mogą wykorzystywać sztuczne akceptory, jak żelazicyjanek lub DCIP. Szybkość tej reakcji jest odzwierciedleniem aktywności PS II. Wyraża się ją w  $\mu\text{molach}$  zredukowanego akceptora elektronów  $\times \text{godz.}^{-1} \times \text{mg}$  chlorofilu<sup>-1</sup>.



TABELA 1

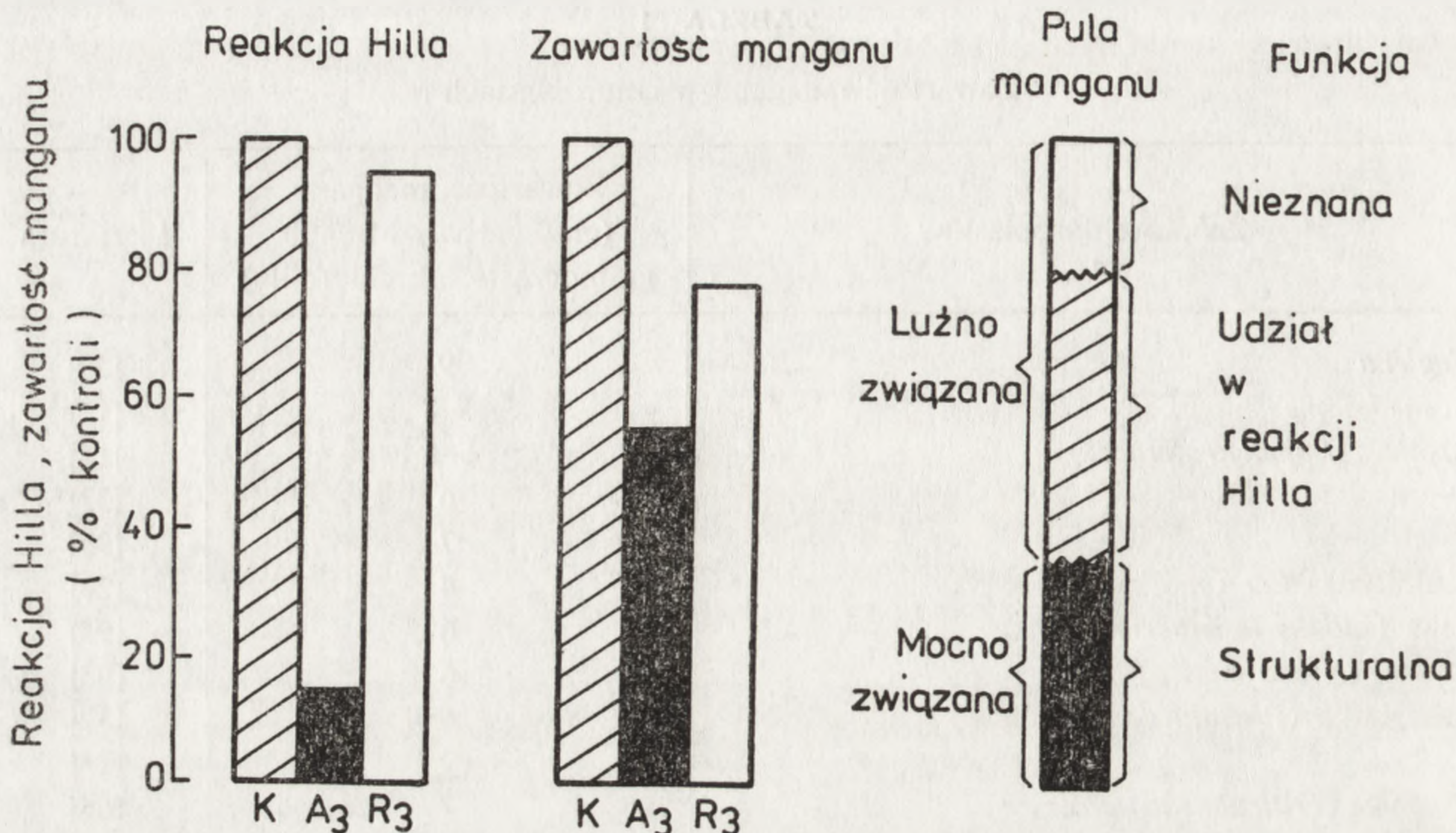
## Zawartość manganu w chloroplastach

Źródło chloroplastów	Zawartość manganu (gramoatomy Mn/400 gramocząsteczek chlorofilu)	Literatura
<i>Euglena</i>	9	[50]
<i>Scenedesmus</i>	5-8	[13]
Szpinak ( <i>Spinacia oleracea</i> )	5-6	[15]
	6	[37]
	7	[95]
Kukurydza ( <i>Zea mays</i> )	4	[23]
Lilia ( <i>Lilium longiflorum</i> )	6	[95]
Owies ( <i>Avena sativa</i> )	6	[95]
Szkarłatka ( <i>Phytolacca americana</i> )	6	[37]
	9	[95]
Pszenica ( <i>Triticum sativum</i> )	7	[66]
Pomidor ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	6-8	[46]
Lucerna ( <i>Medicago polymorpha</i> )	9	[37]

usuwa z błon chloroplastów tylko część manganu [8, 15, 38] przyjmuje się istnienie dwóch pul manganu: luźno i mocno związanego z błonami organelli [15]. Istnieją jednak rozbieżności dotyczące rozmiarów tych pul [8, 15, 38, 73, 93-95]. Powszechnie przyjmuje się, że mangan luźno związany z błonami, łatwy do usunięcia przez traktowanie buforem Tris, stanowi około 2/3 całkowitej ilości manganu w chloroplastach [8, 15, 38]. Natomiast mangan mocno związany, oporny na działanie Tris stanowi pozostałą 1/3 [8, 15, 38]. Są jednak doniesienia sugerujące, że mangan luźno związany stanowi tylko około 30% [40, 73] lub 10% [94, 95] całkowitej zawartości manganu. Przyczyna tych rozbieżności nie jest znana.

Dodatkowym potwierdzeniem istnienia luźno i mocno związanego manganu są wyniki doświadczeń nad rozwojem zdolności wydzielania tlenu u glonów [19, 83] i roślin wyższych [66] w czasie ich rozwoju ontogenetycznego. Stwierdzono, że w komórkach roślin hodowanych w ciemności występuje tylko mangan mocno związany, nie biorący udziału w wydzielaniu tlenu [66, 94]. Rozwój układu rozszczepiającego wodę jest uzależniony od obecności manganu luźno związanego. Potwierdzają to doświadczenia, w których w czasie krótkotrwałego naświetlania komórek glonów (2-3 min) hodowanych w ciemności następował wzrost aktywności PS II i ilości manganu luźno związanego [19]. Jest interesujące, że w chloroplastach pomidora tylko część manganu luźno związanego z błonami jest niezbędna dla aktywności PS II [46] (ryc. 1). Zahamowaniu reakcji Hilla w około 90% na skutek przechowywania liści w chłodzie





Ryc. 1. Pule manganu a ich funkcje w chloroplastach liści pomidora. K — liście świeże, A<sub>2</sub> — liście przechowywane 3 dni w chłodzie i ciemności, R — liście naświetlane (8000 lx) w 25°C przez 2 godz. po przechowaniu w chłodzie i ciemności przez 3 dni. Według Kaniugi i wsp. [46]

(0°C) i ciemności w ciągu 3 dni towarzyszył spadek zawartości manganu do 40–50% jego całkowitej ilości. Oświetlenie liści przez 2 godziny przywracało aktywność reakcji Hilla prawie do poziomu kontroli, natomiast poziom manganu do 70–80%. Na tej podstawie autorzy postulują, że w chloroplastach około 20% całkowitej ilości manganu stanowi mangan luźno związany o bliżej nieokreślonej funkcji [46]. Istnienie podobnej frakcji manganu stwierdzono też w chloroplastach liści szpinaku [70, 72, 75].

Mangan niezbędny dla aktywności PS II bierze ponadto udział w reakcji katalizowanej przez jedną z dysmutaz ponadtlenkowych [45]. Natomiast mangan mocno związany z błonami chloroplastów pełni prawdopodobnie rolę strukturalną [45, 53, 59, 65]. Potwierdzają to obserwacje mikroskopowe, zwłaszcza z zastosowaniem techniki mikroskopii elektronowej [59]. W chloroplastach szpinaku, izolowanych z roślin hodowanych na pożywkach nie zawierających manganu, stwierdzono wyraźną dezorganizację systemu lamellarnego w porównaniu z chloroplastami kontrolnymi [59].

#### KOMPLEKSY MANGANU Z BIAŁKAMI

Sposób, w jaki mangan jest związany z błonami tylakoidów chloroplastów jest przedmiotem badań i dyskusji. Początkowo sugerowano, że



mangan występuje w kompleksie z lipidami [85], czego nie potwierdziły wyniki szeregu przeprowadzonych później doświadczeń. Po ekstrakcji bowiem lipidów z chloroplastów lub ich fragmentów za pomocą rozpuszczalników mangan odnajdywano w osadzie bogatym w białka [11, 35, 51–53, 64]. Ponadto ekstrahując chlorofil acetonem, nie obserwowano jednoczesnego uwalniania manganu [11, 51]. Wyniki tych eksperymentów wskazują na to, że mangan nie jest związany ani z lipidami, ani z chlorofilem. Występuje natomiast w kompleksach z białkami, ponieważ uwalniania go z błon działanie proteazy [66]. Nie można wykluczyć, że występuje on w kompleksach białko—mangan—chlorofil [11]. Dla określenia białka lub białek zasocjowanych z manganem stosuje się termin „białko zawierające mangan” [33]. Są one od lat przedmiotem zainteresowania badaczy.

Lagoutte i Duranton [53] wyizolowali z liści kukurydzy białko o ciężarze cząsteczkowym 25 000, związane specyficznym z manganem i chlorofilem [30]. Wykazano, że jeden atom manganu przypada na 8 cząstek tego białka. Ze względu na drastyczne warunki wymagane do wyizolowania opisanego kompleksu oraz obserwację, że kompleks ten nie jest potrzebny dla aktywności PS II, autorzy postulują, że nie zawiera on manganu luźno związanego, ale mocno związanym z błonami chloroplastów, pełniącym funkcję strukturalną [15, 53].

W wyniku ekstrakcji wodnej zawiesiny chloroplastów szpinaku mieszaniną chloroform/metanol, Henriques i Park [35] stwierdzili upłynnienie około 1/3 całkowitej ilości białek błonowych. Frakcja nierozpuszczalna w stosowanej mieszaninie rozpuszczalników zawierała około 95% całkowitej ilości manganu występującego w chloroplastach. Natomiast frakcja rozpuszczalna, nie zawierająca prawie manganu, była bogata w białko o ciężarze cząsteczkowym 25 000. Obserwacja ta nie jest zgodna z wynikami Lagoutte'a i Durantona [53], którzy stwierdzili, że to właśnie białko zawiera mangan puli mocno związanej z błonami chloroplastów.

Kompleks manganu z białkiem wyizolowano ponadto z sinicy *Phormidium luridum* [82]. Jest to tzw. „czynnik Hilla”, ciepłotrwały, niskocząsteczkowy związek (ciężar cząsteczkowy 1000), wykazujący absorpcję w UV. Czynnik ten nie wpływa na aktywność PS I. Jest natomiast niezbędny w procesie fotosyntetycznego wydzielania tlenu [82]. Nie jest jednak wykluczone, że wyizolowany kompleks jest artefaktem [68].

#### LOKALIZACJA MANGANU W BŁONACH CHLOROPLASTÓW

Kompleks enzymatyczny katalizujący reakcję rozszczepienia wody występuje po wewnętrznej stronie błony tylakoidu [9, 32, 72]. Potwierdzają to doświadczenia, w których wykazano, że reakcję fotolizy wody



kontroluje pH środowiska wewnętrznego, a nie zewnętrznego wobec błony tylakoidu [32]. Dodatkowego dowodu wskazującego na taką lokalizację manganu w chloroplastach dostarczyły doświadczenia z zastosowaniem techniki jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR)<sup>2</sup>.

Zahamowaniu wydzielania tlenu w obecności hydroksyloaminy towarzyszy wzrost szybkości relaksacji protonowej wody [70, 72, 74, 75]. Relaksacja ulega zmniejszeniu na skutek chelatowania manganu. Znając miejsce działania związku chelatującego (tylko na zewnątrz błony tylakoidów lub dzięki przepuszczalności błon również wewnątrz tylakoidów), można wnioskować o miejscu występowania manganu w błonie. Chelex (wymieniacz jonów metali dwuwartościowych, nie przenikający przez błony chloroplastów usuwa Mn (II) związany z zewnętrzną stroną błony. Natomiast w obecności jonoforu A 23 187, specyficznego dla dwuwartościowych kationów, następuje usuwanie Mn (II) występującego po

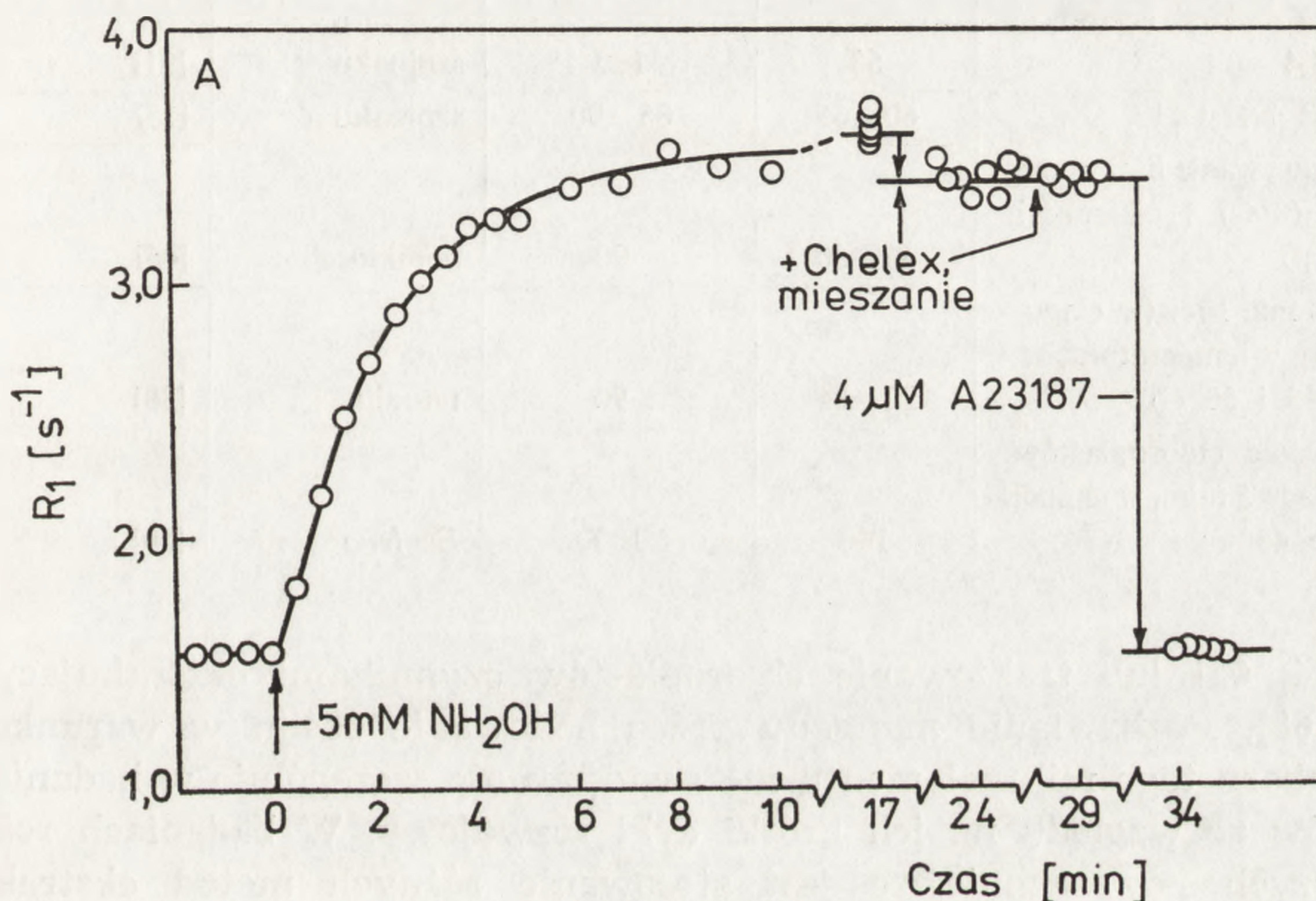
<sup>2</sup> Podstawą techniki NMR jest zdolność absorbowania promieniowania o radiowej, częstości drgań ( $10^6$ – $10^8$  Hz) przez jądra izotopów mające moment magnetyczny, umieszczone w silnym zewnętrznym polu magnetycznym [47, 63, 80]. Poziomy energetyczne jądra można badać obserwując przejścia między nimi. W tym celu do jąder umieszczonych w jednorodnym polu magnetycznym wprowadza się promieniowanie elektromagnetyczne o energii równej różnicy energii pomiędzy dwoma sąsiednimi poziomami spinowymi. Warunek rezonansu jądrowego opisuje

równanie Larmora,  $h\nu = \gamma \frac{h}{2} H_0$ , gdzie  $h$  oznacza stałą Plancka,  $\nu$  — częstość promieniowania elektromagnetycznego,  $\gamma$  — współczynnik żyromagnetyczny,  $H_0$  zaś natężenie pola magnetycznego. Rezonans występuje po dopasowaniu częstości promieniowania elektromagnetycznego do natężenia pola magnetycznego. Proces powrotu spinów do stanu równowagi termicznej przez odprowadzenie zaabsorbowanej energii do otoczenia zwanego „siecią” znany jest pod nazwą relaksacji spinowo-sieciowej lub podłużnej. Charakteryzuje go czas relaksacji spinowo-sieciowej  $T_1$ . Zaabsorbowana energia może być też przekazana innemu spinowi, znajdującemu się na niższym poziomie energetycznym. W wyniku tzw. wymiany spinów, jeden schodzi na niższy poziom oddając energię wzbudzenia drugiemu, który spełnia ten sam warunek rezonansowy. Jest to tzw. proces relaksacji spinowo-spinowej lub poprzecznej o charakterystycznym czasie relaksacji  $T_2$ . W badaniach NMR często zamiast posługiwania się pojęciami czasów relaksacji stosuje się ich odwrotności, zwane szybkościami relaksacji  $R_1$  i  $R_2$ .

Ze względu na to, że moment magnetyczny elektronu jest około 1000 razy większy niż moment magnetyczny jądra atomowego [63], w obecności elektronu następuje skrócenie czasów relaksacji jądra atomowego, czyli wzrost szybkości relaksacji. Dzięki tej właściwości technika NMR w odniesieniu do protonów wody znalazła zastosowanie m. in. do badania paramagnetycznych jonów związanych ze związkami wielkocząsteczkowymi [86, 88]. Wpływ paramagnetyków na szybkość relaksacji protonowej wody jest ograniczony ich dostępnością do rozpuszczalnika. W chloroplastach głównie Mn (II) przyczynia się do obserwowanego wzrostu relaksacji. Jony innych metali powodują wzrost tej wielkości jedynie w 20% [86]. Cu (II) w plastocyjaninie jest w ogóle niedostępna dla wody. Mn (III), Fe (II), Fe (III) są natomiast słabszymi paramagnetykami niż Mn (II) [29, 86].



obu stronach błony. Wzrost szybkości relaksacji protonowej wody na skutek działania hydroksyloaminy podlega nieznacznemu zahamowaniu w obecności Chelexu i bardzo silnemu po dodaniu A 23 187 (ryc. 2). Potwierdza to, że kompleks utleniający wodę znajduje się po wewnętrznej stronie błony tylakoidu [9, 25, 32, 84]. Łagodne traktowanie, takie jak inkubacja błon tylakoidów w ciemności lub zamrażanie zawiesiny chloroplastów, powoduje reorientację Mn (II) ku zewnętrznej powierzchni błon [72].



Ryc. 2. Wpływ wymiennicza jonowego Chelexu i jonoforu A 23 187 na wzrost szybkości podłużnej relaksacji protonowej wody ( $R_1$ ) indukowany przez hydroksyloaminę. Chelex (0,1 g/ml) dodawano po 17 min od chwili wprowadzenia  $NH_2OH$  (5 mM), próbę mieszano w ciągu 6 min, mierzono  $R_1$  i ponownie mieszano próbę przez 3 min oraz po upływie tego czasu mierzono  $R_1$ . Następnie dodawano 4  $\mu M$  A 23 187 i przed pomiarem  $R_1$  mieszano próbę przez 10 min. Wszystkie czynności przeprowadzono w temperaturze 0–3°C. Według Robinsona i wsp. [72]

#### METODY SPECYFICZNEGO ELIMINOWANIA UDZIAŁU MANGANU W REAKCJI HILLA

Do badań roli manganu w chloroplastach stosuje się powszechnie organelle pozbawione go w sposób doświadczalny, aby obserwować efekty wywołane jego brakiem lub badać możliwość rekonstrukcji układu po jego dodaniu. Niedobór manganu w chloroplastach może być wywołany przez hodowanie roślin na pożywkach nie zawierających manganu



TABELA 2

## Metody usuwania manganu z chloroplastów

Procedura ekstrakcji	Uwolniony mangan (%)	Inhibicja reakcji Hilla (%)	Materiał doświadczalny : chloroplasty	Literatura
0,8 M Tris, pH 8,0	60–65	70–90	szpinaku	[8, 15]
0,8 M Tris, pH 8,0	65–85	90	tytoniu	[38]
0,8 M Tris, pH 7,8–8,0	30	90	szpinaku	[19,20, 40]
0,8 M Tris 20% aceton, pH 8,4	53	100	szpinaku	[91]
1,0 mM NH <sub>2</sub> OH	60–65	85–90	szpinaku	[15]
Przechowywanie liści w chłodzie (0°C) i ciemności (3 dni)	40–50	90	pomidora	[46]
Ogrzewanie liści (w ciągu 5 min, w temperaturach: 46, 48 i 50°C)	22–85	90	tytoniu	[38]
Ogrzewanie chloroplastów (w ciągu 5 min., w temperaturze 45°C)	100	100	<i>Euglena</i>	[50]

[2, 34, 65] lub traktowanie chloroplastów czynnikami ekstrahującymi [22, 68]. Pozbawianie manganu przez hodowanie roślin w warunkach niedoboru tego mikroelementu ma zastosowanie szczególnie w badaniach glonów ze względu na ich krótki cykl rozwojowy. W badaniach roślin wyższych powszechniejsze jest stosowanie różnych metod ekstrakcji manganu z chloroplastów (tabela 2). Najczęściej wykorzystywane są dwie spośród wymienionych metod ekstrakcji: bufor Tris oraz hydroksyloamina.

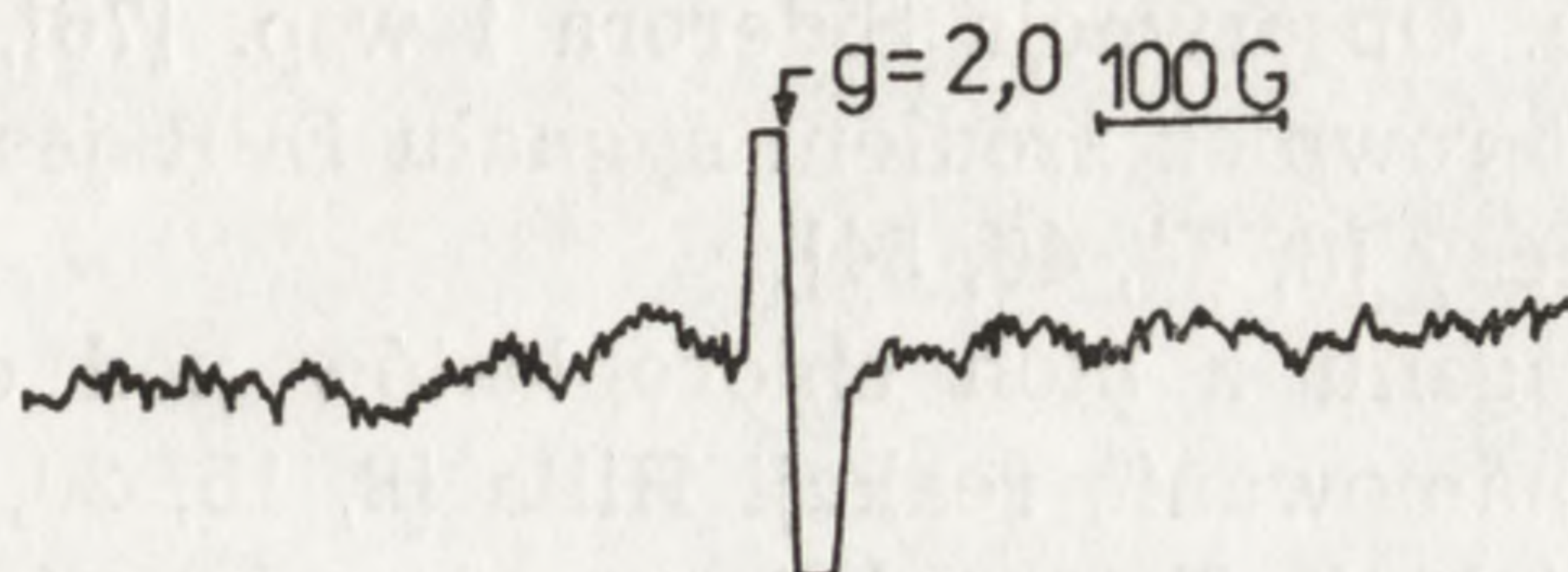
Wpływ buforu Tris na usuwanie manganu z błon chloroplastów jest od dawna bezsporny [90]. Najczęściej stosuje się do ekstrakcji 0,8 M Tris o pH 8,0 [8, 15, 20, 38, 40]. Takie warunki są optymalne dla uzyskania maksymalnej inhibicji wydzielania tlenu, przy jednoczesnej możliwości obserwowania reaktywacji [20].

W wyniku ekstrakcji chloroplastów buforem Tris mangan wypływa do środowiska ekstrahującego [66] lub pozostaje wewnątrz tylakoidów [8]. W tym ostatnim przypadku nie stwierdza się go w supernatancie [8]. Dopiero po poddaniu chloroplastów działaniu ultradźwięków jest on rozdzielony równomiernie pomiędzy supernatant a osad [8]. Wynik tego doświadczenia wydaje się jednak wątpliwy, gdyż stosując chloroplasty pszenicy poddane uprzednio działaniu buforu Tris obserwowano usunięcie 2/3 całkowitej ilości manganu, czemu towarzyszył w osadzie chloro-

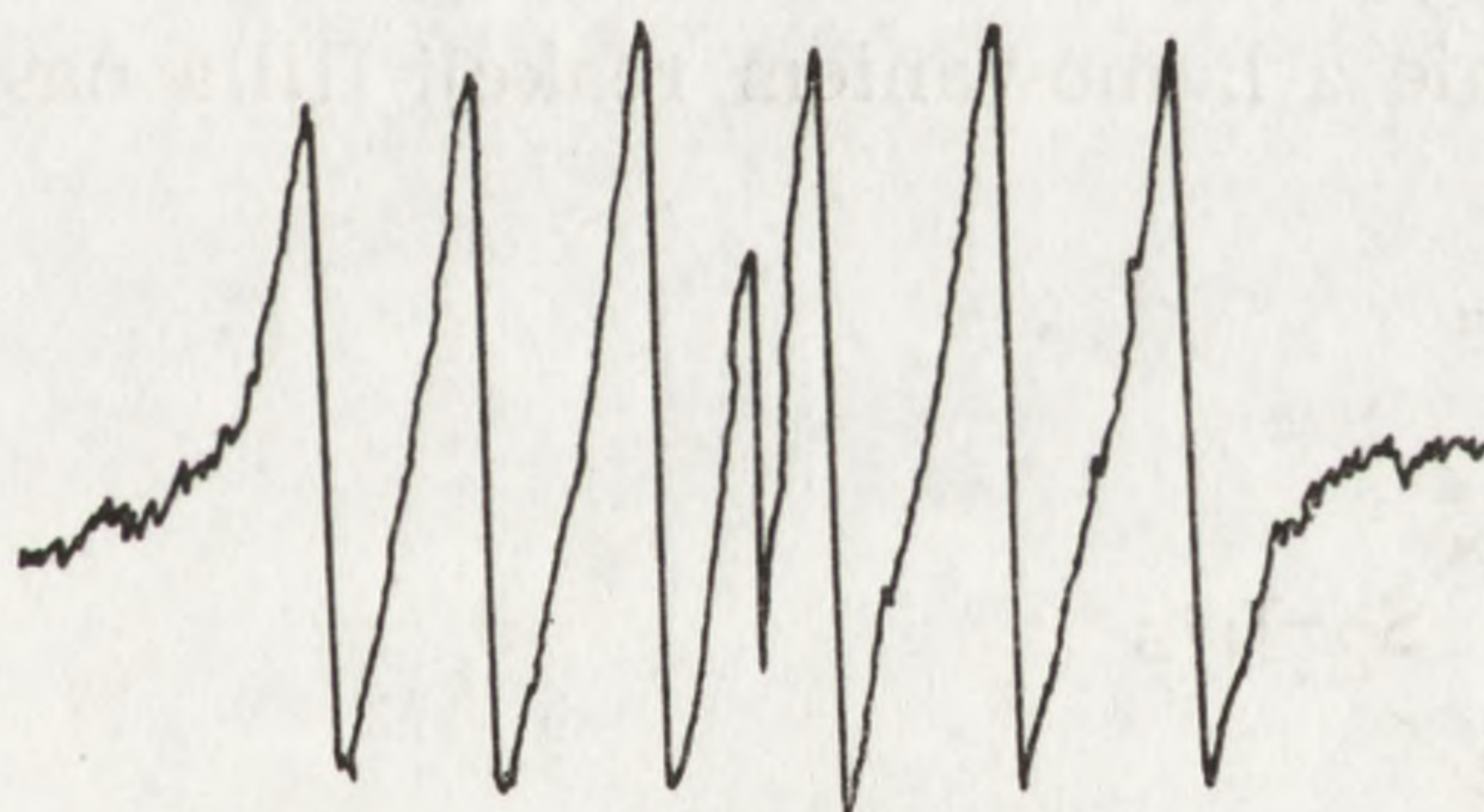


plastów nieznaczny sygnał EPR charakterystyczny dla manganu [66]. Przemawia to za tym, że większość usuniętego mikroelementu wypłynęło poza chloroplasty. Dobrą przepuszczalność błon chloroplastów dla manganu potwierdziły też badania nad uwalnianiem go podczas przechowywania liści pomidora w chłodzie i ciemności. W doświadczeniach tych

Chloroplasty płukane buforem  
zawierającym sacharozę (0,4 M)



Chloroplasty płukane buforem Tris  
(0,8 M; pH 8,0 )



Ryc. 3. Widma EPR (pierwsza pochodna) chloroplastów szpinaku płukanych buforem zawierającym sacharozę lub Tris. Stężenie chlorofilu 4 mg/ml. Według Blankenshipa i Sauera [8]

<sup>8</sup> EPR wykorzystuje się do badania cząstek zawierających niesparowany elektron lub elektrony [24, 36]. W jednorodnym polu magnetycznym następuje rozdzielanie elektronów takiej cząstki na dwie grupy: z momentem magnetycznym zgodnym z kierunkiem pola zewnętrznego oraz przeciwnym kierunkowi tego pola, o spinach odpowiednio  $+1/2$  i  $-1/2$ . Warunek absorpcji rezonansowej, przejścia elektronów pomiędzy dwoma poziomami energetycznymi opisuje równanie:  $h\nu = gB_N H_0$ , gdzie  $h$  oznacza stałą Plancka,  $\nu$  — częstość promieniowania elektromagnetycznego,  $g$  — współczynnik rozszczepienia spektroskopowego,  $B_N$  — magneton jądrowy Bohra,  $H_0$  — zaś natężenie pola magnetycznego. Częstość drgań w EPR jest rzędu  $10^{10}$  Hz (mikrofale). Warunek rezonansu osiąga się zazwyczaj przez zmianę natężenia pola magnetycznego przy stałej częstości promieniowania.

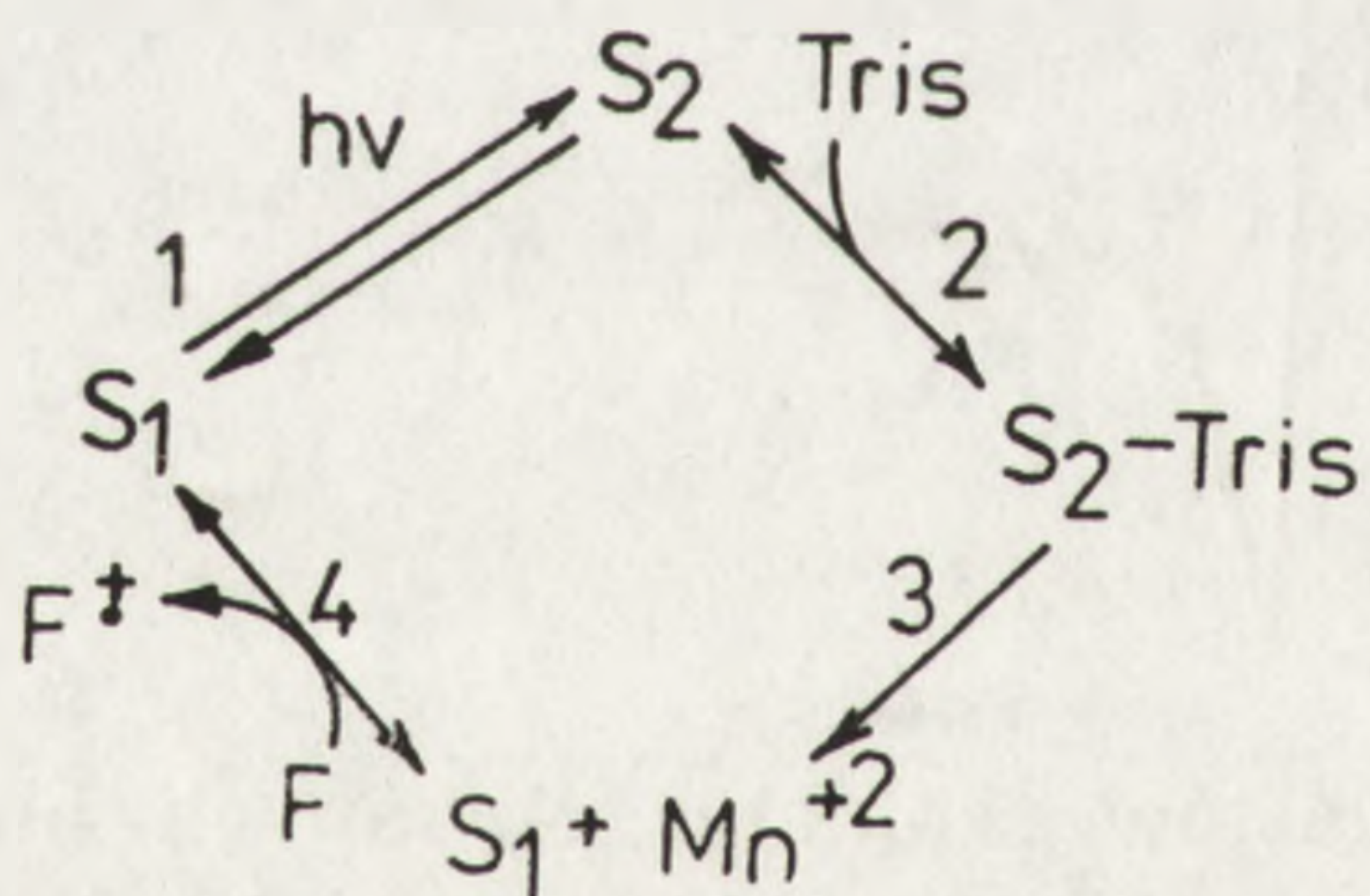


stwierdzono migrację znacznej frakcji labilnej puli manganu poza chloroplasty [46].

W badaniach nad uwalnianiem manganu z błon pomocna jest technika elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) <sup>3</sup>.

Mn (II), wykazujący właściwości paramagnetyczne, posiada charakterystyczne sześciopasmowe widmo EPR (ryc. 3). Ze względu na to, że jest ono możliwe do rejestracji po uwolnieniu go z błon tylakoidów [8, 24, 46, 54], technika EPR jest wykorzystywana do obserwacji procesu ekstrakcji manganu. Obserwacja Siderera i wsp. [76], że Mn (II) związany z błonami jest również źródłem sygnału EPR jest sprzeczna z wynikami innych badaczy [8, 24, 46, 54].

Uwalnianiu manganu z błon chloroplastów pod działaniem buforu Tris towarzyszy zahamowanie reakcji Hilla [8, 15, 20, 38, 40]. Interesujący mechanizm działania Tris w hamowaniu zdolności wydzielania tlenu zaproponowali Cheniae i Martin [20]. Autorzy ci zauważyli, że w ciemności szybkość hamowania reakcji Hilla w chloroplastach jest stosunkowo mała ( $t_{1/2} = 20-25$  min). Światło o niskim natężeniu podnosi szybkość inaktywacji ( $t_{1/2} = 2,5$  min). Jeden krótki nasycający błysk wystarcza do zahamowania wydzielania tlenu w 50-70%. Związki chemiczne, takie jak Ant 2p, CCCP, FCCP, skracające czas trwania kompleksu wydzielającego tlen w tzw. stanach  $S_2$  i  $S_3$ , hamują proces inaktywacji <sup>4</sup>. Równocześnie z hamowaniem reakcji Hilla następuje uwalnianie



Ryc. 4. Mechanizm inaktywacji reakcji Hilla przez Tris. Według Chenie'a i Martina [20]

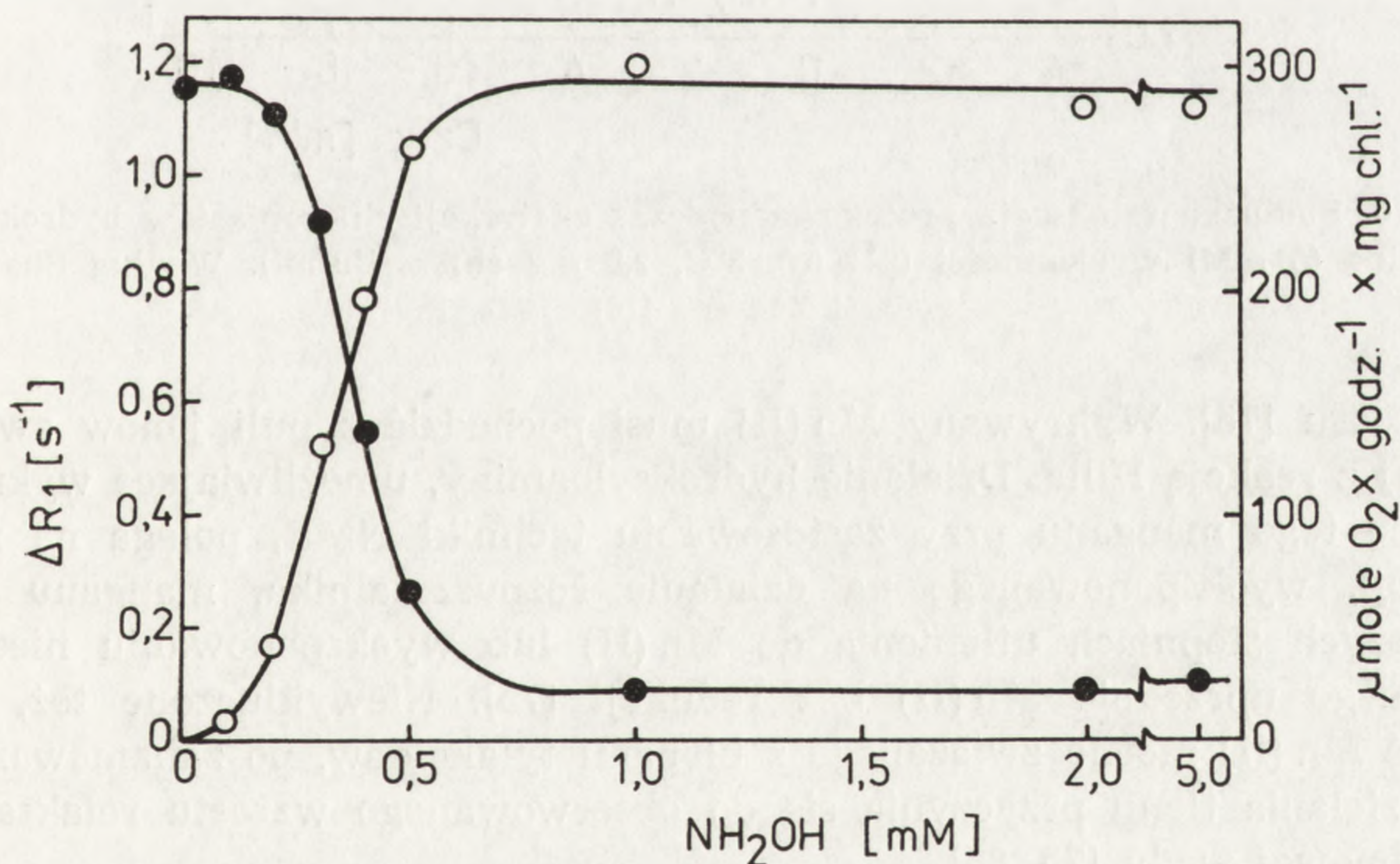
manganu, który ponownie jest włączany podczas procesu reaktywacji [20]. Obecnie postuluje się, że Tris działa na układ wydzielający tlen w stanie  $S_2$  (ryc. 4) [20, 26]. W stabilnym w ciemności stanie  $S_1$  czas inaktywacji okazał się bowiem zbyt długi. Absorpcja jednego kwantu światła, powodująca przekształcenie kompleksu rozszczepiającego wodę ze stanu  $S_1$  w  $S_2$ , skracając czas inaktywacji wskazując, że na tym etapie działa Tris [20]. Wydaje się, że wskutek wiązania kompleksu enzymatycznego w stanie  $S_2$  z Tris następuje chemiczna modyfikacja kompleksu

<sup>4</sup> Wydaje się, że układ katalizujący wydzielanie tlenu może istnieć w 4 stanach tzw. S zdolnych do gromadzenia ładunku [43, 69].



w tym stanie [20, 26]. Tris indukuje dysocjację manganu związanego z  $S_2$  z utworzeniem nieaktywnego stanu S (tzw.  $S_i$ ). Przywróceniu aktywności towarzyszy włączenie uwolnionego manganu. W procesie tym pośredniczy utlenianie związku F do  $F^+$  odpowiedzialnego za tzw. sygnał II EPR [5]. Hipoteza ta tłumaczy efektywność DCIPH<sub>2</sub>, FCCP, CCCP, Ant 2p i tetrafenyloboranu w indukowaniu reaktywacji. Związki te bowiem zwiększają ilość F, dostarczając substratu niezbędnego w procesie reaktywacji [20].

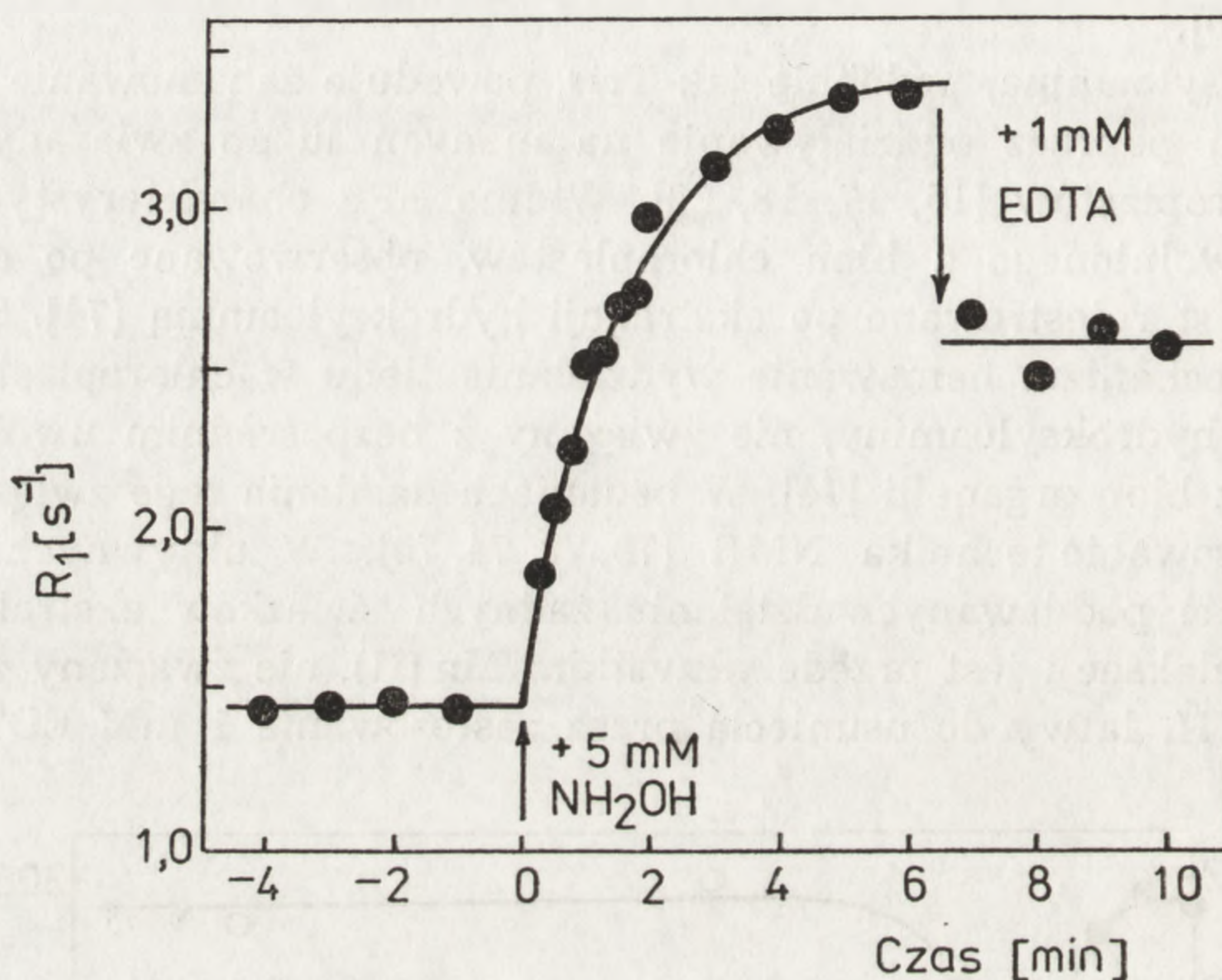
Hydroksyloamina, podobnie jak Tris, powoduje zahamowanie wydzielania tlenu poprzez oddziaływanie na mangan luźno związany z błonami chloroplastów [15, 17, 18, 39]. Widmo EPR charakterystyczne dla Mn (II) uwolnionego z błon chloroplastów, obserwowane po działaniu Tris nie jest rejestrowane po ekstrakcji hydroksyloaminą [74]. Sugeruje to inny mechanizm hamowania wydzielania tlenu w chloroplastach pod wpływem hydroksyloaminy, nie związany z bezpośrednim uwolnieniem manganu z błon organelli [74]. W badaniach działania tego związku znalazła zastosowanie technika NMR [70, 72, 74, 75]. W aktywnych chloroplastach nie poddawanych działaniu żadnych związków ekstrahujących źródłem relaksacji jest przede wszystkim Mn (II), nie związany z aktywnością PS II, łatwy do usunięcia przez zastosowanie 1 mM EDTA pod-



Ryc. 5. Porównanie wpływu różnych stężeń hydroksyloaminy na szybkość podłużnej relaksacji protonowej wody  $R_1$  (○) i wydzielanie tlenu (●). Doświadczenia przeprowadzono stosując identyczne próbki chloroplastów (2,7 mg chlorofilu/ml) w temperaturze 25°C, pomiary wykonywano po 16 min inkubacji.  $R_1 = |R_1 - R_{1 \text{ pocz.}}|$ , gdzie  $R_{1 \text{ pocz.}}$  jest początkową relaksacją obserwowaną przed inkubacją chloroplastów z  $NH_2OH$ . Według Robinsona i wsp. [70]



czas izolowania chloroplastów [70–72, 74, 75]. W chloroplastach przygotowanych w obecności 1 mM EDTA relaksacja protonowa wody występuje po ekstrakcji hydroksyloaminą w stężeniach inaktywujących reakcję Hilla [70, 72, 74, 75] (ryc. 5). Źródłem tej relaksacji jest mangan wiązany przez EDTA oraz niedostępny dla tego związku chelatującego [70, 72, 74, 75] (ryc. 6). Pojawianie się relaksacji przebiega jako reakcja zależna



Ryc. 6. Podłużna relaksacja protonowa podczas ekstrakcji chloroplastów hydroksyloaminą (5 mM) w ciemności (pH 0,8, 3°C, 2,8 mg chlorofilu/ml). Według Sharpa i Yocuma [74]

od czasu [75]. Wykrywany Mn (II) musi pochodzić z puli jonów związanej z reakcją Hilla. Działanie hydroksyloaminy, umożliwiające wykrywanie tego manganu przy zastosowaniu techniki NMR, polega na redukcji, wyeksponowanego na działanie rozpuszczalnika, manganu na wyższych stopniach utlenienia do Mn (II) lub wyeksponowaniu niedostępnego uprzednio Mn (II) bez redukcji [75]. Niewykluczone też, że część Mn (II) mocno związanego z błonami tylakoidów, po zahamowaniu wydzielania tlenu przyczynia się do obserwowanego wzrostu relaksacji protonowej wody [75, 88].

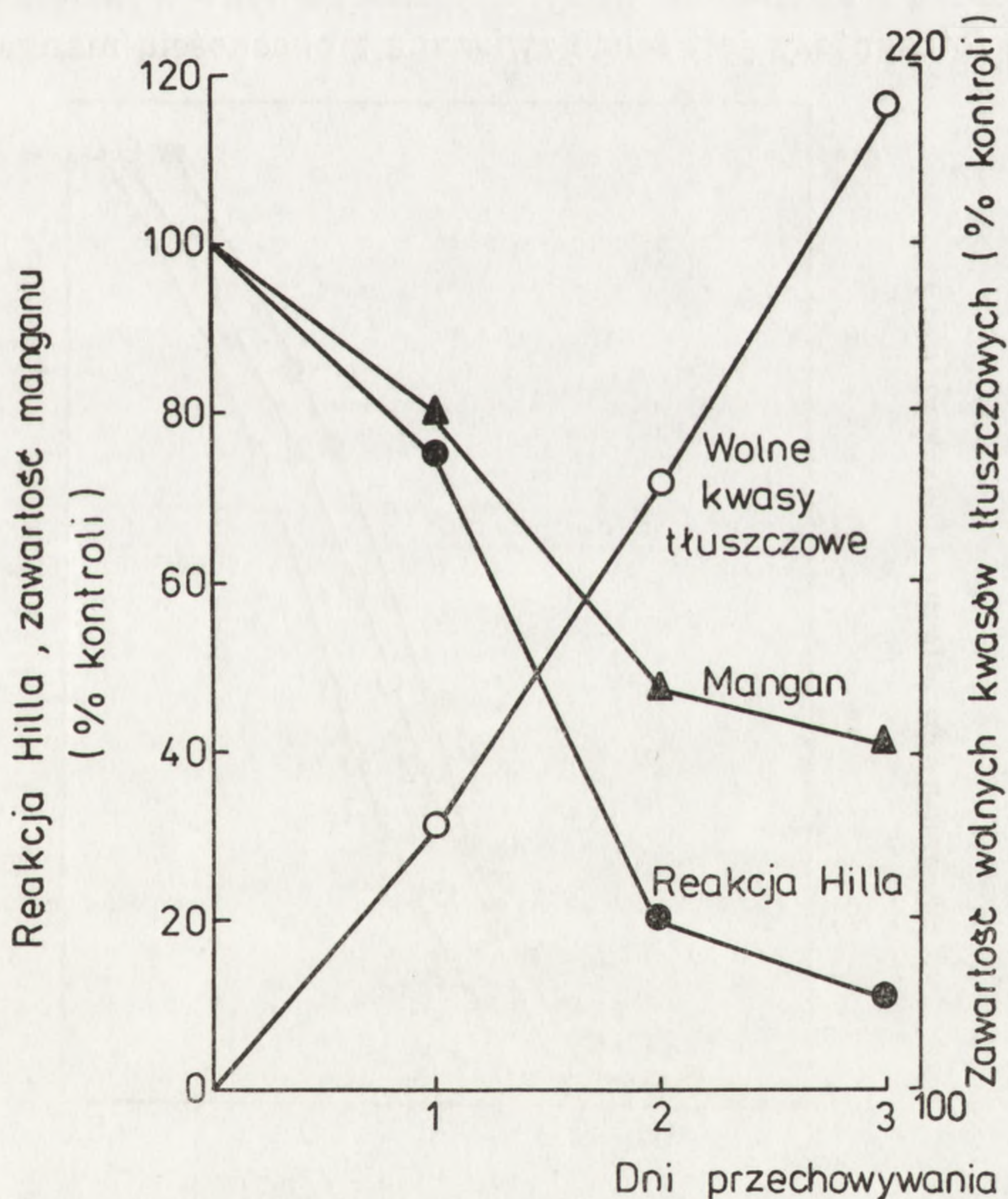
Sharp i Yocum [75] nie stwierdzili występowania korelacji pomiędzy kinetyką ekstrakcji manganu a stanem S, w jakim występuje kompleks rozszczepiający wodę przed dodaniem hydroksyloaminy. Wydaje się, że hydroksyloaminę charakteryzuje zdolność do redukowania w ciągu 5–10 s wyższych stanów S do wrażliwego na nią stanu  $S_0$  lub  $S_{-1}$  [75].



Wniosek ten wynika z obserwacji, że proces inaktywacji reakcji Hilla przez hydroksyloaminę jest hamowany przy zastosowaniu ciągłego oświetlenia lub nasycających błysków światła z ciemnymi przerwami trwającymi  $0,2-5 \text{ s}^{-1}$  [75]. Gdy te przerwy są dłuższe niż 5 s nie obserwuje się przeciwdziałania efektowi hydroksyloaminy. Nie jest to jednak zgodne z wynikami doświadczeń Hortona i Croze [39], którzy podają, że światło ułatwia działanie tego związku na błony chloroplastów. Przyczyna tych rozbieżności nie jest w pełni jasna, ale stosowane przez różnych autorów warunki przeprowadzania ekstrakcji nieznacznie się różniły, co może być przyczyną opisanych niezgodności [75].

Przy zastosowaniu niskich ( $100 \mu\text{M}$ ) i średnich ( $200-500 \mu\text{M}$ ) stężeń hydroksyloaminy [70], w ciemności może zachodzić samorzutnie proces reaktywacji.

W ostatnich latach poświęca się dużo uwagi nie tylko sztucznym, ale



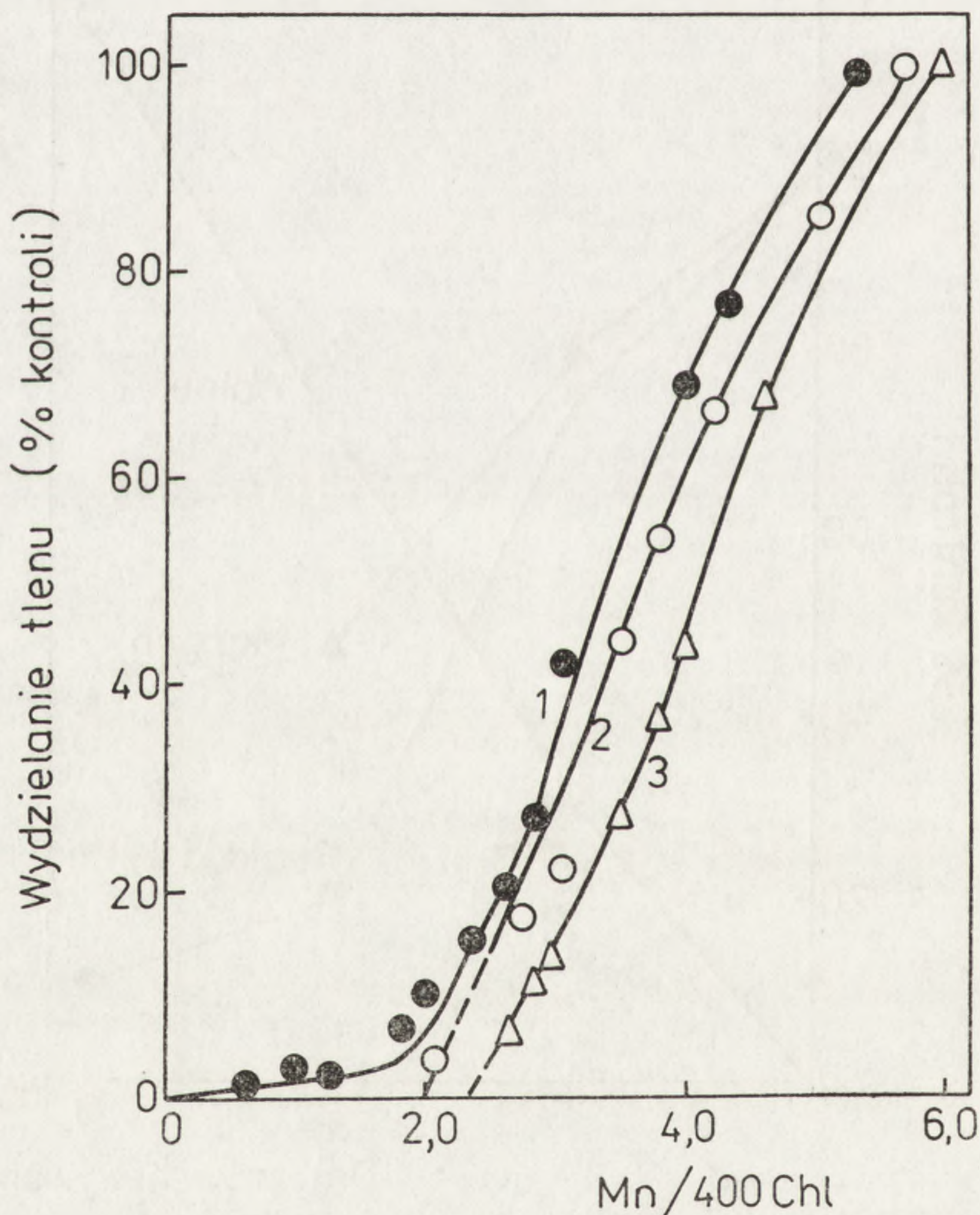
Ryc. 7. Zmiany szybkości reakcji Hilla, zawartości manganu i wolnych kwasów tłuszczowych w chloroplastach fasoli na skutek przechowywania liści w chłodzie ( $0^{\circ}\text{C}$ ) i ciemności. Według Kaniugi i wsp. [44]



i naturalnym inhibitorom reakcji Hilla, kwasom tłuszczowym [28, 44, 58, 60, 78]. Ze względu na to, że nienasycone kwasy tłuszczowe stanowią zasadniczą część lipidów w błonach tylakoidów chloroplastów, decydują one o strukturalnej i funkcjonalnej integralności błon. Wolne kwasy tłuszczowe, które nagromadzają się na skutek hydrolizy lipidów w warunkach starzenia się (przechowywanie liści roślin wrażliwych na przemarzanie w chłodzie i ciemności) [46, 60] lub pod wpływem egzogennie podanej galaktolipazy [60], hamują reakcję Hilla. Jest to spowodowane usunięciem manganu luźno związanego z błonami [44] (ryc. 7). Podobny efekt obserwowano w wyniku podania egzogenego kwasu tłuszczowego [28, 44], przy czym kwas linolenowy jest bardziej skuteczny w ekstrakcji manganu niż linolowy [44].

#### ROLA MANGANU W FOTOSYNTETYCZNYM WYDZIELANIU TLENU

Zdolność do utleniania wody z jednoczesnym wydzielaniem tlenu w procesie fotosyntezy jest ściśle związana z obecnością manganu w chlo-

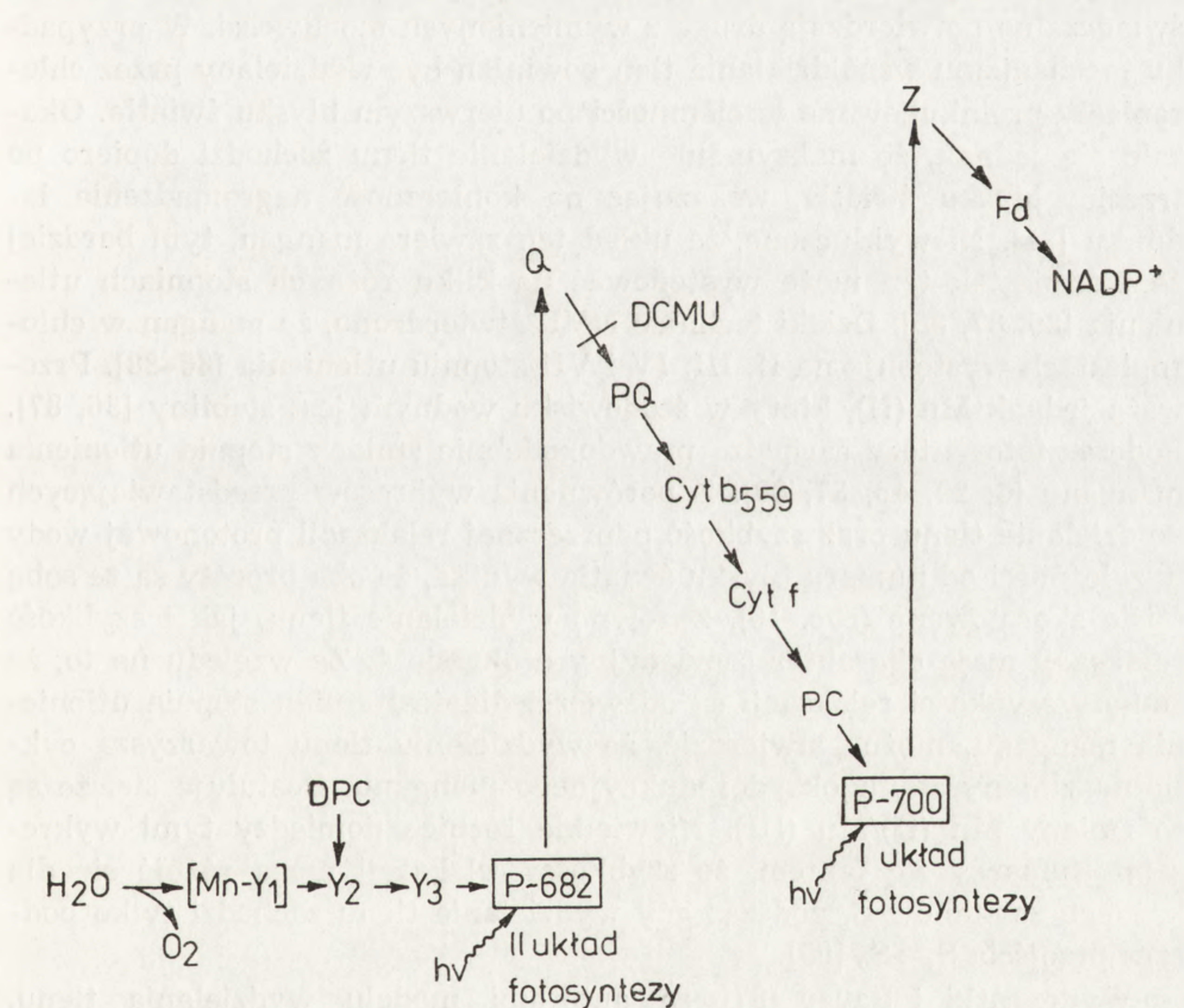


Ryc. 8. Związek pomiędzy ilością manganu związanego w chloroplastach szpinaku a ich zdolnością do wydzielania tlenu. Krzywe 1-3 przedstawiają wyniki różnych doświadczeń. Według Chenie'a i Martina [15]



roplastach [3, 8, 15, 20, 38, 40, 54, 58, 91, 92]. Między wydzielaniem tlenu a zawartością manganu luźno związanego istnieje korelacja [8, 15, 38]. Usunięciu bowiem 2/3 całkowitej ilości manganu towarzyszy utrata zdolności do wydzielania tlenu w 90% [8, 15, 38]. Zależność ta jest liniowa (ryc. 8).

Przekonującego dowodu umiejscowienia manganu w fotosyntetycznym transporcie elektronów po utleniającej stronie PS II pomiędzy wodą a przenośnikiem Y<sub>2</sub> [77] dostarczyły doświadczenia z zastosowaniem sztucznych donorów i akceptorów elektronów [50]. Po całkowitym usunięciu manganu przez szok termiczny u *Euglena* obserwowano zahamowanie reakcji Hilla z DCIP jako akceptorem elektronów. Stosując natomiast DPC jako donor elektronów, aktywność tę można było przywró-



Ryc. 9. Miejsce manganu w fotosyntetycznym transporcie elektronów; Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> — hipotetyczne przenośniki elektronów zaproponowane przez Siegenthalera [77], DPC — difenylokarbazyd, P 682 i P 700 — centrum reakcji PS II i PS I, Q — składnik wygaszający fluorescencję, DCMU — 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik, PQ — plastochinon, cyt — cytochrom, PC — plastocyjanina, Z — pierwszy akceptor elektronów PS I, Fd — ferredoksyna, NADP<sup>+</sup> — fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, forma utleniona

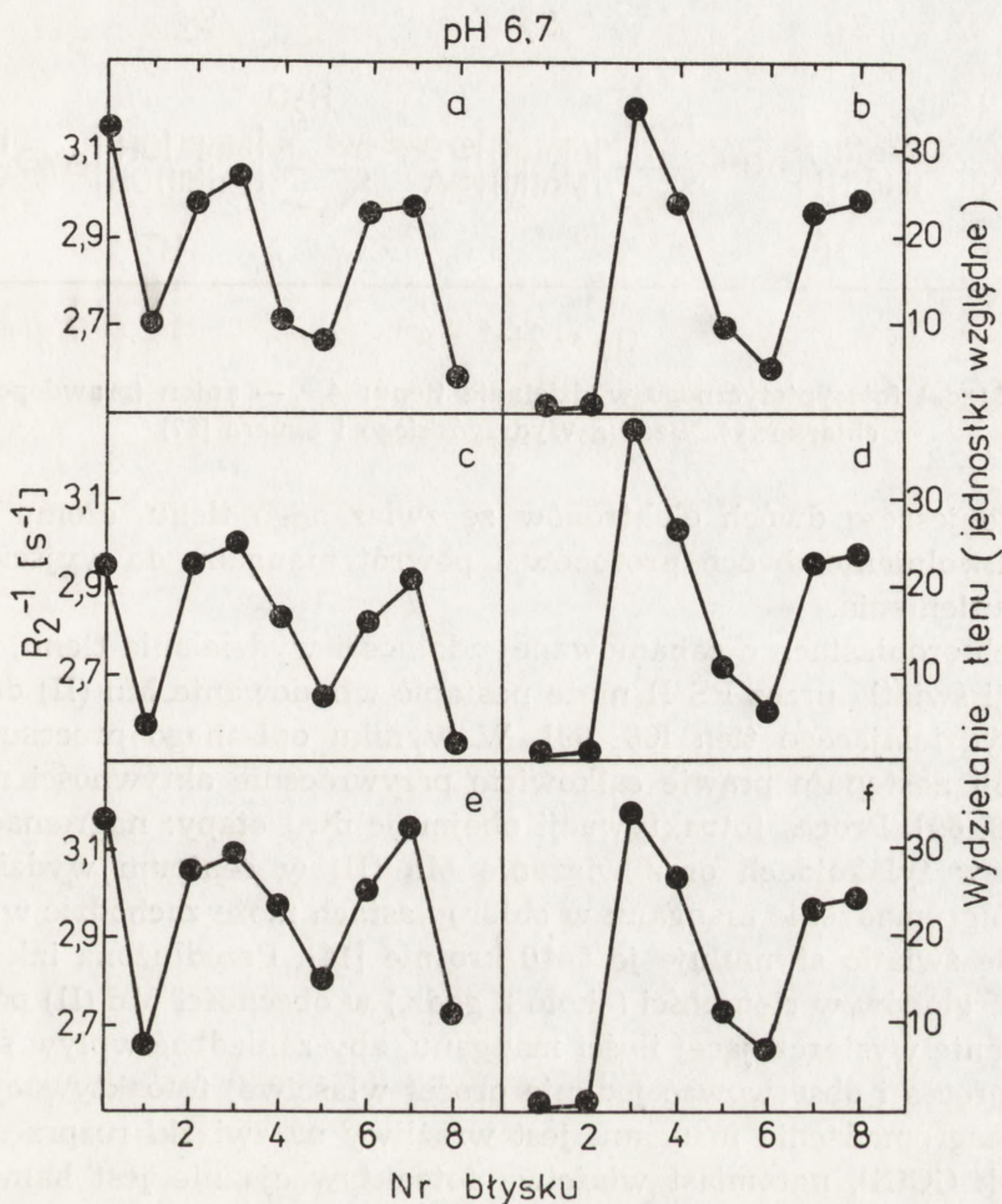


cić. Dowodzi to, że mangan jest przenośnikiem elektronów pomiędzy wodą a miejscem donatorowym DPC (ryc. 9) [50], na co wskazuje również możliwość cofania inhibicji reakcji Hilla wywołanej przez kwas linolenowy w obecności DPC [77].

Interesujące są badania dotyczące mechanizmu utleniania wody w procesie fotosyntezy oraz udziału w nim manganu. Utworzenie jednej cząsteczki tlenu wymaga usunięcia czterech elektronów z dwóch cząsteczek wody:  $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 e + 2 \text{H}^+ + \text{O}_2$ . Do napędzenia tego 4-elektronowego procesu potrzebne są przynajmniej 4 kwanty, przy czym potencjał 4 równoważników utleniających musi być wyższy niż 0,8 V [31]. Dla wydzielania jednej cząsteczki tlenu niezbędne jest współdziałanie 4 centrów reakcji lub nagromadzenia ładunku w pojedynczych centrach. Dane doświadczalne potwierdzają drugą z wymienionych możliwości. W przypadku mechanizmu współdziałania tlen powinien być wydzielany przez chloroplasty preinkubowane w ciemności po pierwszym błysku światła. Okazało się jednak, że maksymalne wydzielanie tlenu zachodzi dopiero po trzecim błysku światła, wskazując na konieczność nagromadzenia ładunku [31]. Niewykluczone, że układ ten zawiera mangan, tym bardziej że pierwiastek ten może występować na kilku różnych stopniach utlenienia [86, 87, 89]. Dzięki technice NMR stwierdzono, że mangan w chloroplastach występuje na II, III, IV i VII stopniu utlenienia [86–88]. Przeważa jednak Mn (II), który w środowisku wodnym jest stabilny [86, 87]. Podczas fotosyntezy zachodzą prawdopodobnie zmiany stopnia utlenienia manganu [6, 29, 48, 87, 89]. Z porównania wykresów przedstawiających wydzielanie tlenu oraz szybkość poprzecznej relaksacji protonowej wody w zależności od numeru błysku światła wynika, że oba procesy są ze sobą ściśle skorelowane (ryc. 10). Zarówno wydzielanie tlenu, jak i szybkość relaksacji mają charakter oscylacyjny o okresie 4. Ze względu na to, że zmiany szybkości relaksacji są odzwierciedleniem zmian stopnia utlenienia manganu, można stwierdzić, że wydzielaniu tlenu towarzyszą cykliczne zmiany stanu oksydoredukcyjnego manganu. Postuluje się, że są to zmiany Mn (II)/Mn (III). Niewielkie różnice pomiędzy tymi wykresami tłumaczy się faktem, że szybkości relaksacji mogą różnić się dla każdego ze stanów S, podczas gdy wydzielanie tlenu zachodzi tylko podczas przejścia  $S_4 \rightarrow S_0$  [89].

Wydrzyński i Sauer [87] są autorami modelu wydzielania tlenu, uwzględniającego zmiany stopnia utlenienia manganu. Z ich badań kinetycznych wynika, że centrum reakcji zawiera 2, a nie 4 atomy manganu, jak proponują Govindjee i wsp. [29]. W procesie fotosyntezy mangan podlega stopniowemu utlenieniu, a następnie redukcji [87], co jest zgodne z koncepcją, że woda podlega częściowemu utlenieniu przed uwolnieniem tlenu przez kompleks rozszczepiający wodę (ryc. 11).

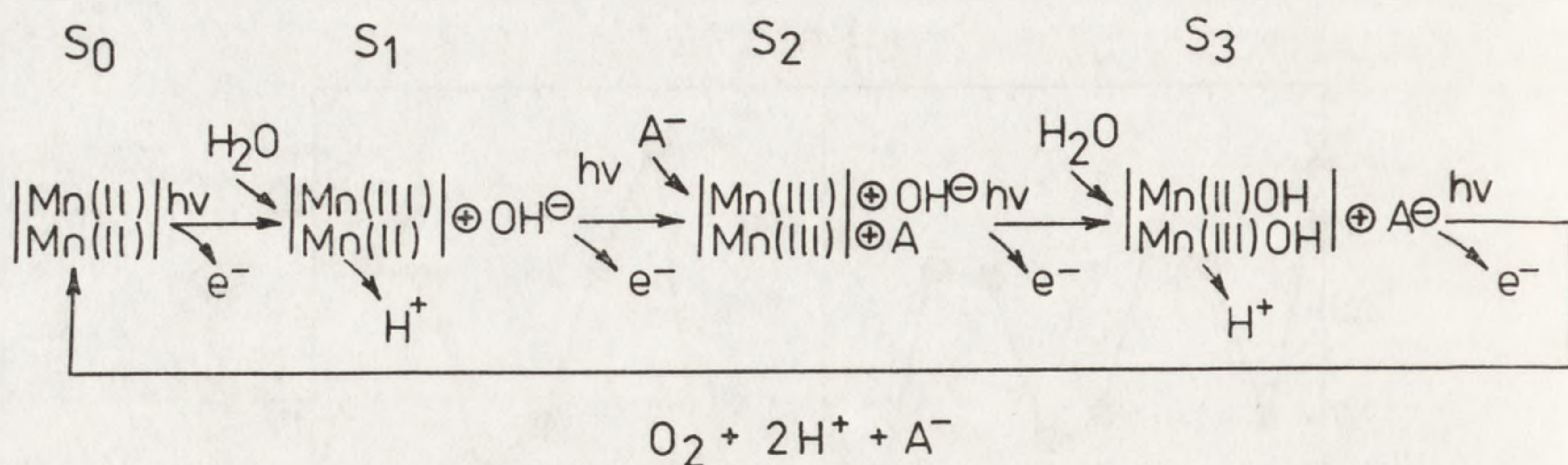




Ryc. 10. Szybkość poprzecznej relaksacji protonowej wody i wydzielanie tlenu jako funkcja nasycających błysków światła. Przedstawiono wyniki dla trzech prób błon chloroplastów grochu. Próby zawierały 2 mg chlorofilu/ml. Według Govindjee i wsp. [29]

W pierwszym etapie ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) następuje wzrost ładunku kompleksu rozszczepiającego wodę, kompensowany przez wiązanie anionu hydroksylowego pochodzącego z wody. W następnym etapie ( $S_1 \rightarrow S_2$ ), w przeciwieństwie do poprzedniego, nie następuje uwalnianie protonu. W tym etapie bierze udział anion  $A^-$ , prawdopodobnie chlorek, którego niezbędność dla fotosyntezy jest bezsprzeczna [41]. Następnie zachodzi ( $S_2 \rightarrow S_3$ ) związanie drugiego anionu hydroksylowego i wówczas dwa elektrony są przenoszone do atomów manganu, powodując obniżenie ich stopnia utlenienia. Na tym etapie tlen występuje w formie nadtlenu. Końcowy etap ( $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0 + O_2$ ) polega na wytworzeniu tlenu cząsteczkowego przez





Ryc. 11. Model fotosyntetycznego wydzielania tlenu;  $A^-$  — anion (prawdopodobnie chlorkowy). Według Wydrzyńskiego i Sauera [87]

usunięcie jeszcze dwóch elektronów ze związanego tlenu, czemu towarzyszy uwolnienie dwóch protonów i powrót manganu do wyjściowego stopnia utlenienia.

W chloroplastach o zahamowanej zdolności wydzielania tlenu, dzięki absorpcji światła przez PS II może nastąpić wbudowanie Mn (II) do centrum wydzielającego tlen [68, 69]. W wyniku opisanego procesu fotoaktywacji następuje prawie całkowicie przywrócenie aktywności reakcji Hilla [68, 69]. Proces fotoaktywacji obejmuje dwa etapy: nagromadzenie Mn (II) w tylakoidach oraz wiązanie Mn (II) w centrum wydzielania tlenu. Nagromadzenie manganu w chloroplastach może zachodzić w ciemności, ale światło stymuluje je 5–10 krotnie [14]. Przedłużona inkubacja komórek glonów w ciemności (około 2 godz.) w obecności Mn (II) pozwala na pobranie wystarczającej ilości manganu, aby zaniedbać wpływ światła na ten proces i obserwować jedynie proces właściwej fotoaktywacji [14]. Proces nagromadzenia manganu jest wrażliwy na związki rozprzegające, takie jak CCCP, natomiast właściwa fotoaktywacja nie jest hamowana przez takie związki [14].

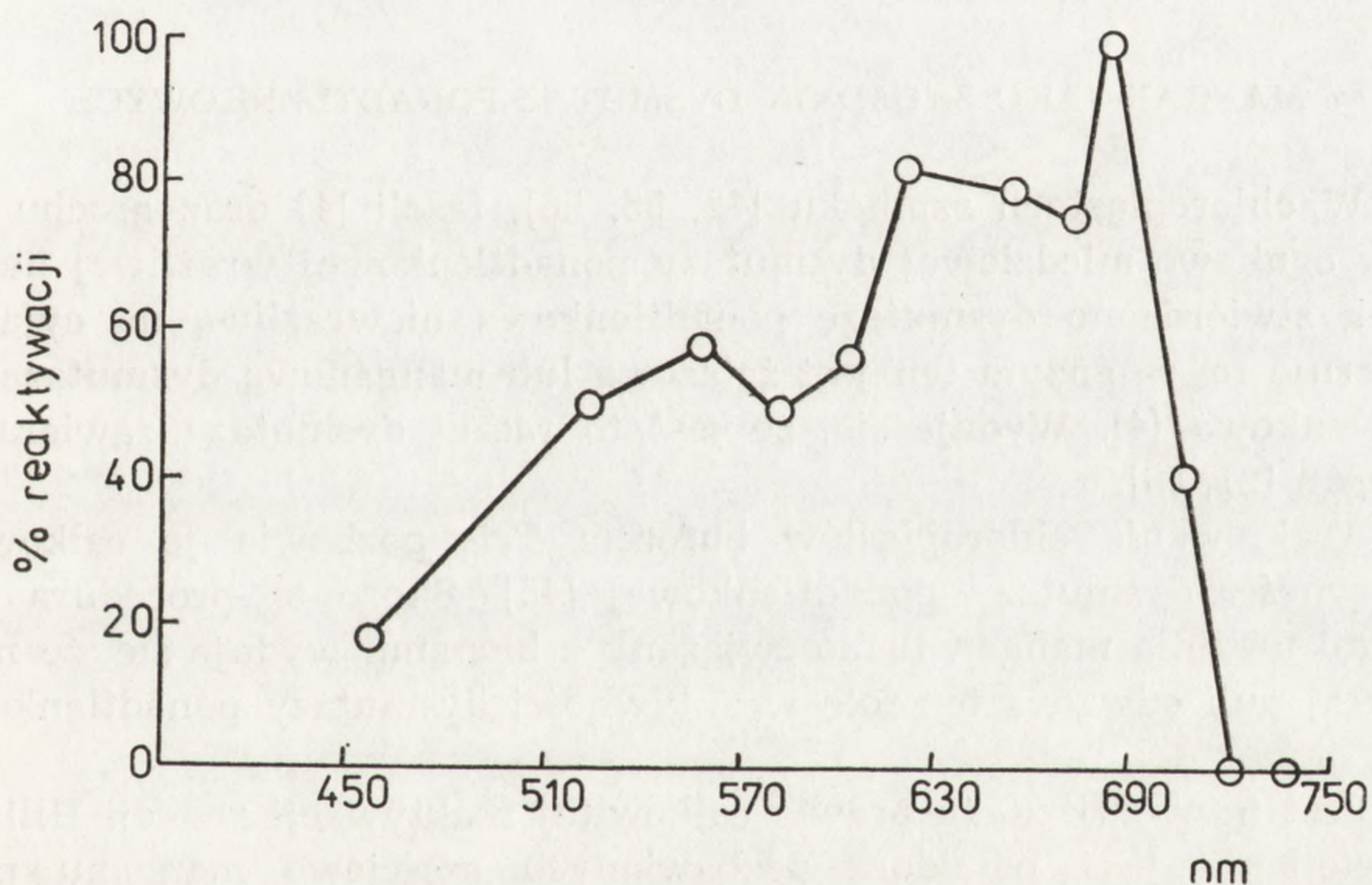
Proces fotoaktywacji wymaga przepływu elektronów przez PS II. Widmo charakterystyczne dla procesu fotoaktywacji wykazuje bowiem maksimum przy długości fali 680 nm absorbowanej przez oba układy fotosyntezy [27]. Natomiast przy długościach fali ponad 719 nm absorbowanych tylko przez PS I fotoaktywacja nie zachodzi (ryc. 12). Dowodzi to, że wzbudzenie tylko PS I nie jest wystarczające dla fotoaktywacji. Wydaje się nawet, że aktywność tego układu nie jest konieczna dla przywrócenia aktywności reakcji Hilla skoro fotoaktywację obserwowano u mutantu glonu *Scenedesmus* nr 8, pozbawionego PS I [68].

Proces fotoaktywacji nie wymaga tlenu ani dwutlenku węgla i dla jego przebiegu nie jest konieczna aktywność cyklu redukcyjnego [12]. Szybkość fotoaktywacji zależy od stężenia manganu [16] i od temperatury [37]. W temperaturze 5°C obserwowano jedynie 15% szybkości fotoaktywacji występującej w temperaturze 25°C [37]. Fotoaktywacja za-



chodzi z szybkością proporcjonalną do ilości nieaktywnych centrów wydzielających tlen [16, 67]. Sugeruje to, że aktywacja każdego centrum jest niezależna od sąsiednich centrów i nie ma wzajemnych oddziaływań pomiędzy nimi [16]. Wydaje się, że fotoaktywacja obejmuje dwie reakcje ciemne i dwie wymagające światła [16].

Według Blankenshipa i wsp. [7] w izolowanych chloroplastach szpinaku poddawanych reaktywacji po ekstrakcji manganu buforem Tris proces ten nie wymaga egzogenego manganu ani światła. Zastanawiające jest, że autorzy nie obserwowali w tych warunkach przemieszczania manganu poza chloroplasty. Wydaje się jednak, że o ile pobieranie manganu ze środowiska zewnętrznego jest reakcją napędzaną przez światło, włączanie go w tylakoidzie następuje w ciemności [7].



Ryc. 12. Widmo reaktywacji reakcji Hilla w liofilizowanych komórkach sinicy *Anacystis*. Według Gerhardta i Wiessnera [27]

Proces fotoaktywacji ma prawdopodobnie znaczenie fizjologiczne. Postuluje się, że występuje powszechnie u organizmów fotosyntetyzujących, wydzielających tlen podczas rozwoju ich aparatu fotosyntetycznego [66, 68]. Doświadczenia z zastosowaniem etioplastów pszenicy wykazały, że powstawanie puli manganu odpornej na działanie Tris następuje w ciemności [66]. Natomiast włączanie do błon tylakoidów manganu wrażliwego na Tris wymaga światła. 15 min oświetlenia wystarcza do zakończenia tego procesu z towarzyszącym mu uzyskaniem zdolności rozszczepiania wody przez plastydy. Jest jednak czasem zbyt krótkim dla bio-



syntezy białek. W związku z tym autorzy postulują istnienie rozgraniczenia czasowego obu procesów: fotoaktywacji i biosyntezy białek wiążących mangan. Biosynteza białek poprzedza fotoaktywację [11, 12, 66], która następuje stopniowo w miarę syntezy chlorofilu [66].

Przeprowadzono również próby rekonstrukcji aktywnego układu wydzielającego tlen po wyizolowaniu białka zawierającego mangan. Powiodły się one jedynie u sinicy *Phormidium luridum* [82]. Wyizolowany tzw. „czynnik Hilla” zawierający mangan przywracał zdolność do wydzielania tlenu [68, 82]. Natomiast w chloroplastach glonu *Scenedesmus* [11] wyizolowane i częściowo oczyszczone białko zawierające mangan okazało się nieefektywne w eksperymentach rekonstrykcyjnych. Niepowodzenia mogą wynikać z labilności białka lub z tego, że jest ono zlokalizowane po wewnętrznej stronie błon tylakoidów [9, 25, 32, 72, 84].

#### MANGAN JAKO SKŁADNIK DYSMUTAZ PONADTLLENKOWYCH

W chloroplastach szpinaku [42, 55, 56], fasoli [4] oraz grochu [21] obok cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej wrażliwej na cyjanek stwierdzono dysmutazę ponadtlenkową niewrażliwą na cyjanek. Sugeruje to, że enzym ten jest żelazową lub manganową dysmutazą ponadtlenkową [4]. Wydaje się, że jest to raczej dysmutaza zawierająca mangan [21, 56].

Traktowanie chloroplastów buforem Tris pozbawia je całkowicie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [45]. Skoro ta procedura ekstrakcji uwalnia mangan luźno związany z błonami, wydaje się, że mangan tej puli odgrywa też rolę w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [45].

Jest interesujące, że prawie całkowitej reaktywacji reakcji Hilla po naświetlaniu liści pomidora pozbawionych częściowo manganu przez przechowywanie ich w chłodzie i ciemności towarzyszy tylko częściowe odzyskanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [45]. Jest to wynikiem nieodwracalnej inaktywacji cynkowo-miedziowej dysmutazy ponadtlenkowej na skutek traktowania liści chłodem i ciemnością [61, 62].

#### UWAGI KOŃCOWE

Lumsden i Hall wysunęli interesującą hipotezę dotyczącą ewolucji białek zawierających mangan [56]. Autorzy sugerują wspólne pochodzenie białka zawierającego mangan, niezbędnego dla fotosyntetycznego wydzielania tlenu oraz manganowej dysmutazy ponadtlenkowej, a następnie niezależną ewolucję obu funkcji. Wydaje się, że najbliższej spo-



krewniony z hipotetycznym przodkiem tych białek jest tzw. „czynnik Hilla” wyizolowany z *Phormidium luridum*.

W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik eksperymentalnych (EPR, NMR), nastąpił znaczny postęp w badaniach mających na celu poznanie mechanizmu fotosyntetycznego wydzielania tlenu i udziału manganu w tym procesie. Jednak chociaż od blisko 50 lat udział manganu w fotosyntezie jest bezsporny, nie udało się stworzyć modelu utleniania wody popartego wystarczającymi dowodami doświadczalnymi. Opisywane dotąd mechanizmy mają w dużej mierze charakter hipotetyczny i wymagają dalszego wyjaśnienia, tym bardziej że ostatnio ukazała się praca poddająca w wątpliwość udział luźno związanego manganu w fotosyntetycznym wydzielaniu tlenu, przypisująca tę funkcję manganowi mocno związanemu z błonami [57].

Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania Panu Prof. Zbigniewowi Kaniudze za zasugerowanie tematu i cenne uwagi podczas przygotowania niniejszej pracy.

Część badań przedstawionych w artykule wykonano w ramach problemu węzłowego Nr 10.2.10 i międzyresortowego MR-II/15 oraz MR-II/7.

#### LITERATURA

- [1] ANDERSON J. M., BOARDMAN N. K., DAVID D. J., Trace metal composition of fractions obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**: 685–689, 1964.
- [2] ANDERSON J. M., PYLIOTIS N. A., Studies with manganese-deficient chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**: 280–293, 1969.
- [3] ANDREASSON L.-E., ARNESSON T., Effect of deoxycholate on oxygen evolution and manganese in chloroplasts, *FEBS Lett.*, **125**: 65–68, 1981.
- [4] ASADA K., KANEMATSU S., TAKAHASHI M., KONA Y., Superoxide dismutases in photosynthetic organisms, [w:] *Iron and copper proteins*, red. K. T. Yasunobu, H. F. Mower, O. Hayashi, Plenum Press, New York 1976, 551–564.
- [5] BABOCK G. T., SAUER K., Electron paramagnetic resonance signal II in spinach chloroplasts. I. Kinetic analysis for untreated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **325**: 483–503, 1973.
- [6] BACHOFEN R., Die Oxydation von Mangan durch Chloroplasten im Licht, *Z. Naturforsch.*, **21b**: 278–284, 1966.
- [7] BLANKENSHIP R. E., BABOCK G. T., SAUER K., Kinetic study of oxygen evolution parameters in Tris-washed, reactivated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **387**: 165–175, 1975.
- [8] BLANKENSHIP R. E., SAUER K., Manganese in photosynthetic oxygen evolution. I. Electron paramagnetic resonance study of the environment of man-



- ganese in Tris-washed chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **357**: 252–266, 1974.
- [9] BRAUN B. Z., GOVINDJEE, Antisera against a component on the oxygen-evolving side of system II reaction: antisera prepared against an extract from frozen and thawed chloroplasts, *Plant Sci. Lett.*, **3**: 219–227, 1974.
- [10] CHENIAE G. M., Photosystem II and O<sub>2</sub> evolution, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**: 467–498, 1970.
- [11] CHENIAE G. M., MARTIN I. F., Studies on the function of manganese in photosynthesis, [w:] *Energy conversion by the photosynthetic apparatus*, Brookhaven Symp. Biol., **19**: 406–417, 1966.
- [12] — Photoreactivation of manganese catalyst in photosynthetic evolution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**: 89–95, 1967.
- [13] — Site of manganese function in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **153**: 819–837, 1968.
- [14] — Photoactivation of manganese catalyst in photosynthetic oxygen evolution, *Plant Physiol.*, **44**: 351–360, 1969.
- [15] — Sites of function of manganese within photosystem II. Roles in O<sub>2</sub> evolution and system II, *Biochim. Biophys. Acta*, **197**: 219–239, 1970.
- [16] — Photoactivation of the manganese catalyst of O<sub>2</sub> evolution. I. Biochemical and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, **253**: 167–181, 1971.
- [17] — Effects of hydroxylamine on photosystem II. I. Factors affecting the decay of O<sub>2</sub> evolution, *Plant Physiol.*, **47**: 568–575, 1971.
- [18] — Effects of hydroxylamine on photosystem II, *Plant Physiol.*, **50**: 87–94, 1972.
- [19] — Absence of oxygen-evolving capacity in dark-grown *Chlorella*. The photoactivation of oxygen evolving centers, *Photochem. Photobiol.*, **17**: 441–459, 1973.
- [20] — Studies on the mechanism of Tris-induced inactivation of oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **502**: 321–344, 1978.
- [21] DEL RIO L. A., SEVILLA F., GÓMEZ M., YAÑEZ J., LÓPEZ J., Superoxide dismutase: an enzyme system for the study of micronutrient interactions in plants, *Planta*, **140**: 221–225, 1978.
- [22] DINER B. A., JOLIOT P., Oxygen evolution and manganese, [w:] *Encyclopedia of Plant Physiology*, tom 5, Photosynthesis I, red. A. Trebst, M. Avron, Springer Verlag, Berlin 1977, 187–205.
- [23] DUVAL D., DURANTON J., Cation localization on plastid membrane proteins from *Zea mays* L., *Photosynthetica*, **8**: 1–8, 1974.
- [24] EVANS M. C. W., Electron paramagnetic resonance studies in photosynthesis, [w:] *Topics in Photosynthesis*, tom 2, Primary Processes of Photosynthesis, red. J. Barber, Elsevier, Amsterdam 1977, 433–464.
- [25] FOWLER C. F., KOK B., Proton evolution associated with photooxidation of water in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **357**: 299–307, 1974.
- [26] FRASCH W. D., CHENIAE G. M., Flash inactivation of oxygen evolution. Identification of S<sub>2</sub> as the target of inactivation by Tris, *Plant Physiol.*, **65**: 735–745, 1980.
- [27] GERHARDT B., WIESSNER W., On the light-dependent reactivation of photosynthetic activity by manganese, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**: 958–964, 1967.
- [28] GOLBECK J. H., MARTIN I. F., FOWLER C. F., Mechanism of linolenic



- acid-induced inhibition of photosynthetic electron transport. *Plant Physiol.*, **65**: 707–713, 1980.
- [29] GOVINDJEE, WYDRZYNSKI T., MARKS S. B., The role of manganese in the oxygen evolving mechanism of photosynthesis, [w:] *Bioenergetics of Membranes*, red. G. C. Papageorgiou, A. Trebst, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York 1977, 305–316.
- [30] GUIGNERY G., LUZZATI A., DURANTON J., On the specific binding of protochlorophyllide and chlorophyll to different peptide chains, *Planta*, **115**: 227–243, 1974.
- [31] HARRIMAN A., BARBER J., Photosynthetic water-splitting process and artificial chemical systems, [w:] *Topics in Photosynthesis*, tom 3, *Photosynthesis in Relation to Model Systems*, red. J. Barber, Elsevier, Amsterdam 1979, 243–280.
- [32] HARTH E., REIMER S., TREBST A., Control of photosynthetic oxygen evolution by the internal pH of the chloroplast thylakoid. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by uncouplers at high pH and restoration of electron flow by an artificial electron donor for photosystem II, *FEBS Lett.*, **42**: 165–168, 1974.
- [33] HEATH R. L., The energy state and structure of isolated chloroplasts: the oxidative reactions involving the water-splitting step of photosynthesis, *Int. Rev. Cyt.*, **34**: 49–101, 1973.
- [34] HEATH R. L., HIND G., On the functional site of manganese in photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **189**: 222–233, 1969.
- [35] HENRIQUES F., PARK R. B., Compositional characteristics of a chloroform/methanol soluble protein fraction from spinach chloroplast membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **430**: 312–320.
- [36] HOLLOCHER T. C., Electron spin resonance, [w:] *Physical Techniques in Biological Research*, tom II B, red. D. H. Moore, Academic Press, New York, London 1969, 190–197.
- [37] HOMANN P. H., Studies on the manganese of the chloroplast, *Plant Physiol.*, **42**: 997–1007, 1967.
- [38] — Effects on the fluorescence of chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**: 229–234, 1968.
- [39] HORTON P., CROZE E., The relationship between the activity of chloroplast photosystem II and the midpoint oxidation-reduction potential of cytochrome b-559, *Biochim. Biophys. Acta*, **462**: 86–101, 1977.
- [40] ITOH M., YAMASHITA K., NISHI T., KONISHI K., SHIBATA K., The site of manganese function in photosynthetic electron transport system, *Biochim. Biophys. Acta*, **180**: 509–519, 1969.
- [41] IZAWA S., HEATH R. L., HIND G., The role of chloride ion in photosynthesis. III. The effect of artificial electron donors upon electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **180**: 388–398, 1969.
- [42] JACKSON C., DENCH J., MOORE A. L., HALLIWELL B., FOYER C. H., HALL D. O., Subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants, *Eur. J. Biochem.*, **91**: 339–344, 1978.
- [43] JOLIOT P., KOK B., Oxygen evolution in photosynthesis, [w:] *Bioenergetics of Photosynthesis*, red. Govindjee, Academic Press, New York 1975, 387–412.
- [44] KANIUGA Z., GEMEL J., MADZIO B., Fatty acid-induced  $Mn^{2+}$  release from chloroplasts of chilling sensitive plants, Second European Bioenergetics Conference, Lyon 1982, Short Reports 489–490.



- [45] KANIUGA Z., ZĄBEK J., MICHALSKI W. P., Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. IV. Cold and dark-induced changes in chloroplast superoxide dismutase activity in relation to loosely-bound manganese content, *Planta*, **145**: 145–150, 1979.
- [46] KANIUGA Z., ZĄBEK J., SOCHANOWICZ B., Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. III. Contribution of loosely bound manganese to the mechanism of reversible inactivation of Hill reaction activity following cold and dark storage and illumination of leaves, *Planta*, **144**: 49–56, 1978.
- [47] KAZICYNA L. A., KUPLETSKA N. B., *Metody spektroskopowe wyznaczania struktury związków organicznych*, Państwowe Wydawnictwa Naukowe, Warszawa 1974.
- [48] KENTEN R. H., MANN J. G., The oxidation of manganese by illuminated chloroplast preparations, *Biochemistry*, **61**: 279–286, 1955.
- [49] KESSLER E., ARTHUR W., BRUGGER J. E., The influence of manganese and phosphate on delayed light emission, fluorescence, photoreduction and photosynthesis in algae, *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**: 326–335, 1957.
- [50] KIMIMURA M., KATOH S., On the functional site of manganese in photosynthetic electron transport system, *Plant Cell Physiol.*, **13**: 287–296, 1972.
- [51] KOK B., CHENIAE G. M., Kinetics and intermediates of the oxygen evolution step in photosynthesis, [w:] *Current Topics in Bioenergetics*, tom 1, red. D. R. Sanadi, Academic Press, New York, London 1966, 1–47.
- [52] LAGOUTTE B., DURANTON J., Physicochemical study of structural proteins of chloroplast from *Zea mays* L., *Biochim. Biophys. Acta*, **253**: 232–239, 1971.
- [53] — A manganese protein complex within the chloroplast structures, *FEBS Lett.*, **51**: 21–24, 1975.
- [54] LOZIER R., BAGINSKY M., BUTLER W. L., Inhibition of electron transport in chloroplasts by chaotropic agents and the use of manganese as an electron donor to photosystem II, *Photochem. Photobiol.*, **14**: 323–328, 1971.
- [55] LUMSDEN J., HALL D. O., Soluble and membrane bound superoxide dismutases in a blue-green algae (*Spirulina*) and spinach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**: 35–41, 1974.
- [56] — Chloroplast manganese and superoxide, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 595–602, 1975.
- [57] MANSFIELD R., BARBER J., Manganese levels associated with inside-out thylakoid membranes in relation to oxygen evolution, *FEBS Lett.*, **140**: 165–168, 1982.
- [58] MARQUILES M. M., Effect of cold-storage of bean leaves on photosynthetic reactions of isolated chloroplasts. Inability to donate electrons to photosystem II and relation to manganese content, *Biochim. Biophys. Acta*, **267**: 96–103, 1972.
- [59] MERCER F. V., NITTIM M., POSSINGHAM J. V., The effect of manganese deficiency on the structure of spinach chloroplasts, *J. Cell. Biol.*, **15**: 379–381, 1962.
- [60] MICHALSKI W. P., KANIUGA Z., Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plants. VII. Comparison of effect of galactolipase treatment of chloroplasts and cold-storage of leaves on photosynthetic electron flow, *Biochim. Biophys. Acta*, **589**: 84–99, 1980.



- [61] — Photosynthetic apparatus of chilling-sensitive plants. X. Relationship between superoxide dismutase activity and photoperoxidation of chloroplast lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **637**: 159–167, 1981.
- [62] — Photosynthetic apparatus of chilling-sensitive plants. XI. Reversibility by light of cold- and dark-induced inactivation of cyanide-sensitive superoxide dismutase activity in tomato leaf chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **680**: 250–257, 1982.
- [63] MILDVAN A. S., COHN M., Aspects of enzyme mechanisms studied by nuclear spin relaxation induced by paramagnetic probes, [w:] *Advances in Enzymology*, tom 33, red. F. F. Nord, Interscience Publishers, New York, London, Sydney, Toronto 1970, 1–70.
- [64] MORTON R. K., Methods of extraction of enzymes from animal tissues, [w:] *Methods in Enzymology*, tom, 1, red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1955, 25–51.
- [65] PAPAGEORGIOU G., Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis, [w:] *Bioenergetics of Photosynthesis*, red. Govindjee, Academic Press, New York 1975, 319–371.
- [66] PHUNG-NHU-HUNG S., HOULIER B., MOYSE A., Mn content changes in wheat etioplast membranes during greening under intermittent or continuous light, *Plant Sci. Lett.*, **6**: 243–251, 1976.
- [67] RADMER R., CHENIAE G. M., Photoactivation of the manganese catalyst of O<sub>2</sub> evolution II. A two-quantum mechanism, *Biochim. Biophys. Acta*, **253**: 182–186, 1971.
- [68] — Mechanisms of oxygen evolution, [w:] *Topics in Photosynthesis*, tom 2, *Primary Processes of Photosynthesis*, red. J. Barber, Elsevier, Amsterdam 1977, 303–348.
- [69] RADMER R., KOK R., Energy capture in photosynthesis: photosystem II, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**: 409–433, 1975.
- [70] ROBINSON H. H., SHARP R. R., YOCUM C. F., NMR relaxivity changes in chloroplast suspensions. Effects of NH<sub>2</sub>OH and of treatments altering the redox state of photosynthetic electron transport chain, *Biochim. Biophys. Acta*, **593**: 414–426, 1980.
- [71] — Effect of manganese on nuclear magnetic relaxivity of water protons in chloroplast suspensions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**: 755–761, 1980.
- [72] — Topology of NH<sub>2</sub>OH induced Mn (II) release from chloroplast thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **636**: 144–152, 1981.
- [73] SELMAN B. R., BANNISTER T. T., DILLEY R. A., Trypsin inhibition of electron transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **292**: 566–581, 1973.
- [74] SHARP R. R., YOCUM C. F., Field-dispersion profiles of the proton spin-lattice relaxation rate in chloroplast suspension. Effect of manganese extraction by EDTA, Tris and hydroxylamine, *Biochim. Biophys. Acta*, **592**: 185–195, 1980.
- [75] — Factors influencing hydroxylamine inactivation of photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **635**: 90–104, 1981.
- [76] SIDERER Y. S., MALKIN G., POUPKO R., LUZ Z., Electron spin resonance and photoreaction of Mn(II) in lettuce chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**: 174–182, 1977.



- [77] SIEGENTHALER P-A., Inhibition of photosystem II electron transport in chloroplasts by fatty acids and restoration of its activity by  $Mn^{2+}$ , FEBS Lett., **39**: 337-340, 1974.
- [78] SIEGENTHALER P-A., HORAKOVA J., Control of photosynthetic electron transport by free fatty acids and  $Mn^{2+}$  salts, [w:] Proc. 3 rd Int. Photosynthesis Congr., tom 1, red. M. Avron, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York 1975, 655-664.
- [79] SPENCER D., POSSINGHAM J. V., The effect of manganese deficiency on the photophosphorylation and oxygen-evolving sequence in spinach chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta, **52**: 379-381, 1961.
- [80] SZCZEPANIAK W., Metody instrumentalne w analizie chemicznej, Państwowe Wydawnictwa Naukowe, Warszawa, Poznań 1979.
- [81] TAKAHASHI M., ASADA K., Removal of Mn from spinach chloroplasts by sodium cyanide and the binding of  $Mn^{2+}$  to Mn-depleted chloroplasts, Eur. J. Biochem., **64**: 445-452, 1976.
- [82] TEL-OR E., AVRON M., Isolation and characterization of a factor which restores the Hill reaction from *Phormidium luridum*, [w:] Proc. 3 rd Int. Photosynthesis Congr., tom 1, red. Avron, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York 1975, 569-578.
- [83] TEL-OR E., STEWART W. D. P., Manganese and photosynthetic oxygen evolution by algae, Nature, **258**: 715-716, 1975.
- [84] TREBST A., Energy conservation in photosynthetic electron transport of chloroplasts, Ann. Rev. Plant Physiol., **25**: 423-458, 1974.
- [85] UDELNOV T. M., BOICHENKO E. A., Sojedinienie marganca z galaktolipidami listiew', Biochimia, **32**: 779-785, 1967.
- [86] WYDRZYNSKI T. J., MARKS S. B., SCHMIDT P. G., GOVINDJEE, GUTOWSKY H. S., Nuclear magnetic relaxation by the manganese in aqueous suspensions of chloroplasts, Biochemistry, **17**: 2155-2162, 1978.
- [87] WYDRZYNSKI T., SAUER K., Periodic changes in the oxidation state of manganese in photosynthetic oxygen evolution upon illumination with flashes, Biochim. Biophys. Acta, **589**: 56-70, 1980.
- [88] WYDRZYNSKI T., ZUMBULYADIS N., SCHMIDT P. G., GOVINDJEE, Water proton relaxation as a monitor of membrane-bound manganese in spinach chloroplasts, Biochim. Biophys. Acta, **408**: 349-354, 1975.
- [89] WYDRZYNSKI T., ZUMBULYADIS P. G., SCHMIDT P. G., GUTOWSKY H. S., GOVINDJEE, Proton relaxation and charge accumulation during oxygen evolution in photosynthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**: 1196-1198, 1976.
- [90] YAMASHITA T., BUTLER W. L., Photoreduction and photophosphorylation with Tris-washed chloroplasts, Plant Physiol., **43**: 1978-1986, 1968.
- [91] YAMASHITA T., TOMITA G., Effects of manganese, calcium, dithiothreitol and bovine serum albumine on the light-reactivation of Tris-acetone-washed chloroplasts, Plant Cell Physiol., **15**: 69-82, 1974.
- [92] — Comparative study of reactivation of oxygen evolution in chloroplasts inhibited by various treatments, Plant Cell Physiol., **16**: 283-296, 1975.
- [93] — Light-reactivation of (Tris-washed)-DPIP-treated chloroplasts: manganese incorporation chlorophyll fluorescence, action spectrum and oxygen evolution, Plant Cell Physiol., **17**: 571-582, 1976.
- [94] YAMASHITA T., TSUJI J., TOMITA G., Reactivation of the Hill reaction of Tris-washed chloroplasts, Plant Cell Physiol., **12**: 117-126, 1971.



- [95] YAMASHITA T., TSUJI-KANEKO J., YAMADA Y., TOMITA G., Manganese content, fluorescence yields and the effect of chloride ion on Hill reaction activity of Tris-washed and reactivated chloroplasts, *Plant Cell Physiol.*, 13: 353-364, 1972.

*Otrzymano: 3 sierpnia 1982.*

*Przyjęto: 4 października 1982.*

*Adres autora: Al. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa.*



WYKŁADY Z HISTORII WYKŁADY  
WYKŁADY Z HISTORII WYKŁADY  
WYKŁADY Z HISTORII WYKŁADY



## BIOCHEMIA GŁÓWNYCH ANTYGENÓW ZGODNOŚCI TKANKOWEJ H-2 MYSZY I HLA CZŁOWIEKA

### BIOCHEMISTRY OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS OF MOUSE H-2 AND MAN HLA

Michał WITT

Zakład Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

*Streszczenie:* Główne antygeny zgodności tkankowej kodowane są w obrębie kompleksu H-2 mysiego chromosomu 17. Loci H-2 charakteryzują się dużym polimorfizmem genetycznym. W swej strukturze mysie antygeny H-2 wykazują znaczną homologię z ludzkimi antygenami HLA. Antygeny H-2 są glikoproteidami błonowymi zbudowanymi z łańcucha ciężkiego (m. cz. 47 000) i niekowalencyjnie z nim związanej  $\beta_2$ -mikroglobuliny (m. cz. 12 000). Łańcuch ciężki zanurzony jest w błonie komórkowej i w swej części zewnątrzkomórkowej ma dołączone dwie złożone reszty węglowodanowe. Antygeny H-2 odpowiedzialne są m. in. za szybkie odrzucenie przeszczepu. Jako białka błonowe syntetyzowane są w postaci prekursorów, podlegającym obróbce (proteoliza, glikozylacja) w obrębie komórki. Postuluje się, że geny kodujące antygeny zgodności tkankowej oraz immunoglobuliny powstały przez niezależną ewolucję jednego wspólnego genu pierwotnego.

*Summary:* Major histocompatibility antigens are coded within H-2 complex of 17th murine chromosome. H-2 loci are very polymorphic and their products are similar in the structure to human HLA antigens. H-2 antigens are membrane glycoproteins consisting of heavy chain (m.w. 47 000) and noncovalently bound  $\beta_2$ -microglobulin (m.w. 12 000). The heavy chain is anchored in cell membrane and connected with two oligosaccharide residues of complex type in its extracellular part. H-2 antigens are responsible for rapid rejection of transplant. These membrane proteins are synthesized as precursors being modified (proteolysis, glycosylation) within the cell. Genes coding for histocompatibility antigens and immunoglobulins are probably the final effect of independent evolution of common ancestral gene.

#### I. WSTĘP

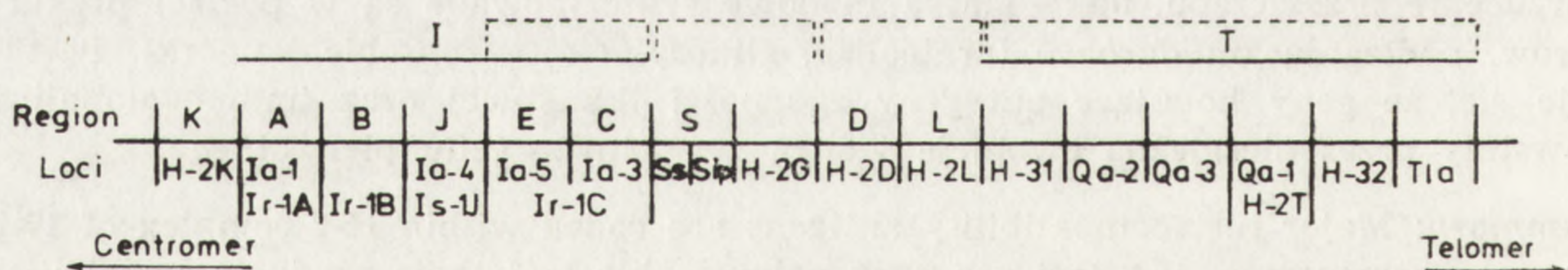
Jeszcze do niedawna immunochemia i immunogenetyka zajmowały się przede wszystkim strukturą i kodowaniem immunoglobulin. W ciągu ostatnich dziesięciu lat do miana niemniej istotnego przedmiotu badań



biochemicznych i genetycznych na polu tych nauk urosły główne antygeny zgodności tkankowej — u człowieka zwane HLA (Human Leukocyte A), u myszy H-2 (Histocompatibility-2). Niniejszy artykuł oparłem przede wszystkim na wynikach badań lepiej poznanego modelu mysiego i omówię w nim aspekty strukturalno-funkcjonalne klasycznych antygenów zgodności tkankowej H-2 odpowiedzialnych za szybkie odrzucanie przeszczepów, a kodowanych przez loci H-2K, H-2D i H-2L, znajdujące się w obrębie kompleksu H-2.

Geny głównego kompleksu zgodności tkankowej H-2 myszy są zlokalizowane w środkowej części chromosomu 17, jednego z najkrótszych mysich chromosomów. Poza genami kompleksu H-2 w chromosomie 17 zidentyfikowano również trzy inne grupy genów: kontrolujące różnicowanie embrionalne (loci Tt, Kb, Fu, qk), kontrolujące wzrost sierści (loci th, thf) i kodujące niektóre izoenzymy (loci P<sub>gk</sub>-2, Ce-2, Apl, Glo-1, Map-2) [18].

Obecnie przyjmuje się, że kompleks H-2 zajmuje odcinek chromosomu długości 1,5 centimorgana i ograniczony jest dwoma loci — od strony centromeru locus H-2K i od strony telomeru locus T1a (ryc. 1). Dwa loci kompleksu H-2: H-2K i H-2D oddalone są od siebie o 0,3 centimorgana. Mapa tego kompleksu podzielona jest na 5 regionów (K, I, S, D i T); region I zawiera 5 podregionów. Jak dotąd zidentyfikowano 18 loci kompleksu, jednakże pozycje mapowe nie wszystkich z nich są wystarczająco udokumentowane [20].



Ryc. 1. Mapa genetyczna kompleksu H-2 obecnego w 17 chromosomie myszy. Klamry u góry oznaczają, że kolejność loci wewnątrz nie jest znana [20]

Ze względu na ekspresję fenotypową loci kompleksu H-2 mogą być podzielone na trzy zasadnicze klasy [19]. Loci klasy I kodują związane z błoną komórkową glikoproteidy o masie cząsteczkowej ok. 47 000. Są to główne antygeny transplantacyjne H-2K, H-2D i H-2L (których struktura zostanie dokładniej omówiona w dalszej części artykułu) [15, 28].

Do antygenów klasy I bardzo zbliżone są antygeny kodowane przez loci zlokalizowane na prawo od locus H-2D; są to: antygeny Qa-1 [8], Qa-2 [27] oraz TL [30]. Wszystkie te antygeny posiadają łańcuch długości ok. 350 aminokwasów zasocjowany z łańcuchem lekkim długości ok.



100 aminokwasów i masie cząsteczkowej 12 000, zidentyfikowanym jako  $\beta_2$ -mikroglobulina.

Do klasy II należą loci Ia (immune associated) i Ir (immune response). Dwa dobrze zdefiniowane geny Ia kodują glikoproteidy błonowe składające się z dwóch niekowalencyjnie związanych podjednostek białkowych:  $\alpha$  (m.cz. 35 000) i  $\beta$  (m.cz. 28 000) oraz nieznaney liczby łańcuchów węglowodanowych [9]. Produkty genów Ia są odpowiedzialne za aktywację limfocytów w mieszanej hodowli limfocytów i indukcję limfocytów cytotoksycznych. Geny Ir regulują odpowiedź immunologiczną, wzmacniając ją lub osłabiając. Dotąd scharakteryzowano trzy geny wzmacniające i jeden gen supresorowy. Wzajemna zależność genów Ia i Ir nie jest całkowicie jasna, choć niektórzy autorzy twierdzą, że geny Ia nie różnią się od genów Ir i de facto są genami Ir [20].

Geny klasy III kodują białka osocza krwi: Ss (serum serological) i Slp (sex-limited protein). Oba białka mają masę cząsteczkową ok. 200 000 składają się z trzech kowalentnie połączonych łańcuchów polipeptydowych:  $\alpha$  (m. cz. 87 000),  $\beta$  (m. cz. 78 000) i  $\gamma$  (m. cz. 33 000), stanowiąc składnik C4 klasycznego toru aktywacji dopełniacza. Wymienione trzy łańcuchy powstają na drodze enzymatycznego rozszczepienia jednego wspólnego prekursora białkowego i stąd kodowane są prawdopodobnie przez pojedynczy gen [12].

Jedną z najciekawszych i najbardziej charakterystycznych cech loci H-2 jest ich duży polimorfizm genetyczny. Termin ten oznacza, że w populacji indywidualnych loci H-2 występuje tak wielka częstość różnych alleli, że źródła tego zjawiska nie można dopatrywać się w spontanicznie zachodzących mutacjach punktowych. Zwykle przez polimorfizm genetyczny rozumie się występowanie dwóch lub, rzadziej, trzech alleli w jednym locus. W dodatku kręgowce na ogół są homozygotyczne w loci polimorficznych, tzn. posiadają dwa takie same allele danego genu na obu homologicznych chromosomach. Zwykle mniej niż 10% osobników danej populacji wykazuje heterozygotyczność polimorficznych loci.

W przypadku genów kompleksu H-2 sytuacja jest całkowicie odmienna. Badając częstość występowania poszczególnych alleli w loci H-2K i H-2D w populacji myszy dzikich [54] stwierdzono, że najczęściej występujące allele tych genów wykazano zaledwie w 12% badanych myszy. Olbrzymia większość pozostałych alleli występowała z częstością mniejszą niż 2%. Poza tym aż ponad 90% myszy było heterozygotycznych w loci H-2K i H-2D. W sumie jak dotąd wykazano istnienie 56 alleli locus H-2K i 45 alleli locus H-2D, co daje ponad 2500 różnych kombinacji, w jakich allele te mogą występować [20]. Biorąc pod uwagę wysoki stopień heterozygotyczności genów H-2 oraz fakt, że w kompleksie H-2 jest znacznie więcej loci, zmienność populacji w obrębie tego



kompleksu wydaje się niezwykła. Bez wątplenia jest to najbardziej polimorficzny system spośród wszystkich grup genów mysich.

## II. ROZMIESZCZENIE ANTYGENÓW H-2, IZOLACJA I ICH ORGANIZACJA PRZESTRZENNA

Oceny rozmieszczenia antygenów H-2 na powierzchni komórek różnych tkanek dokonuje się dwoma metodami — histogenetyczną i serologiczną. Wyniki pomiarów dokonane obydwoma metodami wykazały, że najwięcej cząsteczek H-2 znajduje się na powierzchni komórek śledziony mysiej. Jak obliczono [23], na powierzchni jednej komórki znajduje się ok.  $5 \times 10^5$  cząsteczek antygenów transplantacyjnych. Jeśli liczbę tę przyjmując za 100%, to ekspresja antygenów H-2 na powierzchni komórek innych tkanek wynosi: węzły chłonne 65%, wątroba 50%, grasica, płuca, trzustka i jelito 25%, nerka 12%, ślinianki 10%. Ekspresję H-2 w granicach 1–2% stwierdzono na powierzchni erytrocytów, komórek serca, mózgu, jąder i mięśni szkieletowych [18].

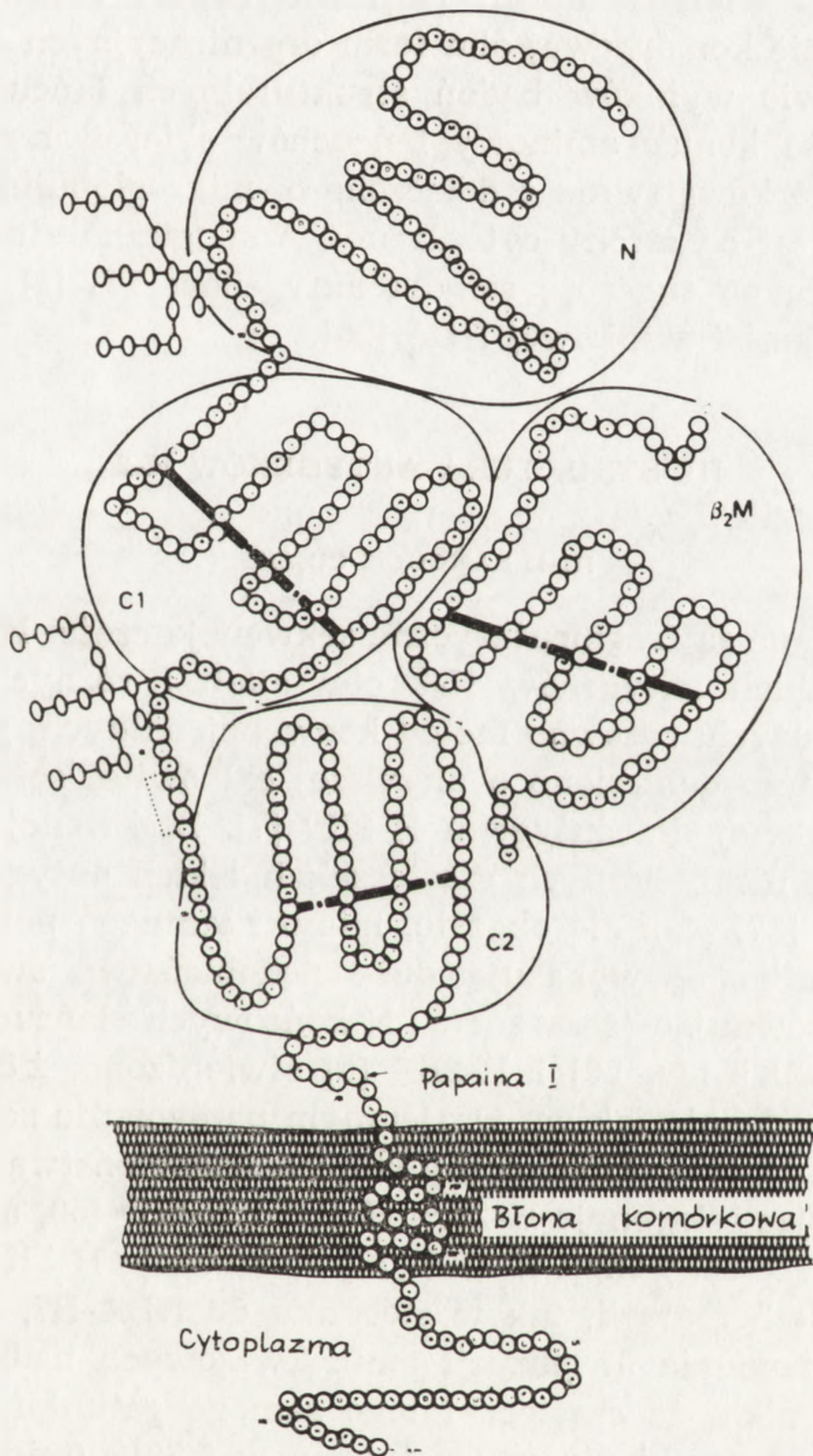
Bardzo wydajnym i wygodnym do badań biochemicznych źródłem antygenów H-2 są również komórki przeszczepialnych nowotworów (np. chłoniaki, komórki białaczkowe), które w postaci wysiękowej mogą być pasażowane w myszach linii wsobnych [53].

Antygeny zgodności tkankowej, jako integralne białka błonowe, wymagają specjalnych metod izolacji. Dwie z obecnie stosowanych, umożliwiających uwolnienie cząsteczek z błony powierzchniowej, to solubilizacja błon detergentami niejonowymi (Nonidet P-40, Triton X-100) [11] lub proteoliza przy użyciu papainy [45], a następnie immunoprecypitacja przy użyciu specyficznych surowic. Powstałe kompleksy antygen—przeciwciała wydziela się z roztworu przy użyciu immunoabsorbentów, specyficznie oddziałujących z fragmentem Fc IgG. Do tego celu używa się utrwalonej formaliną bakterie *Staphylococcus aureus* lub Sepharozę sprzężoną z białkiem A (Protein A-Sepharose) [10].

Przy użyciu tych metod stwierdzono, że główne antygeny zgodności tkankowej H-2 myszy, podobnie jak antygeny HLA stanowiące ich ludzki odpowiednik, są zbudowane z dwóch niekwalencyjnie połączonych łańcuchów polipeptydowych: ciężkiego o masie cząsteczkowej ok. 47 000, zawierającego determinanty antygenowe i reszty węglowodanowe [43] oraz łańcucha lekkiego o masie cząsteczkowej 12 000, zidentyfikowanego jako  $\beta_2$ -mikroglobulina [36]. Łańcuch ciężki przechodzi w poprzek błony komórkowej i swym końcem karboksylowym kontaktuje się z cytoplazmą komórki, zakotwicząc jednocześnie całą cząsteczką antygeny w błonie. W większym, zewnątrzkomórkowym N-końcowym fragmencie łańcucha ciężkiego wyróżnić można trzy globularne domeny [7] (ryc. 2).



Niecałkowicie wyjaśniona jest organizacja antygenów H-2 na powierzchni komórki. Wiadomo, że po rozpuszczeniu błony detergentem uzyskuje się dimer dwóch łańcuchów ciężkich z dwiema cząsteczkami  $\beta_2$ -mikroglobuliny o masie cząsteczkowej 116 000 i stałej sedymentacji 5.9S [16]. Łańcuchy ciężkie połączone są pojedynczym mostkiem S—S.



Ryc. 2. Schemat struktury i orientacji w błonie antygenu H-2K<sup>b</sup>. N, C1, C2 — globularne domeny w zewnątrzkomórkowej części łańcucha ciężkiego.  $\beta_2$ M —  $\beta_2$ -mikroglobulina, Papaina I — główne miejsce działania papainy, kropkowana klamra oznacza dodatkowe miejsce działania papainy. Symbolami owalnymi oznaczono składowe boczne reszty cukrowcowe, mostki S-S oznaczono czarnymi liniami [7]



Acylacja powierzchni komórki przy użyciu jodoacetamidu przed zadzia-  
łaniem detergentem powoduje izolację monomerów: łańcuch ciężki (H) +  
+  $\beta_2$ -mikroglobulina (L), co dowodzi, że wiązania dwusiarczkowe są arte-  
faktem powstającym w trakcie lub po ekstrakcji detergentem. Sugeruje  
się, że na powierzchni komórki antygeny występują w postaci mono-  
merycznej, zaś ich dimeryzacja w roztworze detergentu spowodowana  
jest tworzeniem wielkich miceli [43]. Nie można również wykluczyć  
istnienia w błonie komórkowej obu form organizacyjnych antygeny [16].

Na podstawie wyników badań strukturalnych łańcuchów ciężkich  
wnioskowano, że koniec aminowy łańcuchów skierowany jest w prze-  
strzeń pozakomórkową (wraz z dołączoną  $\beta_2$ -mikroglobuliną), zaś koniec  
karboksylowy jest od strony cytoplazmy. Analogiczną strukturę i orga-  
nizację przestrzenną sugeruje się dla antygenów TL [1] oraz ludzkich  
antygenów zgodności tkankowej HLA [20].

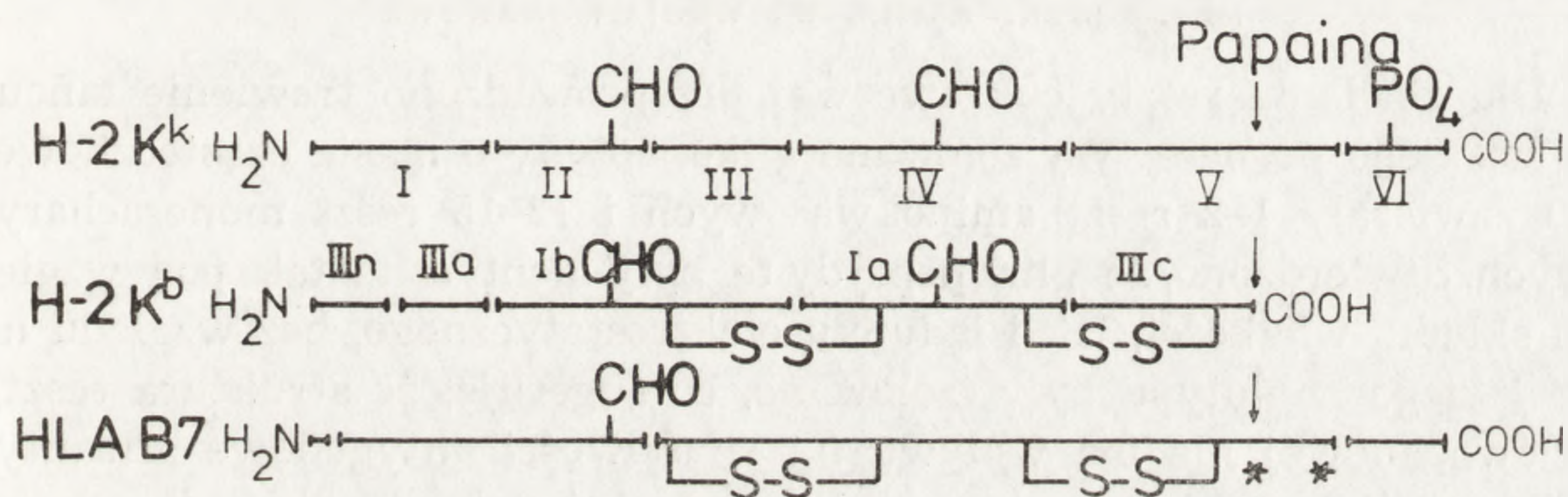
### III. STRUKTURA ANTYGENÓW H-2

#### III-1. ŁAŃCUCH CIĘŻKI

Obecnie znane są fragmentaryczne sekwencje części N-terminalnych  
łańcuchów ciężkich antygenów H-2 obu alleli i różnych haplotypów,  
uzyskane przy użyciu zarówno metod konwencjonalnych, jak i radioche-  
micznych. Ostatnio doniesiono o pierwszej całkowitej sekwencji amino-  
kwasowej, ustalonej dla antygeny H-2K<sup>b</sup> [7]. Zsekwencjonowano rów-  
nież fragmenty nieallelicznych cząsteczek ludzkich antygenów HLA-B7  
[25] i HLA-A2 [37]. Jak się okazało, mimo znacznego polimorfizmu ge-  
netycznego, białka te wykazują duże podobieństwa swej I-rzędowej  
struktury. Porównując sekwencje N-końcowych łańcuchów ciężkich  
H-2K<sup>k</sup> [39], H-2K<sup>b</sup> [39, 50] i H-2K<sup>a</sup> [5] stwierdzono  $\pm 85\%$  homologii  
strukturalnej, podobnie jak we wzajemnym porównaniu sekwencji HLA-  
B7 [25] i HLA-A2 [37]. Analogiczny stopień podobieństwa ( $85\%$ ) stwier-  
dzono porównując sekwencje H-2K<sup>b</sup>, H-2D<sup>d</sup> i H-2D<sup>b</sup> [50, 53] oraz wstęp-  
ne dane dotyczące sekwencji H-2K<sup>d</sup> [16]. Sekwencje H-2K<sup>k</sup> i H-2K<sup>b</sup> wy-  
kazują ok.  $70\%$  homologii, tak w stosunku do HLA-B7, jak i HLA-A2  
[39, 50]. Z zestawienia 97 pozycji aminokwasowych nadających się do  
porównania wynika, że cząsteczki tego samego gatunku są identyczne  
w  $\pm 85\%$ , zaś cząsteczki różnych gatunków w  $\pm 70\%$  (mimo że łańcuchy  
ciężkie H-2K<sup>k</sup> i H-2K<sup>b</sup> są produktami tego samego locus, HLA-B7 i HLA-  
A2 zaś produktami oddzielnych loci). Prawie wszystkie różnice w skła-  
dzie aminokwasowym pomiędzy H-2 i HLA mogą być wywołane zamia-  
nami pojedynczych zasad w kodzie genetycznym i zaledwie 65 takich  
substytucji wystarczy dla całkowitej wzajemnej zamiany sekwencji HLA-



-B7 i H-2K<sup>b</sup>. Większość różnic w sekwencji tych antygenów zgrupowana jest pomiędzy pozycjami 61–82 obu łańcuchów, gdzie na 22 reszt aminokwasowych, identycznych jest tylko 8 (36% homologii). Część wzajemnych zamian reszt aminokwasowych w tym regionie wymaga substytucji dwóch lub trzech par zasad w odpowiednich kodujących je sekwencjach DNA [5, 50]. Stwierdzono również, że w łańcuchu ciężkim H-2 istnieją dwa mostki dwusiarczkowe między resztami cysteinowymi w pozycjach 101 i 164 oraz 203 i 259, analogicznie jak w cząsteczce HLA [47]. Za pomocą znakowania izotopem fosforu (<sup>32</sup>P) stwierdzono obecność reszty fosfoserylowej w części karboksylowej łańcucha ciężkiego H-2 [39], jak



Ryc. 3. Porównanie modeli struktury łańcuchów ciężkich antygenów H-2K<sup>k</sup>, H-2K<sup>b</sup> i HLA-B7. Poziome linie oznaczają wielkość fragmentów uzyskiwanych w wyniku rozszczepienia łańcuchów w miejscu reszt metionylowych metodą cyjanobromową. Gwiazdki ograniczają hydrofobowy fragment zakotwiczący antygen w błonie. CHO oznacza reszty węglowodanowe, PO<sub>4</sub> reszty fosfoserylowe [46]

i HLA [34]. Fosforylacja cytoplazmatycznej części białka integralnego błony (jakimi są antygeny H-2 i HLA) umożliwia spekulacje na temat roli tego zjawiska w interakcji antygenów (i innych białek integralnych błon) z elementami cytoplazmatycznymi i regulacją funkcji komórki [37]. Nie można wykluczyć jednak, że obserwowana fosforylacja jest artefaktem powstającym w trakcie lub po ekstrakcji detergentem. Miejsce przyczepu łańcuchów węglowodanowych stwierdzono w pozycjach 86 i 176 łańcucha ciężkiego H-2, używając do tego celu podwójnego znakowania białka (<sup>3</sup>H)-fukozą i (<sup>14</sup>C)-aminokwasami [39, 50] (ryc. 3, por. też ryc. 2). Antygeny H-2 mają po dwie reszty cukrowcowe, każda o masie cząsteczkowej ok. 3000, podczas gdy antygeny HLA tylko jedną resztę w pozycji porównywalnej z jedną resztą w łańcuchu H-2. Znaczenie obecności dodatkowej reszty cukrowcowej w cząsteczce H-2 jest nieznane.

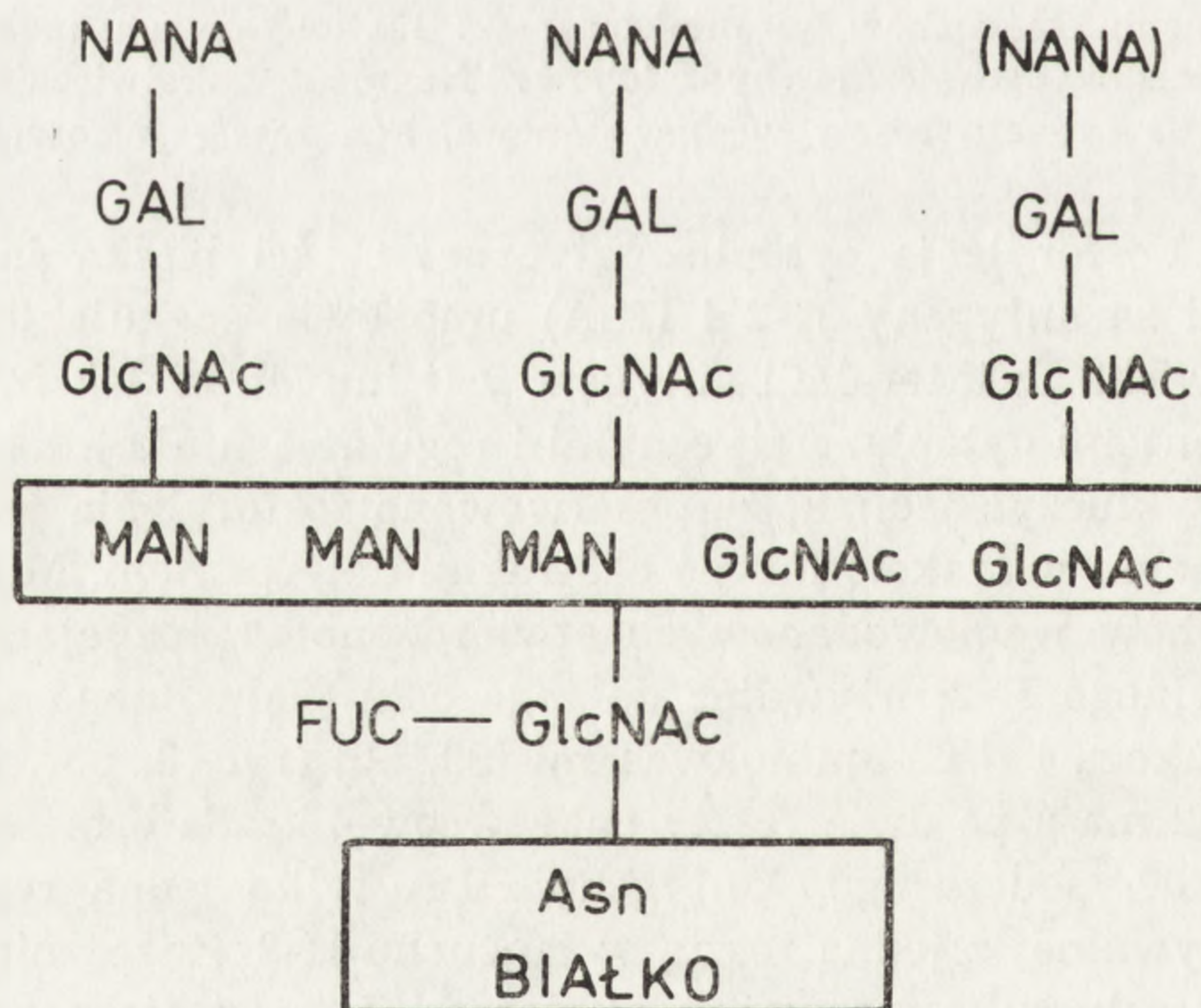
Na podstawie badań serologicznych i immunochemicznych [15], przynajmniej w niektórych haplotypach, poznano trzeci silny antygen transplantacyjny, kodowany przez locus H-2L, ściśle związany z locus H-2D (nie ulegają rozdzieleniu podczas rekombinacji) (ryc. 1). Badania sek-



wencyjne cząsteczki H-2L<sup>d</sup> wykazały homologię z sekwencjami H-2K<sup>b</sup>, H-2D<sup>b</sup> i H-2K<sup>d</sup> odpowiednio w 78, 82 i 80%, co pozwoliło zaklasyfikować ten antygen faktycznie jako trzeci główny antygen transplantacyjny myszy [6]. Jednocześnie istniejące różnice w sekwencji łańcucha ciężkiego H-2L<sup>d</sup> oraz łańcuchów ciężkich H-2D<sup>d</sup> i H-2K<sup>d</sup> (ok. 20%), syntetyzowanych przez tę samą komórkę, pozwoliły ostatecznie stwierdzić, że cząsteczka H-2L kodowana jest przez oddzielne locus. Istnienie trzech loci mysich antygenów zgodności tkankowej H-2K, H-2D i H-2L jest analogiczne z istnieniem trzech loci ludzkich antygenów HLA-A, HLA-B i HLA-C.

### III-2. BOCZNE ŁAŃCUCHY WĘGLOWODANOWE

Dla zbadania reszty cukrowcowej przeprowadzono trawienie łańcucha ciężkiego pronazą. Wyizolowane glikopeptydy o masie cząsteczkowej 3500 zawierały 1–2 reszt aminokwasowych i 12–15 reszt monosacharydowych. Stwierdzono, że glikopeptydy te były identyczne tak pod względem składu, wielkości, jak i ładunku elektrostatycznego, bez względu na to z jakiego haplotypu były izolowane, co sugeruje, że struktura reszty węglowodanowej nie ma wpływu na właściwości antygenowe alloantygenów. Ogólny model struktury złożonego łańcucha węglowodanowego,



Ryc. 4. Model struktury bocznego łańcucha węglowodanowego połączonego z łańcuchem ciężkim antygeny H-2. NANA — kwas sialowy, GAL — galaktoza, GlcNAc — N-acetyloglukozoamina, MAN — mannoza, FUC — fukoza, Asn — asparagina [28]



dołączonego do łańcucha ciężkiego H-2, opublikowali Nathenson i Cullen [28] (ryc. 4).

W skład części rdzeniowej łańcucha wchodzi 3 reszty mannozowe i 2 reszty N-acetyloglukozaminowe. Zewnętrznie dołączone są do niej łańcuchy złożone z reszt N-acetyloglukozaminowych, galaktozowych i terminalnie położonych reszt kwasu sialowego. Cała ta struktura, poprzez resztę N-acetyloglukozaminową z dołączoną fukozą, połączona jest z łańcuchem polipeptydowym. Miejscem połączenia obu łańcuchów jest reszta asparaginylowa polipeptydu [29], wchodząca w skład sekwencji rozpoznawczej dla procesu glikozylacji Asn-Gln-Ser [26]. Badania nad biosyntezą bocznego łańcucha węglowodanowego wykazały, że reszty cukrowe przenoszone są na odpowiednią resztę asparaginylową z intermediatu, którym jest odpowiedni oligosacharyd połączony z poliizoprenoidowym nośnikiem — pirofosforanem dolicholu [51]. Tak przebiegająca glikozylacja zachodzi jeszcze przed całkowitym zakończeniem syntezy łańcucha polipeptydowego [40]. Powstały prekursor łańcucha bocznego, bogaty w reszty mannozowe (high-mannose precursor) [39] ulega dojrzewaniu, w czasie którego zewnętrzne reszty glukozowe i mannozowe zastępowane są terminalnymi resztami cukrowymi, charakterystycznymi dla oligosacharydów złożonych (complex type oligosaccharide), którego strukturę przedstawiono na ryc. 4, lub dojrzałych oligosacharydów bogatych w mannozę (mature high-mannose oligosaccharide). Ta końcowa glikozylacja zachodzi w aparacie Golgiego, zaś dojrzały glikoproteid zostaje następnie przesunięty do błony komórkowej (w przypadku białek integralnych błony) albo odszczepiony od błony i wydzielony (w przypadku białek sekrecyjnych). W odniesieniu do ludzkich antygenów HLA, podobnie jak dla antygenów H-2, wykazano również pojawienie się najpierw bocznego łańcucha cukrowego w postaci prekursora bogatego w mannozę (na tym etapie łańcuch ciężki antygeny nie jest jeszcze zasocjowany z  $\beta_2$ -mikroglobuliną), ulegającego następnie przebudowie w typowy złożony łańcuch oligosacharydowy [22].

### III-3. $\beta_2$ -MIKROGLOBULINA

Obok zanurzonego w błonie powierzchniowej komórki, glikozylowanego i zawierającego determinanty antygenowe łańcucha ciężkiego, w skład cząsteczki głównych antygenów transplantacyjnych H-2 i HLA wchodzi również łańcuch  $\beta_2$ -mikroglobuliny [33, 36]. Występuje on także w innych mysich antygenach, jak Qa-1 [8], Qa-2 [27], TL [30], antygeny non-H-2 [1] lub antygeny nowotworowe [48]. Z łańcuchem ciężkim tych cząsteczek  $\beta_2$ -mikroglobulina połączona jest wiązaniami niekowalencyjnymi, ulegającymi rozerwaniu pod wpływem 3 M NaSCN [23].



Zarówno w przypadku antygenów HLA [49], jak i H-2 [7] interakcja taka zachodzi w obrębie drugiej domeny łańcucha ciężkiego (reszty aminokwasowe 92–182).

$\beta_2$ -mikroglobulina po raz pierwszy została zidentyfikowana w moczu osób chorych na tzw. chorobę Wilsona [2]. Wiadomo, iż białko to nie jest kodowane na tym samym chromosomie co antygeny transplantacyjne. Obecność genu dla  $\beta_2$ -mikroglobuliny wykazano na mysim chromosomie 2 [21], a u człowieka na chromosomie 17 (u człowieka geny antygenów HLA występują na chromosomie 6).  $\beta_2$ -mikroglobulina występuje również w postaci wolnej w osoczu krwi, płynie owodniowym, mleku i płynie nasiennym [35]. Funkcja jaką pełni  $\beta_2$ -mikroglobulina w cząsteczce antygenów transplantacyjnych ciągle nie jest znana. Przypuszcza się, że wraz z fragmentem łańcucha ciężkiego tworzy rodzaj miejsca receptorowego do interakcji z innymi antygenami (np. transplantacyjnymi lub wirusowymi). Wiadomo również, że stabilizuje ona strukturę III-rzędową antygeny, powodując niewrażliwość cząsteczki na działanie niektórych proteaz [24]. Wydaje się, że łańcuchy ciężkie nie ulegające połączeniu z cząsteczką  $\beta_2$ -mikroglobuliny podlegają degradacji w lizosomach [44]. W związku z tym aktywność serologiczna antygenów transplantacyjnych na powierzchni komórki jest całkowicie zależna od obu podjednostek.

Cząsteczka  $\beta_2$ -mikroglobuliny posiada masę cząsteczkową ok. 12 000, stałą sedymentacji 1,65S [2] i składa się z 99–100 reszt aminokwasowych. Obecnie znane są kompletne sekwencje  $\beta_2$ -mikroglobuliny ludzkiej [11], króliczej [13], świnki morskiej [52] i mysiej [14]. Homologia struktury I-rzędowej  $\beta_2$ -mikroglobuliny myszy w stosunku do jej odpowiedników u wymienionych organizmów wynosi odpowiednio: 68, 66 i 61%. Te różnice w składzie aminokwasowym wymagają 43–46 substytucji zasad w odpowiednich sekwencjach DNA [14]. Tak duży konserwatyzm strukturalny jest zapewne przyczyną silnej krzyżowej reaktywności immunologicznej  $\beta_2$ -mikroglobuliny. Znaczny stopień homologii sekwencji stwierdzono również pomiędzy mysią  $\beta_2$ -mikroglobuliną i fragmentem łańcucha ciężkiego H-2 między pozycjami 179–278 (III domena), która może sugerować wspólne pochodzenie ewolucyjne obu peptydów [14]. Wcześniej Peterson i wsp. [31] wykazali duże podobieństwo sekwencji ludzkiej  $\beta_2$ -mikroglobuliny z domeną CH<sub>3</sub> immunoglobuliny G.

#### IV. FUNKCJA ANTYGENÓW H-2

Mimo intensywnych badań funkcja antygenów H-2K i H-2D ciągle jeszcze pozostaje niejasna. Przypuszcza się, że antygeny H-2 mogą być aktywatorami limfocytów T oraz mogą stymulować różnicowanie ko-



mórek „T-killer” [53]. Poza znanymi danymi dotyczącymi udziału antygenów H-2 w odrzuceniu przeszczepów (stąd ich nazwa), najciekawszych informacji dotyczących funkcji antygenów H-2 dostarczyli Zinkernagel i Doherty [55].

Wykazali oni, że w trakcie zakażenia wirusowego organizm myszy wytwarza limfocyty efektorowe T, zabijające komórki zainfekowane przez wirusa (zarówno *in vivo*, jak *in vitro*). Limfocyty te wykazują specyficzną w stosunku do danego wirusa, np. limfocyty powstałe w myszy zakażonej przez wirus ospy krowiej (*vaccinia*) atakują komórki zainfekowane przez ten wirus, natomiast nie atakują komórek zakażonych przez inny wirus np. LCM (*lymphocytic choriomeningitis virus*). Ponadto okazało się, że limfocyty efektorowe wykazują jednocześnie specyficzną w stosunku do allotypu H-2 komórek docelowych, tzn. limfocyty uczulone przeciwko zainfekowanym przez wirus ospy komórkom H-2<sup>a</sup> niszczą tylko te komórki, a nie np. zainfekowane przez wirus ospy komórki H-2<sup>b</sup>. Oznacza to, że aktywność cytotoksyczna limfocytów efektorowych ograniczona jest przez loci H-2K i H-2D. Stwierdzono, że pozostałe loci kompleksu H-2 nie wpływają na specyficzną komórek efektorowych. Na tej podstawie można przypuszczać, że dojrzewające limfocyty efektorowe „uczą się” rozpoznawać antygeny wirusowe w połączeniu (kompleksie) z lub w obecności antygenów H-2K i H-2D, istniejących na powierzchni komórek uczulających (prezentujących antygen). Zinkernagel i wsp. [55] wykazali, że narządem, w którym proces ten zachodzi, będącym „szkołą” limfocytów, jest grasica, a dokładniej jej część nabłonkowa. Myszy mozaikowe, których nabłonek grasicy posiada haplotyp H-2<sup>a</sup>, bez względu na to jaki haplotyp będą miały komórki szpiku kostnego (źródło niedojrzałych, niezróżnicowanych limfocytów), produkują limfocyty efektorowe specyficzne tylko w stosunku do komórek o haplocybie H-2<sup>a</sup>. Zasadniczym, ciągle jeszcze nie rozwiązany, problem współczesnej immunologii jest czy rozpoznanie takich komórek docelowych zachodzi przez dwa różne receptory na powierzchni limfocyta (oddzielny receptor dla antygeny wirusowy i oddzielny dla antygeny H-2), czy też przez jeden wspólny receptor (rozpoznający obydwa antygeny jednocześnie). Powiązane jest to z pytaniem, czy na powierzchni zainfekowanej komórki dochodzi do interakcji antygenów H-2 i wirusowego, czy też obydwa rodzaje cząsteczek są niezależne od siebie. Żadnego z tych problemów nie rozstrzygnięto dotąd jednoznacznie. Można przypuszczać, że umożliwienie odróżnienia przez układ odpornościowy komórek zainfekowanych od komórek normalnych było (i jest) pierwotną funkcją układu antygenów H-2. Wykazano również, że w przypadku modyfikacji chemicznej komórek przy użyciu trójnitrofenolu (TNP) cytotoksyczność uczulonych *in vitro* limfocytów efektorowych T w stosunku



do komórek modyfikowanych limitowana jest obecnością na powierzchni antygenów H-2 haplotypu identycznego z haplotypem komórek modyfikowanych użytych do uczulenia [42].

## V. BIOSYNTENZA

Rothman i Lenard [41] zaproponowali, aby hipotezę sygnałną Blobela, opracowaną początkowo dla białek sekrecyjnych, rozszerzyć również na białka integralne błony. Według Blobela [3], w tym przypadku długie sekwencje hydrofobowych reszt aminokwasowych, tworzących odcinek zakotwiczący białko w błonie, będą działały jako sekwencje zatrzymujące proces przenikania nowo syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego w poprzek błony (stop transfer sequence). Powoduje to, iż kompletne łańcuchy swym C-koncem skierowane są do cytoplazmy, a ich N-koniec znajduje się po przeciwnej stronie błony. W przypadku łańcucha ciężkiego antygeny H-2 sekwencją „stop transfer” jest odcinek między pozycjami 282 i 307, mający charakter silnie hydrofobowy [4]. Dotąd nie wykryto żadnej homologii sekwencyjnej tego odcinka z analogicznymi odcinkami innych białek błonowych.

Jak wykazały badania w układach translacyjnych *in vitro* łańcuch ciężki H-2 i  $\beta_2$ -mikroglobulina syntetyzowane są w postaci nieglikozylowanych prekursorów o masach cząsteczkowych, odpowiednio, 45 000 i 14 000. Zawierają one peptydy sygnałne o masach cząsteczkowych ok. 2000. Prekursory podlegają obróbce (odcięcie peptydu sygnałnego, glikozylacja łańcuchów ciężkich) podczas przenikania nowo syntetyzowanego białka w poprzek błony śródkomórkowej. Proces ten zachodzi w trakcie translacji.

Odpowiednie mRNA, kodujące białka wchodzące w skład antygenów H-2, mają stałe sedymentacji 17S (łańcuch ciężki) i 10S ( $\beta_2$ -mikroglobulina) [17].

## VI. UWAGI KOŃCOWE

Sekwencja łańcuchów ciężkich H-2 i HLA porównana z sekwencją immunoglobulin wykazuje znaczne podobieństwa. Jest to powodem przyjęcia podziału części zewnątrzkomórkowej łańcucha ciężkiego antygenów, podobnie jak w przypadku Ig, na trzy globularne domeny. W łańcuchu antygenów HLA składają się one z sekwencji między pozycjami 1-91, 92-182 i 183-273 [49]. Pamiętając ponadto o opisanych faktach wzajemnego podobieństwa produktów jednego locus pochodzącego z różnych haplotypów, znacznej homologii sekwencji łańcuchów ciężkich H-2



i HLA między sobą oraz podobieństwa z  $\beta_2$ -mikroglobuliną wysunięto hipotezę, że geny wszystkich tych białek powstały z jednego wspólnego, pierwotnego genu, którego duplikacja i niezależna ewolucja dały dzisiejsze geny dla łańcuchów ciężkich,  $\beta_2$ -mikroglobuliny i immunoglobulin [32].

Za krytyczne uwagi w trakcie pisania niniejszego artykułu dziękuję Panu Prof. dr. A. Horstowi oraz Dr. Dr. K. Szyfterowi, K. Wiktorowiczowi i M. Kurpiszowi.

#### LITERATURA

- [1] ANUNDI H., RASK L., OSTBERG L., PETERSON P. A., The subunit structure of thymus leukemia antigens, *Biochemistry*, **14**: 5046–5054, 1975.
- [2] BERGGARD I., BEARN A. G., Isolation and properties of a low molecular weight  $\beta$ -globulin occurring in human biological fluid, *J. Biol. Chem.*, **243**: 4095–4099, 1968.
- [3] BLOBEL G., [w:] Proceedings of the 11th FEBS Meeting, Copenhagen 1977: Gene Expression, red. B. F. C. Clark, Pergamon Press, Oxford 1977, 99–112.
- [4] BREGEGERE F., ABASTADO J. P., KVIST S., RASK L., LALANNE J. L., GAROFF H., CAMI B., WIMAN K., LARHAMMAR D., PETERSON P. A., GACHELIN G., KOURILSKY P., DOBBERSTEIN B., Structure of the COOH-terminal region of H-2 antigens as deduced from two cloned H-2 messenger sequences, w druku.
- [5] COLIGAN J. E., KINDT T. J., EWENSTEIN B. M., UEHARA H., NISIZAWA T., NATHENSON S. G., Primary structure of murine major histocompatibility complex alloantigens: Amino acid sequence studies of the cyanogen bromide fragments of the H-2K<sup>b</sup> glycoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 3390–3394, 1978.
- [6] COLIGAN J. E., KINDT T. J., NAIRN R., NATHENSON S. G., SACHS D. H., HANSEN T. H., Primary structural studies of an H-2L molecule confirm that it is a unique gene product with homology to H-2K and H-2D antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 1134–1138, 1980.
- [7] COLIGAN J. E., KINDT T. J., UEHARA H., MARTINKO J., NATHENSON S. G., Primary structure of a murine transplantation antigen, *Nature (London)*, **291**: 35–39, 1981.
- [8] COOK R. G., RICH R. R., FLAHERTY L., The Qa-1 alloantigens. I. Identification and molecular weight characterization of glycoproteins controlled by the Qa-1<sup>a</sup> and Qa-1<sup>b</sup> alleles, *J. Immunol.*, **127**: 1894–1898, 1981.
- [9] CULLEN S. E., FREED J. H., NATHENSON S. G., Structural and serological properties of a murine Ia antigens, *Transplant. Rev.*, **30**: 236–241, 1976.
- [10] CULLEN S. E., SCHWARTZ B. D., An improved method for isolation of H-2 and Ia alloantigens with immunoprecipitation induced by protein A-bearing *Staphylococci*, *J. Immunol.*, **117**: 136–142, 1976.
- [11] CUNNINGHAM B. A., WANG J. L., BERGGARD I., PETERSON P. A., The complete amino acid sequence of  $\beta_2$ -microglobulin, *Biochemistry*, **12**: 4811–4821, 1973.



- [12] CURMAN B., OSTBERG L., SANDBERG L., MALMHEDEN-ERIKSSON J., STALENHEIM G., RASK L., PETERSON P. A., H-2-linked Ss protein is C4 component of complement, *Nature (London)*, **258**: 243-247, 1975.
- [13] GATES F. T., III, COLIGAN J. E., KINDT T. J., Complete amino acid sequence of rabbit  $\beta_2$ -microglobulin, *Biochemistry*, **18**: 2267-2272, 1979.
- [14] GATES F. T., III, COLIGAN J. E., KINDT T. J., Complete amino acid sequence of murine  $\beta_2$ -microglobulin: Structural evidence for strain-related polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**: 554-558, 1981.
- [15] HANSEN T. H., CULLEN S. E., SACHS D. H., Immunochemical evidence for an additional H-2 region closely linked to H-2D, *J. Exp. Med.*, **145**: 438-442, 1977.
- [16] HENNING R., MILNER R. J., RESKE K., CUNNINGHAM B. A., EDELMAN G. M., Subunit structure, cell surface orientation and partial amino acid sequence of murine histocompatibility antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**: 118-122, 1976.
- [17] JAY G., FERRINI U., ROBINSON E. A., KHOURY G., APPELLA E., Cell-free synthesis of mouse H-2 histocompatibility antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 6562-6566, 1979.
- [18] KLEIN J., *Biology of the mouse histocompatibility-2 complex*, Springer Verlag, New York 1975.
- [19] KLEIN J., [w:] *The major histocompatibility system in man and animals*, red. D. Goetze, Springer Verlag, Berlin 1977, 339-358.
- [20] KLEIN J., The major histocompatibility complex of the mouse, *Science*, **203**: 516-521, 1979.
- [21] KLEIN J., JURETIĆ A., BAXEVANIS C. N., NAGY Z. A., The traditional and a new version of the mouse H-2 complex, *Nature*, **299**: 455-460, 1981.
- [22] KRANGEL M. S., ORR H. T., STROMINGER J. L., Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens in vivo, *Cell*, **18**: 979-991, 1979.
- [23] KVIST S., SANDBERGH-TRAGARDH L., PETERSON P. A., Isolation and partial characterization of papain-solubilized murine H-2 antigens, *Biochemistry*, **16**: 4415-4420, 1977.
- [24] LANCET D., PARHAM P., STROMINGER J. L., The heavy chain of HLA-A and -B antigens is conformationally labile: a possible role for  $\beta_2$ -microglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 3844-3849, 1979.
- [25] LOPEZ de CASTRO J. A., ORR H. T., ROBB R. J., KOSTYK T. G., MANN D. L., STROMINGER J. L., Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigens HLA-B7. I. Isolation and amino acid composition of fragments and of tryptic and chemotryptic peptides, *Biochemistry*, **18**: 5704-5711, 1979.
- [26] MARSHALL R. D., *Glycoproteins*, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**: 673-709, 1972.
- [27] MICHAELSON J., FLAHERTY L., VITETTA E. S., POULIK M. D., Molecular similarities between the Qa-2 alloantigen and other gene products of the 17th chromosome of the mouse, *J. Exp. Med.*, **145**: 1066-1070, 1977.
- [28] NATHENSON S. G., CULLEN S. E., Biochemical properties and immunochemical-genetic relationships of mouse alloantigens, *Biochim. Biophys. Acta*, **344**: 1-25, 1974.
- [29] NATHENSON S. G., MURAMATSU T., [w:] *Glycoproteins of blood cells and plasma*, red. G. A. Jamieson and T. J. Greenwald, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1971.



- [30] OSTBERG L., RASK L., WIGZELL H., PETERSON P. A., Thymus leukemia antigen contains  $\beta_2$ -microglobulin, *Nature*, **253**: 736–737, 1975.
- [31] PETERSON P. A., CUNNINGHAM B. A., BERGGARD I., EDELMAN G. M.,  $\beta_2$ -Microglobulin — a free immunoglobulin domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**: 1697–1701, 1972.
- [32] PETERSON P. A., OSTBERG L., RASK L., [w:] Progress in differentiation research, red. N. Muller-Berratt, North Holland Publ., Amsterdam 1976.
- [33] PETERSON P. A., RASK L., LINDBLOM J. B., Highly purified papain-solubilized HLA antigens contain  $\beta_2$ -microglobulin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**: 35–39, 1976.
- [34] POBER J. S., GUILD B. C., STROMINGER J. L., Phosphorylation in vivo and in vitro of human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) in the carboxy-terminal intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**: 6002–6005, 1978.
- [35] POULIK M. D., [w:] Trace components of plasma: isolation and clinical significance, red. G. A. Jamieson and T. J. Greenwald, Liss, New York 1976, 155–177.
- [36] RASK L., LINDBLOM J. B., PETERSON P. A., Subunit structure of H-2 alloantigens, *Nature*, **249**: 833–834, 1974.
- [37] ROBB R. J., TERHORST C., STROMINGER J. L., Sequence of the COOH-terminal hydrophilic region of histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7, *J. Biol. Chem.*, **253**: 5319–5324, 1978.
- [38] ROBBINS P. W., HUBBARD S. C., TURCO S. J., WIRTH D. F., Proposal for common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins, *Cell*, **12**: 893–900, 1977.
- [39] ROTHBARD J. B., HOPP T. P., EDELMAN G. M., CUNNINGHAM B. A., Structure of the heavy chain of the H-2K histocompatibility antigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**: 4239–4243, 1980.
- [40] ROTHMAN J. E., KATZ F. N., LODISH H. E., Glycosylation of a membrane protein is restricted to the growing polypeptide chain but is not necessary for insertion as a transmembrane protein, *Cell*, **15**: 1447–1454, 1978.
- [41] ROTHMAN J. E., LENARD J., Membrane assymetry. The nature of membrane assymetry provides clues to the puzzle of how membranes are assembled, *Science*, **195**: 743–753, 1977.
- [42] SCHAEERER G. M., REHN T. G., GARBARINO C. A., Cell-mediated lympholysis of trinitrophenyl-modified autologous lymphocytes. Effector cell specificity to modified cell surface components controlled by the H-2K and H-2D serological regions of the murine major histocompatibility complex, *J. Exp. Med.*, **141**: 1348–1359, 1975.
- [43] SCHWARTZ B. D., KATO K., CULLEN S. E., NATHENSON G., H-2 histocompatibility alloantigens. Some biochemical properties of the molecules solubilized by NP-40, *Biochemistry*, **12**: 2157–2164, 1973.
- [44] SEGE K., RASK L., PETERSON P. A., On the role of  $\beta_2$ -microglobulin for the intracellular processing of HLA antigens, w druku.
- [45] SHIMADA A., NATHENSON S. G., Murine histocompatibility-2 (H-2) alloantigens. Purification and some chemical properties of soluble products from H-2<sup>b</sup> and H-2<sup>d</sup> genotypes released by papain digestion of membrane fractions, *Biochemistry*, **8**: 4048–4062, 1969.
- [46] SPRINGER T. A., STROMINGER J. L., Detergent soluble HLA antigens con-



- tain a hydrophilic region at the COOH-terminus and a penultimate hydrophobic region, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **73**: 2481-2485, 1976.
- [47] STROMINGER J. L., Structure of products of the major histocompatibility complex in man and mouse, [w:] Immunology 80, Progress in Immunology, red. M. Fougerau and J. Dausset, Academic Press, New York 1980, 541-553.
- [48] TADA T., TANIGAKI N., PRESSMAN D., Human cell membrane components bound to  $\beta_2$ -microglobulin in T cell-type cell line, J. Immunol., **120**: 513-519, 1978.
- [49] TRAGARDH L., KAMPE O., HAMMERLING U., BOHME J., CLAESSEON L., PETERSON P. A.,  $\beta_2$ -microglobulin and transplantation antigens, Scand. J. clin. Lab. Invest. **40**, Suppl. **154**: 39-44, 1980.
- [50] UEHARA H., EWENSTEIN B. M., MARTINKO J. M., NATHENSON S. G., COLIGAN J. E., KINDT T. J., Primary structure of murine histocompatibility complex alloantigens: amino acid sequence of the amino-terminal one hundred and seventy three residues of the H-2K<sup>b</sup> glycoprotein, Biochemistry, **19**: 306-315, 1980.
- [51] WAECHTER C. J., LENARZ W. J., The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein biosynthesis, Annu. Rev. Biochem., **45**: 95-117, 1972.
- [52] WOLFE P. B., CEBRA J. D., The primary structure of guinea pig  $\beta_2$ -microglobulin, Mol. Immunol., **17**: 1493-1506, 1980.
- [53] VITETTA E. S., CAPRA J. D., The protein products of the murine 17th chromosome: genetics and structure, Adv. Immunol., **26**: 147-193, 1978.
- [54] ZALESKA-RUTCZYNSKA Z., KLEIN J., Histocompatibility-2 system in wild mice. V. Serologic analysis of sixteen B10. W congenic lines, J. Immunol., **119**: 1903-1911, 1977.
- [55] ZINKERNAGEL R. M., DOHERTY P. C., Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis, Nature (London), **251**: 547-548, 1974.

*Otrzymano: 20 lipca 1982.*

*Przyjęto: 8 października 1982.*

*Adres autora: ul. Świącickiego 6, 60-781 Poznań.*



LIMFOCYTY T TWORZĄCE WCZESNE ROZETKI  
I. CHARAKTERYSTYKA LIMFOCYTÓW T TWORZĄCYCH  
WCZESNE ROZETKI

T LYMPHOCYTES FORMING EARLY ROSETTES  
I. CHARACTER OF T LYMPHOCYTES FORMING EARLY ROSETTES

Jolanta MYŚLIWSKA

Zakład Histologii, Instytut Biologii Medycznej, Akademia Medyczna, Gdańsk

*Streszczenie.* Limfocyty określane jako komórki tworzące „wczesne” lub „aktywne” rozetki stanowią subpopulację limfocytów T wykrywalną za pomocą szybkiego testu E-rozetowego. Dla określenia tych komórek stosuje się także nazwę limfocyty z receptorami wysokiego powinowactwa do erytrocytów barana. W pracy przedstawiono kilka najpowszechniej stosowanych modyfikacji metodycznych szybkiego testu E-rozetowego oraz opisano wpływ czynników metodycznych na ilość wykrywalnych rozetek. Zgodnie z wynikami badań prowadzonych na izolowanych subpopulacjach limfocytów T — komórki tworzące wczesne rozetki oraz pozostałe limfocyty T różnią się własnościami fizykochemicznymi błony komórkowej, rozmieszczeniem struktur wiążących erytrocyty barana oraz funkcją.

*Summary.* Subpopulation of human T lymphocytes detectable in a short term E-rosette assay is defined as „early” or „active” rosette forming cells. These cells are also known as T lymphocytes with high „avidity” receptors for sheep red blood cells. Several methodical modifications of the short term E-rosette test have been presented. It has been shown that the medium in which contacting cells are placed, the temperature of incubation and the presence of fetal calf serum decide about the amount of rosettes detected. According to examinations on isolated subpopulations of T lymphocytes — cells with the ability to form early rosettes and the remaining T cells differ with respect to physico-chemical properties of cellular surface, the distribution of the receptors binding sheep erythrocytes and immunologic function.

WPROWADZENIE

Badania dotyczące funkcji komórek limfatycznych doprowadziły do wyodrębnienia u kręgowców dwóch zasadniczych populacji limfocytów: T — odpowiedzialnych za odporność komórkową, oraz B — odpowiedzialnych za odporność humoralną.



Potwierdzeniem odrębności obu linii komórkowych są cechy charakterystyczne ich powierzchni. Oba typy komórek limfatycznych różnią się bowiem obecnością specyficznych struktur receptorowych, które przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1

Charakterystyka powierzchni limfocytów T i B krwi obwodowej człowieka

Struktury powierzchniowe		Limfocyty T	Limfocyty B
Cząsteczki przeciwciał klasy IgM, IgG, IgD, IgA, IgE związane z powierzchnią		brak [48]	obecne [15,48]
Receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin:	IgM	obecne [40]	obecne [46,51]
	IgG	obecne [26,30,40]	obecne [26]
	IgD	obecne [54]	obecne [54]
	IgA	obecne [35–37]	obecne [35–37]
	IgE	obecne [71]	obecne [17,71]
Receptor dla składnika C3 dopełniacza		brak [27]	obecny [27,48]
Antygen powierzchniowy Ia		obecny [30,39]	obecny [48]
Miejsca wiążące erytrocyty	autologiczne	obecne [29, 59]	brak [29]
	allogeniczne	obecne [29]	brak [29]
	mysie	brak [2]	obecne [2,45]
	baranie	obecne [27,48]	brak [27]

Jedną z zasadniczych cech odróżniających populację ludzkich limfocytów T od komórek B jest ich zdolność do spontanicznego wiązania erytrocytów barana — SRBC (sheep red blood cells). Za tę zdolność odpowiedzialne są struktury powierzchniowe, których charakter dotąd pozostaje przedmiotem kontrowersji. Z nagromadzonych danych wynika bowiem, że w proces rozpoznawania erytrocytów barana przez limfocyty T mogą być włączone cząstki węglowodanowe [34] oraz białkowe [20]. Próby izolacji i charakterystyki miejsc wiążących erytrocyty barana na limfocytach T nie dostarczyły jednoznacznych wyników. Tak np. Owen i wsp. [43] na podstawie swoich badań sugerują, że miejsca wiążące krwinki barana mają strukturę glikoproteidową. Nowsze badania [18, 20] wskazują raczej na jej białkowy charakter. Gürtler i wsp. [20] sugerują wzajemną interakcję drobin białkowych limfocytów z cząstkami lipidowymi na powierzchni erytrocytów barana.

Łączenie się limfocytów z krwinkami barana jest procesem aktywnym — wrażliwym na działanie inhibitorów glikolizy [27], niektórych



inhibitorów biosyntezy białka, jak puromycyna i  $\alpha$ -amanityna [3], oraz wrażliwym na zmiany poziomu cAMP w komórce [16].

Na ryc. 1 przedstawiono limfocyt T otoczony przez erytrocyty barana, co w efekcie daje obraz przypominający rozetkę. Obraz ten pochodzi z pracy Kay i wsp. [31] i uzyskano go za pomocą mikroskopu skaningowego.

Warunkiem wyznakowania całkowitej populacji limfocytów T jest umożliwienie im odpowiednio długiego kontaktu z erytrocytami w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ . W praktyce laboratoryjnej dla uzyskania maksymalnych wartości stosowano inkubację całonocną.



Ryc. 1. Erytrocyty barana otaczające limfocyt T człowieka — rozetka, według Kay i wsp. [31]. Mikroskop skaningowy. Pow.  $6750\times$

Szybkość przyłączania krwinek czerwonych do powierzchni limfocytów w teście tworzenia rozetek cechuje dwufazowość — mianowicie już po 30 minutach wyznakowaniu ulega pewien niewielki odsetek limfocytów, podczas gdy pozostałe limfocyty T dla utworzenia rozetek wymagają dodatkowych kilku godzin inkubacji [38]. Obserwacja ta pozwoliła na wysunięcie sugestii o istnieniu w obrębie populacji limfocytów T dwóch subpopulacji, różniących się stopniem powinowactwa ich receptorów do SRBC. Stało się to bodźcem do poszukiwania takich warunków testu rozetowego, które umożliwiłyby zarówno ilościową, jak i jakości-



wą ocenę komórek zdolnych do szybkiego przyłączania krwinek barana, a więc komórek wyposażonych w receptory wysokiego powinowactwa.

Wspólną cechą wszystkich modyfikacji wspomnianego testu, mających na celu wykrycie tej frakcji limfocytów, było zastosowanie skróconego czasu kontaktu między limfocytami ludzkimi i erytrocytami barana. Stąd często używana nazwa dla modyfikacji testu rozetowego — „szybki test rozetowy”, zaś dla komórek znakowanych w nim — komórki tworzące „wczesne rozetki”. Oprócz czasu inkubacji, także inne elementy testu, jak np.: rodzaj użytego środowiska inkubacyjnego, temperatura inkubacji czy stosunek ilościowy erytrocytów do limfocytów, wywierają zasadniczy wpływ na wartości wykrywalnych limfocytów o wysokim powinowactwie do SRBC [7, 50, 65, 69]. Stąd też w zależności od zastosowanej modyfikacji odsetek komórek otoczonych erytrocytami waha się w granicach od kilkunastu do ponad 40%.

Stwierdzenie istnienia zależności między ilością limfocytów wiążących SRBC w szybkim teście rozetowym a przebiegiem i rokowaniem w niektórych stanach patologicznych, spowodowało wprowadzenie przez Wybrana [66] innego określenia dla tych komórek — mianowicie komórki tworzące „aktywne” rozetki.

Pozostałe limfocyty T, wiążące erytrocyty barana dopiero po kilkogodzinnej inkubacji, a więc posiadające receptory niskiego powinowactwa do SRBC [63, 64], określa się jako komórki tworzące „późne” rozetki E [70]. Limfocyty z receptorami niskiego i wysokiego powinowactwa do SRBC składają się na całkowitą pulę limfocytów T.

#### WARUNKI METODYCZNE TESTU TWORZENIA WCZESNYCH ROZETEK

Spośród wielu modyfikacji stosowanych do oznaczania liczby wczesnych rozetek — testy opracowane przez Wybrana [66] i Westa [61] należą do najczęściej stosowanych.

Najpowszechniej stosowana metoda Wybrana [66] polega na odczytywaniu odsetka komórek wiążących krwinki barana natychmiast po wprowadzeniu ich w kontakt fizyczny, a więc po wirowaniu mieszaniny tych komórek. Etap ten jest poprzedzony godzinną preinkubacją limfocytów w środowisku wzbogaconym cielecą surowicą płodową (FCS — fetal calf serum) w temp. +37°C.

W metodzie Westa [61] limfocyty i erytrocyty umieszcza się w środowisku podobnym do tego, które stosuje Wybran. Okres wzajemnego kontaktu między komórkami znakowanymi (limfocytami) i znakującymi (erytrocytami) jest jednak w jego metodzie znacznie dłuższy. Wynosi on 60 minut. Czynnikiem krytycznym w jego metodzie jest natomiast temperatura inkubacji wynosząca +29°C.



Opisano także szereg innych testów, których podstawą było przyjęcie niskiej temperatury inkubacji  $+4^{\circ}\text{C}$  dla mieszaniny limfocytów i erytrocytów [12, 28, 41]. Wiadomo bowiem, że niska temperatura sprzyja procesowi stabilizacji receptorów [8], a więc niejako utrwała stan, w jakim były one w momencie pobierania limfocytów od dawcy, zaś podniesienie temperatury uaktywnia ruch receptorów. Tak więc własności komórek wykrywanych w testach stosujących niską temperaturę inkubacji można w sposób najbardziej wiarygodny odnosić do ich własności *in vivo*.

Inni autorzy, jak np. Kerman i wsp. [33] oraz Yu [72], modyfikują test Wybrana poprzez ominięcie surowicy płodowej cielęcej, która może wpływać na proces tworzenia aktywnych rozetek.

Istnienie tak dużego zróżnicowania w zakresie metod wykrywania limfocytów z receptorami wysokiego powinowactwa do erytrocytów barana może tłumaczyć różnice uzyskiwane przez autorów zarówno w ocenie ilościowej, jak i jakościowej tych komórek. Wydaje się jednak, że bez względu na rodzaj stosowanej metody szybki test rozetowy wykrywa subpopulację limfocytów o podobnym profilu czynnościowym.

#### WPLYW WARUNKÓW METODYCZNYCH NA WYNIKI TESTU ROZETOWEGO

Jednym z czynników wpływających na wyniki testu rozetowego jest stosunek liczby limfocytów do erytrocytów. Dla wyznakowania maksymalnej liczby limfocytów z receptorami o wysokim powinowactwie do SRBC jako najniższą wartość graniczną należy przyjąć stosunek 1 : 16, zaś jako najwyższą 1 : 64 [55]. Jako wartość optymalną uważa się stosunek 1 : 40 [5].

Znaczną rolę w procesie przyłączania erytrocytów do limfocytów odgrywa rodzaj środowiska, w którym przeprowadza się inkubację tych komórek. Najniższe wartości odsetka wczesnych rozetek uzyskuje się przy zastosowaniu buforowanego roztworu fizjologicznego NaCl (PBS — phosphate buffered saline) [68]. Wzbogacenie tego płynu płodową surowicą cielęcą prowadzi do zwiększenia liczby wykrywanych rozetek [68]. Ważny jest także czas trwania preinkubacji limfocytów przed dodaniem SRBC, którą stosuje się w wielu modyfikacjach metody. Jak wynika z pracy Roszmana [50], 30-minutowa inkubacja we wzbogaconym środowisku wywierała depresyjny wpływ na tworzenie rozetek. W wyniku przedłużenia okresu inkubacji do 60 minut, limfocyty odzyskiwały zdolność do wiązania SRBC. Cockerell [7], oceniając zdolność limfocytów do wiązania SRBC po znacznie dłuższym okresie inkubacji we wzbogaconym środowisku, stwierdził, że po 24 godzinach zdolność limfocytów do wiązania SRBC wzrastała około 5-krotnie w stosunku do zdolności wiązania jaką wykazywały limfocyty przed inkubacją. Wzrost ten był po-



równywalny do tego, jaki osiągnięto inkubując limfocyty z tymozyną i levamisolem. Innym z czynników wpływających wzmagająco na zjawisko tworzenia wczesnych rozetek jest preinkubacja limfocytów w buforze weronalowym [65].

Jednym z istotnych czynników wpływających na wartości testu rozetowego jest, jak już wspomniano, cieleca surowica płodowa. Większość autorów uważa, że wzmacnia ona wiązanie SRBC do powierzchni limfocytów [70]. Szczególnie wyraźnie podkreślają to badania Zwi-Fuksa [14] przeprowadzone na limfocytach pochodzących od pacjentów z chorobą Hodgkina. Jedną z cech tego schorzenia jest upośledzenie zdolności limfocytów do wiązania SRBC. Jeżeli jednak limfocyty od pacjentów przed wykonaniem testu poddano *in vitro* preinkubacji w obecności FCS, to procedura ta przywracała komórkom zdolność wiązania SRBC w granicach wartości charakterystycznych dla ludzi zdrowych. Z badań innych autorów wynika natomiast, że FCS nie wywiera wpływu na tworzenie rozetek przez limfocyty obdarzone receptorami wysokiego powinowactwa do SRBC [5, 12, 55, 64].

Innym ważnym czynnikiem wpływającym na wartość testu rozetowego jest temperatura inkubacji. Optymalną dla procesu wiązania się limfocytów z erytrocytami jest temperatura  $+4^{\circ}\text{C}$  [8, 24]. Jak już wspomniano, w temperaturze tej dochodzi do immobilizacji receptorów. Stopniowe podwyższanie temperatury indukuje zjawisko „capping”, czyli tworzenie czapeczki, polegające na skupianiu się receptorów na jednym z biegunów komórki [49]. Prowadzi to jednocześnie do dezintegracji wiązań między SRBC a limfocytami.

## BADANIA NA IZOLOWANYCH LIMFOCYTACH T O ZDOLNOŚCI TWORZENIA WCZESNYCH ROZETEK

### 1. LIMFOCYTY TWORZĄCE WCZESNE ROZETKI A ODPOWIEŹ PROLIFERACYJNA NA STYMULACJĘ MITOGENAMI

Wyniki szeregu badań prowadzonych *in vivo* sugerowały, że liczba komórek tworzących wczesne rozetki we krwi obwodowej człowieka może być miernikiem odporności komórkowej [10, 11, 13, 24, 25]. W celu potwierdzenia tej sugestii podjęto doświadczenia na izolowanych komórkach. Najczęściej stosowaną metodą badań była równoczesna ocena reaktywności izolowanych limfocytów tworzących wczesne rozetki oraz pozostałych limfocytów T, a więc posiadających receptory niskiego powinowactwa do SRBC.

Badania Traycoffa i wsp. [58] wskazują, że frakcja limfocytów tworzących wczesne rozetki proliferuje intensywniej w wyniku stymulacji



fitohemaglutyniną aniżeli część komórek pozostała po oddzieleniu komórek tworzących aktywne rozetki. Podobną wymowę mają wyniki badań Wybrana [67]. Wzmoczoną reaktywność komórek tworzących wczesne rozetki wykazano także stosując cztery substancje mitogenne: fitohemaglutyninę, konkanawalinę A, wyciąg szkarłatki (PWM — pokeweed mitogen) oraz octan mirystynowy [57]. Również w zgodzie z tymi badaniami pozostają wyniki Yu [73]. Oceniając zdolność do podziałów mitotycznych w odpowiedzi na stymulację fitohemaglutyniną oraz w hodowli mieszanej limfocytów — autor wykazał znamienne wyższą odpowiedź komórek należących do frakcji tworzącej wczesne rozetki w porównaniu z pozostałą frakcją limfocytów T. Należy przy tym podkreślić, że autor stosował inną aniżeli Wybran metodę rozetkową. Sasaki i wsp. [52], stosując także własną metodę znakowania komórek tworzących aktywne rozetki, podają, że frakcja limfocytów o wysokim powinowactwie do krwinek barana wykazuje większą reaktywność wobec fitohemaglutyniny aniżeli frakcja limfocytów T o niskim powinowactwie. Podobną zależność wykazał on także stosując stymulację za pomocą allogenicznych limfocytów.

Jedną z cech komórek tworzących wczesne rozetki jest ich zdolność do uczestniczenia w hodowli mieszanej, przy czym stopień ich zaangażowania jest znacznie większy aniżeli pozostałych limfocytów T [47]. Komórki te bowiem biorą udział w rozpoznawaniu komórek allogenicznych, co manifestuje się ich proliferacją, a także są aktywne w późnym etapie reakcji limfocytów w hodowli mieszanej, wywierając efekt cytotoksyczny. Zestawiając znane fakty kliniczne, wskazujące na podnoszenie się liczby aktywnych rozetek u pacjentów z nowotworem w okresie remisji, autorzy wspomnianych badań wnioskuje, że w warunkach *in vivo* komórki tworzące aktywne rozetki mogą sprawować funkcję cytotoksyczną w stosunku do transformowanych komórek gospodarza — jako część systemu nadzoru immunologicznego.

Z przedstawionych badań wynika, że limfocyty T o wysokim powinowactwie do SRBC stanowią frakcję, która odpowiada proliferacją w odpowiedzi na stymulację szerokim wachlarzem mitogenów oraz substancji antygenowych.

W kontraście z tą dość liczną grupą doniesień pozostają dane z pracy Taniguchi i wsp. [56]. Nie wykazali oni bowiem różnic między limfocytami o wysokim i niskim powinowactwie do SRBC w odpowiedzi na mitogenną stymulację fitohemaglutyniną. Wzbogacenie hodowli limfocytów autologicznymi monocytami doprowadziło do ponad dwukrotnego wzmoczenia odpowiedzi na ten mitogen w obu frakcjach limfocytów T. W odpowiedzi na konkanawalinę A natomiast komórki należące do frakcji



tworzącej wczesne rozetki wykazywały niższy indeks stymulacyjny aniżeli pozostałe komórki T. Różnice te ulegały niwelacji po dodaniu do hodowli autologicznych monocytów. Według Chollet i wsp. [6] komórki tworzące wczesne rozetki ulegają transformacji blastycznej pod wpływem fitohemaglutyniny w tym samym zakresie jak limfocyty T niskiego powinowactwa do SRBC. Badania Jonsdottira i wsp. [28] wykazały nawet niższą reaktywność limfocytów T o wysokim powinowactwie do SRBC w porównaniu z pozostałymi komórkami T. Zastosowali oni stymulację mitogenem komórek T — leukoaglutyniną (LA) z *Phaseolus vulgaris*.

Przedstawione rozbieżności są być może wynikiem niedoskonałości metodycznych, w tym przede wszystkim mogłyby zależeć od zanieczyszczenia innymi komórkami, izolowanych populacji limfocytów T o zdolności tworzenia wczesnych rozetek. Zanieczyszczenie takie jest możliwe ze względu na stosowanie przez różnych autorów odbiegających od siebie modyfikacji testu rozetowego. Istnienie różnic odnośnie do zakresu optymalnych stężeń mitogenów dla frakcji limfocytów T z receptorami o wysokim i niskim powinowactwie do krwinek barana [28] i nieuwzględnianie tego faktu przez wielu autorów, mogą także w pewnej mierze tłumaczyć uzyskane różnice wyników.

## 2. LIMFOCYTY TWORZĄCE WCZESNE ROZETKI — A ODCZYN CYTOTOKSYCZNY

Jedną z funkcji, jakie przypisuje się limfocytom T, jest ich aktywność cytotoksyczna. Szczególną rolę w procesie cytotoksycznym ma odgrywać subpopulacja limfocytów T wyposażonych w receptory dla fragmentu Fc immunoglobuliny IgG — czyli dla C-końcowych odcinków łańcuchów ciężkich stałych tych przeciwciał. Obecność tych receptorów umożliwia bowiem wiązanie kompleksów immunologicznych do powierzchni komórek limfatycznych. Zjawisko to, jak wiadomo, jest etapem poprzedzającym wyzwolenie efektu cytotoksycznego zarówno w reakcji cytotoksycznej zależnej od przeciwciał, jak i spontanicznej [19, 22, 53, 60].

Rola limfocytów T z receptorami wysokiego powinowactwa do SRBC jako ewentualnych komórek efektorowych w efekcie cytotoksycznym nie została jednak dokładnie sprecyzowana. Tak więc w badaniach Westa [61, 62] oraz Kay i wsp. [32] wykazano, że frakcja komórek T o wysokim powinowactwie do SRBC jest zasadniczo negatywna pod względem zawartości komórek posiadających receptory dla fragmentu Fc-IgG. Pozostałe limfocyty T, a więc o niskim powinowactwie do SRBC, zawierają dość znaczny odsetek komórek Fc-IgG pozytywnych. Zdaniem autorów, tylko ta ostatnia frakcja zawiera efektory cytotoksyczności naturalnej,



jak i zależnej od przeciwciał. Podobnie w badaniach Choletta i wsp. [6] zwraca się uwagę na fakt, że populacja limfocytów tworzących wczesne rozetki nie zawiera zasadniczo komórek Fc-IgG pozytywnych w przeciwieństwie do pozostałej frakcji limfocytów T. Zgodne z tymi wynikami jest również doniesienie Jonsdottira i wsp. [28]. Zdaniem autorów, frakcja komórek T o wysokim powinowactwie do SRBC zawiera niski odsetek form Fc-IgG pozytywnych i jest w niewielkim stopniu efektywna w reakcji cytotoksycznej spontanicznej, jak również w reakcji zależnej od przeciwciał. Wyniki badań de Horatiusa i wsp. [24] świadczą, że aktywność cytotoksyczna pozostaje w stosunku odwrotnie proporcjonalnym do ilości aktywnych rozetek. Autorzy wspomnianych badań obserwowali pacjentów z chorobą nowotworową, leczonych hipertermią. U chorych tych wraz z poprawą stanu klinicznego dochodziło do wzrostu odsetka komórek tworzących aktywne rozetki oraz obniżenie funkcji cytotoksycznej zależnej od przeciwciał. Hokland [23], podobnie jak wymienieni autorzy, uważa, że limfocyty o wysokim powinowactwie do SRBC są zasadniczo pozbawione form Fc-IgG pozytywnych oraz wykazują niską aktywność cytotoksyczną w układzie zależnym od przeciwciał, jak i efekcie cytotoksycznym indukowanym spontanicznie. W przeciwieństwie do innych autorów jednak, przypisuje on podobne cechy także limfocytom T o niskim powinowactwie do krwinek barana.

Krańcowo inny pogląd odnośnie do obecności receptora dla fragmentu Fc-IgG na komórkach tworzących aktywne rozetki przedstawił Espinoza [9]. W pracy tej wykazano, posługując się testem Wybrana, że preinkubacja limfocytów krwi obwodowej z ludzką agregowaną IgG wpływa blokująco na zjawisko tworzenia się aktywnych rozetek. Ponieważ agregowana ludzka IgG ma zdolność wiązania się z receptorem dla fragmentu Fc-IgG, autorzy wnioskuje, że frakcja limfocytów T tworzących aktywne rozetki jest w znacznym stopniu Fc-IgG pozytywna.

W świetle przedstawionych badań limfocyty tworzące wczesne rozetki są zasadniczo pozbawione form posiadających receptor dla fragmentu Fc-IgG. Niewykluczone jednak, że niewielki odsetek tych komórek posiada wspomniane receptory. Wykrycie tej grupy komórek, spośród limfocytów tworzących wczesne rozetki, jest możliwe tylko za pomocą metod pośrednich. Zgodnie z posiadanym fenotypem receptorowym, komórki tworzące wczesne rozetki nie wywierają efektu cytotoksycznego — zarówno spontanicznego, jak i zależnego od przeciwciał. Tylko niewielki odsetek spośród komórek tworzących wczesne rozetki wykazuje aktywność cytotoksyczną. Nie można jednak wykluczyć, że ta właśnie aktywność zależy od zanieczyszczenia frakcji aktywnych rozetek innymi limfocytami.



#### RÓŻNICE MIĘDZY LIMFOCYTAMI TWORZĄCYMI WCZESNE ROZETKI A POPULACJĄ LIMFOCYTÓW T O NISKIM POWINOWACTWIE DO SRBC

Charakterystyka zdolności proliferacyjnej, jak i ocena zdolności do wywierania efektu cytotoksycznego, przez frakcje limfocytów T różniące się powinowactwem do SRBC, wskazuje na istnienie odrębności czynnościowej między obu frakcjami. Na tę odrębność wskazują także przedstawione uprzednio wyniki obserwacji klinicznych. Wnioskiem, który wypływa z tych badań, jest określenie liczby wczesnych rozetek jako miernika odporności komórkowej.

Istnienie odrębności pomiędzy frakcjami limfocytów T o wysokim i niskim powinowactwie do SRBC potwierdzają także inne doniesienia. Ruchliwość elektroforetyczna limfocytów tworzących wczesne rozetki jest większa aniżeli pozostałych limfocytów T [4, 21]. Komórki należące do frakcji tworzącej wczesne rozetki charakteryzują się większą wrażliwością na działanie surowicy antylimfocytarnej, w porównaniu z pozostałymi limfocytami T [1].

Szereg badań poświęcono naturze receptorów dla SRBC na limfocytach T. Badania Okudy i wsp. [42] potwierdzają istnienie różnic w powinowactwie do erytrocytów barana w komórkach T tworzących i nie tworzących wczesne rozetki. W badaniach tych fragmenty komórkowe krwinek barana hamowały tworzenie wczesnych rozetek, nie wywierając wpływu na zdolność komórek T do tworzenia rozetek późnych. Wyciągi otrzymane z komórek tworzących wczesne rozetki przeciwdziałały inhibicji indukowanej przez fragmenty komórkowe SRBC. Wyciągi zaś pochodzące z komórek tworzących późne rozetki nie posiadały zdolności neutralizowania hamującego wpływu fragmentów SRBC na tworzenie wczesnych rozetek. Nie wiadomo jednak czy receptory dla SRBC na komórkach tworzących wczesne i późne rozetki przedstawiają różne struktury chemiczne, czy też są to te same struktury, ale o różnej gęstości bądź konfiguracji.

Pewne światło na naturę receptorów w obu typach komórek rzucają badania Yu [72]. Zgodnie z wynikami badań tego autora, jedną z cech odróżniających receptory na komórkach o wysokim i niskim powinowactwie do krwinek barana jest odmienna zawartość kwasu sialowego i grup sulfhydrylowych. Według tego autora, receptory dla SRBC różnią się także rozmieszczeniem w obu typach komórek. Wnioski swoje wyprowadził on z badań nad zjawiskiem tworzenia czapeczki na powierzchni limfocytów. Otóż frakcja limfocytów tworzących wczesne rozetki okazała się tylko w niewielkim stopniu zdolna do aktywnego ruchu receptorów, podczas gdy stosunkowo duży odsetek limfocytów T tworzących późne rozetki wykazywał skupianie się receptorów na biegunie komórek.

Inkubacja limfocytów z trypsyną, neuraminidazą oraz AET (amino-



ethylisothiouronicum bromide hydrobromide) nie wpłynęła na ruchliwość receptorów w komórkach T tworzących wczesne rozetki, redukując jednocześnie znacznie odsetek komórek tworzących „czapeczki” w obrębie limfocytów tworzących rozetki późne. Ponieważ neuraminidaza usuwa grupy kwasu sialowego z powierzchni komórek, AET zaś prowadzi do redukcji grup sulfhydrylowych, stąd autor wnioskował o istnieniu różnic w zawartości tych grup w limfocytach należących do frakcji o wysokim i niskim powinowactwie do krwinek barana. Trypsyna zaś zdaniem autora w zastosowanej dawce nie usuwała receptorów, lecz jedynie zmieniała ich usytuowanie na powierzchni komórek. To z kolei sugerowało istnienie różnic w rozmieszczeniu receptorów na limfocytach należących do wyżej wymienionych frakcji. Według Yu [72] komórki tworzące wczesne rozetki mają receptory dla SRBC w formie zagęszczonej, zaś pozostałe limfocyty T — w formie rozproszonej. Sugestię tą popierają wyniki badań Owena i wsp. [44]. Z badań tych autorów wynika, że około 40% limfocytów krwi obwodowej ma wyższą koncentrację receptorów dla krwinek barana aniżeli pozostałe limfocyty.

## LITERATURA

- [1] ASHAM R. B., La VIA M. F., SAWANAROLI S., Studies on the mechanism of E rosette formation and inhibition, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **16**: 39–47, 1980.
- [2] BERTOGLIO J., THIERRY C., FLORES C., BOUCHAREL Ch., DORE J. F., SEROU B., Mouse red cell rosette formation by subpopulation of human lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 172–177, 1977.
- [3] BUSHIN S. C., PANTIC V. S., GOOD R. A., RNA and protein synthesis in spontaneous rosette formation by T lymphocytes, *J. Immunol.*, **115**: 866–870, 1975.
- [4] CHASSAGNE J., CHOLLET C., VUILIAUME C., PLAGNE R., Immunologic status of cancer patients: correlation between number of active rosettes and analytical electrophoresis of lymphocytes, *Biomedicine*, **27**: 93–93, 1977.
- [5] CHISHOLM R. L., TUBERGEN D. G., The significance of varying SRBC/lymphocyte ratio in T cell rosette formation, *J. Immunol.*, **116**: 1397–1399, 1976.
- [6] CHOLLET P., CHASSAGNE J., THIERRY C., GAUVIN H., VUILLAUME C., SERROU B., PLAGNE R., Electrophoretic mobility of peripheral non-B human Fc-receptors bearing lymphocytes. *Biomedicine*, **31**: 31–41, 1980.
- [7] COCKERELL G. L., BALDWIN C. L., Increased spontaneous erythrocyte rosette formation of feline lymphocytes preincubated at 37 °C, *J. Immunol. Meth.*, **28**: 369–379, 1979.
- [8] COHNEN G., Distribution of erythrocytes receptors at the surface membrane of human T lymphocytes, *Biomedicine*, **25**: 48–50, 1976.
- [9] ESPINOZA R. L., GAYLORD S. W., BERGEN L., VASER V. B., GERMAIN B. F., OSTERLAND K., The „active” rosette test in rheumatoid arthritis: correlation with disease activity, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **17**: 110–116, 1980.



- [10] FELSBURG P. J., EDELMAN R., GILMAN R. H., The „active” E-rosette test correlation with delayed cutaneous hypersensitivity, *J. Immunol.*, **116**: 1110–1114, 1976.
- [11] FELSBURG P. J., EDELMAN R., The active E-rosette test a sensitive in vitro correlate for human delayed hypersensitivity, *J. Immunol.*, **118**: 62–66, 1978.
- [12] FLOREY M. J., PEETOM F., Modified E-rosette test for detection of total and active rosette forming lymphocytes, *J. Immunol. Meth.*, **13**: 201–206, 1976.
- [13] FUDENBERG H. H., WYBRAN J., ROBBINS D. T., T-rosette forming cells, cellular immunity and cancer, *N. Engl. J. Immunol.*, **292**: 475–476, 1975.
- [14] FUKS Z., STROBER S., KING D. P., KAPLAN H. S., Reversal of cell surface abnormalities of T lymphocytes in Hodgkin’s disease after in vitro incubation in fetal sera, *J. Immunol.*, **117**: 1331–1335, 1976.
- [15] FU S., WINCHESTER R. J., KUNKEL H. G., Occurrence of IgG, IgD and free light chains on human lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **139**: 451–455, 1974.
- [16] GALANT S. P., REMO R. A.,  $\beta$ -adrenergic inhibition of human T lymphocyte rosettes, *J. Immunol.*, **114**: 512–513, 1975.
- [17] GONZALES-MOLINA A., SPIEGELBERG H. L., A subpopulation of normal human peripheral B lymphocytes that bind IgE, *J. Clin. Invest.*, **59**: 616–624, 1977.
- [18] GROSS N., BRON C., Identification and partial characterization of surface antigens specific for human normal and leucemic T cells, *Eur. J. Immunol.*, **10**: 417–422, 1980.
- [19] GUPTA S., FERNANDES G., NAIR M., GOOD R. A., Spontaneous and antibody dependent cell-mediated cytotoxicity by human T cell subpopulations, *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **75**: 5137–5141, 1978.
- [20] GÜRTLER L. G., Glycolipid and P40 are the binding sites in the sheep erythrocyte and T lymphocyte membrane responsible for rosette formation, *Immunobiology*, **158**: 426–438, 1981.
- [21] HANJAN S. N. S., TALWAR G. P., KIDWAL Z., NATH J., Delineation and quantitation of human peripheral blood lymphocyte subpopulations by electrophoretic mobility and role of surface charge in cell to cell interaction, *J. Immunol.*, **118**: 235–241, 1977.
- [22] HERBERMAN R. B., HOLDEN H. T., WEST W. H., BONNARD G. D., SANTONI A., NUNN M. E., KAY H. D., ORTALDO J. R., Cytotoxicity against tumors by NK and K cells. *Proceedings of the Sereno Symposia*, Vol. 16, Red. Spreafico F., Arnon R., Academic press, London 1977.
- [23] HOKLAND P., HERON J., Effector cell potential of two human T cell subpopulations with different affinities to sheep erythrocytes, *Scand. J. Immunol.*, **12**: 183–191, 1980.
- [24] HORATIUS R. J., HOSEA J. M., Van EPPS D. E., REED W. P., Immunologic function in humans before and after hyperthermia and chemotherapy for disseminated malignancy, *J. Natl. Canc. Inst.*, **58**: 905–911, 1977.
- [25] HORWITZ S., GROSHONG T., ALBRECHT H., HONG R., The active rosette test in immunodeficiency diseases, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **4**: 405–415, 1975.
- [26] JOHNSEN N. E., MADSEN M., Lymphocytes subpopulations in man: relationship between four subpopulations identified by membrane markers, *Scand. J. Immunol.*, **9**: 419–427, 1979.
- [27] JONDAL M., HOLM G., WIGZEL H., Surface markers on human T and B



- lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells, *J. Exp. Med.*, **136**: 207-215, 1972.
- [28] JONSDOTTIR J., DILLNER M. L., PERLMAN P., Antibody-dependent cellular cytotoxicity and mitogen responsiveness of human peripheral blood lymphocytes differing in avidity for sheep erythrocytes, *Scand. J. Immunol.*, **10**: 525-533, 1979.
- [29] KAPLAN J., Human T lymphocytes form rosettes with autologous and allogenic human red blood cells, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **3**: 471-475, 1975.
- [30] KASZUBOWSKI P. A., GOODWIN J. S., WILLIAMS R. C., Ia antigen on the surface of a subfraction of T cells that bear Fc receptors for IgG, *J. Immunol.*, **124**: 1075-1078, 1980.
- [31] KAY M. M., BELOHRADSKY B., YEE K., VOGEL J., BUTCHER D., WYBRAN J., FUDENBERG H. H., Cellular interactions: scanning electron microscopy human thymus-derived rosette forming lymphocytes, *Clin. Immun. Immunopath.*, **2**: 301-309, 1974.
- [32] KAY H. D., BONNARD G. D., WEST H. W., HERBERMAN R. B., A functional comparison of human Fc-receptors bearing lymphocytes active in natural cytotoxicity, *J. Immunol.*, **118**: 2058-2066, 1977.
- [33] KERMAN R. H., SMITH R., STEFANI S. S., EZDINI E. Z., „Active” T-rosette forming cells in the peripheral blood of cancer patients, *Cancer Res.*, **36**: 3274-3278, 1976.
- [34] KOPEL S., TAUL R. N., MADYASTHA K. R., DEUTSCH W., BAKER M. A., Monosaccharide inhibition of E-rosette formation, *Clin. Immun. Immunopath.*, **15**: 651-657, 1980.
- [35] LUM G. A., MUCHMORE A. V., KERAN L. D., DECKER J., KOSEI J., STROBER W., BLAESE R. M., A receptor for IgA on human T lymphocytes, *J. Immunol.*, **122**: 65-71, 1979.
- [36] LUM L. G., MUCHMORE A. V., O'CONNOR N., STROBER W., BLAESE R. M., Fc-receptor for IgA on human B, and human non-B, non-T lymphocytes, *J. Immunol.*, **123**: 714-719, 1979.
- [37] LUM L. G., BENVENISTE E., BLAESE R. M., Functional properties of human T lymphocytes bearing Fc receptors for IgA. Mitogen responsiveness, mixed lymphocyte culture reactivity and helper activity for B cell immunoglobulin production, *J. Immunol.*, **124**: 702-707, 1980.
- [38] MERCIER P., Rosettes and immuno-cyto-adherence. II. Sheep erythrocytes in man. Factors influencing the reaction, *Biomedicine*, **20**: 131-133, 1974.
- [39] METZGAR H. S., BERTOGLIO J., ANDERSON J. K., BONNARD G. D., RUSCETTI F. W., Detection of HLA-Dr(Ia-like) antigen on human T lymphocytes grown in tissue culture, *J. Immunol.*, **122**: 949-953, 1979.
- [40] MORETTA L., WEBB S. R., GROSSI C. E., LYDYARD P.M., COOPER M. D., Functional analysis of two human T cell subpopulations: help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG, *J. Exp. Med.*, **146**: 184-200, 1977.
- [41] MYŚLIWSKA J., WITKOWSKI J., MYŚLIWSKI A., The proportion of early E-rosettes formed by peripheral blood lymphocytes from young and aged subjects, *Gerontology*, **27**: 140-145, 1981.
- [42] OKUDA N., MORIYA N., MIYAWAKI T., NAGAOKI T., KATO E., TANIGUCHI N., Blocking effect of human T lymphocyte extracts on E-rosette inhibition by sheep red cell fragments, *Clin. Immun. Immunopath.*, **7**: 372-378, 1977.



- [43] OWEN F. L., FANGER M. W., Studies on human T lymphocyte population. The use of a T cell specific antibody in partial isolation and characterization of the human lymphocyte receptor for sheep red blood cells. *J. Immunol.*, **113**: 1138-1144, 1974.
- [44] OWEN F. L., FANGER M. W., Studies on the human T lymphocyte population. III. Synthesis and release of the lymphocyte receptor for sheep red blood cells by stimulated human T lymphocytes, *J. Immunol.*, **115**: 765-770, 1975.
- [45] PANDOLFI F., PAGANELLI R., SIRIANNI, R. C., D'AMELIO R., AIUTI F., Rosette formation with mouse erythrocytes by lymphocytes from normal donors and patients with various diseases. *Z. Immunitäts. Forsch.* **155**: 378-386, 1979.
- [46] PICHLER W. J., BRODER S., Fc-IgM and Fc-IgG receptors on human circulating B lymphocytes, *J. Immunol.*, **121**: 887-890, 1978.
- [47] ROBBINS D. S., DOUNAU G. G., FUDENBERG H. H., Functional subsets of human T cells defined by „active” rosette formation, *Cell. Immunol.*, **59**: 205-218, 1981.
- [48] ROSS G. D., Identifications of human lymphocyte subpopulations by surface markers analysis, *Blood*, **53**: 799-811, 1979.
- [49] ROTH J., Lectins as structural and molecular probes in biological research, histochemistry and ultrahistochemistry, *Postępy Biol. Komórki*, **5**: 49-78, 1978.
- [50] ROSZMAN T. L., BROOKS W. H., MUSE K. W., Effects of preincubation of human peripheral blood lymphocytes on their ability to bind sheep red blood cells, *J. Immun. Meth.*, **14**: 93-100, 1977.
- [51] RUDDERS R. A., ANDERSON J., FRIED R., Binding of IgM aggregates to neoplastic lymphocytes. II. Fc-dependence and implications for a model of B lymphocytes differentiation, *J. Immunol.*, **124**: 2347-2351, 1980.
- [52] SASAKI M., SEKIZAWA T., TAKAHASHI H., ABO T., KUMAGA K., Heterogeneity of human T lymphocytes to bind sheep erythrocytes and mitogenic responses on their subpopulations. *J. Immunol.*, **115**: 1509-1514, 1975.
- [53] SHAW S., PICHLER W. J., NELSON D. L., Fc-receptors on human T-lymphocytes. III. Characterization of subpopulations involved in cell mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity, *J. Immunol.*, **122**: 599-604, 1979.
- [54] SJÖBERG O., Presence of receptors for IgD on human T and non T lymphocytes, *Scand. J. Immunol.*, **11**: 377-382, 1980.
- [55] SMITH R., KERMAN R., EZDINKI E., STEFANI G. A., A modified assay for the detection of human adult active rosette forming lymphocytes, *J. Immun. Meth.*, **8**: 175-181, 1975.
- [56] TANIGUHI M., MIYAWAKI T., MORIYA N., NAGAOKI T., KATO K., OKUDA N., Mitogenic responsiveness and monocyte-lymphocytes interaction of early and late rosette forming cell populations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, **118**: 193-197, 1977.
- [57] TOURAINÉ J. L., HADDEN J. W., TOURAINÉ F., HADDEN E. M., ESTENSEN R., GOOD R. A., Phorbol myristate acetate: mitogen selective for T lymphocyte subpopulation, *J. Exp. Med.*, **145**: 460-465, 1977.
- [58] TRAYCOFF R. B., WORTSMAN J., MYERS W. L., ROGERS W., The significance of the „active”-E-rosette forming cells, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **13**: 383-393, 1979.
- [59] UCHIDA A., MICKSCHE M., Reactivity to autologous non T cells and



- suppressor function of human autologous rosettes, *Immunology Letters*, **3**: 145-149, 1981.
- [60] VESSELA R., GORMUS B. J., LANGE P. H., KAPLAN M. E., Heterogeneity among human lymphocyte effector cells mediating spontaneous lymphocyte-mediated cytotoxicity, *Int. J. Cancer*, **21**: 594-603, 1978.
- [61] WEST W. H., SIENKNECHT C. W., TOWNES A. S., HERBERMAN R. B., Performance of E-rosette assay between lymphocytes and sheep erythrocytes to study patients with cancer and other diseases, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **5**: 60-66, 1976.
- [62] WEST W. H., CANNON G. B., KAY H. D., BONNARD G. D., HERBERMAN R. B., Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line: characterization of effector cells, *J. Immunol.*, **118**: 355-361, 1977.
- [63] WEST W. H., PAYNE S. N., WEESE J., HERBERMAN R. B., Human T lymphocyte subpopulations: correlation between E-rosette forming affinity and expression of the Fc-receptor, *J. Immunol.*, **119**: 548-554, 1977.
- [64] WEST W. H., BOOZER R. B., HERBERMAN R. B., Low affinity rosette formation by the human K cells, *J. Immunol.*, **120**: 90-95, 1978.
- [65] WOODY N. J., Characterization of the active rosette test. I. Technical considerations of the test and comments, *J. Immun. Meth.*, **8**: 331-338, 1975.
- [66] WYBRAN J., FUDENBERG H. H., Thymus-derived rosette forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infection and other diseases, *J. Clin. Invest.*, **52**: 1026-1032, 1972.
- [67] WYBRAN J., CHANTLER S., FUDENBERG H. H., Human Blood T cells: response to phytohemagglutinin, *J. Immunol.*, **110**: 1157-1160, 1973.
- [68] WYBRAN J., CARR M. C., FUDENBERG H. H., Effect of serum on human rosette forming cells in fetusses and adult blood, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **1**: 408-413, 1973.
- [69] WYBRAN J., FUDENBERG H. H., *Clinical Tumor Immunology*, str. 31, Wyd. Wybran J., Stagnet M. J., Pergamon Press, Oxford 1976.
- [70] WYBRAN J., The active T rosette test: its significance and its use. 12th Leucocyte Culture Conference, Wyd. Quatsel M., Academic Press, New York, 745-754, 1979.
- [71] YODOI J., ISHIZAKA K., Lymphocytes bearing Fc-receptors for IgE, *J. Immunol.*, **122**: 2577-2583, 1979.
- [72] YU D. T. Y., Human lymphocyte subpopulation: early and late rosette, *J. Immunol.*, **115**: 91-92, 1975.
- [73] YU D. T. Y., The response of human „early” and „late” rosette forming lymphocytes to mixed and autologous lymphocyte cultures and mitogens, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **10**: 11-18, 1978.

*Otrzymano: 30 czerwca 1982.*

*Przyjęto: 9 grudnia 1982.*

*Adres autorki: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.*



- 101. ...
- 102. ...
- 103. ...
- 104. ...
- 105. ...
- 106. ...
- 107. ...
- 108. ...
- 109. ...
- 110. ...
- 111. ...
- 112. ...
- 113. ...
- 114. ...
- 115. ...
- 116. ...
- 117. ...
- 118. ...
- 119. ...
- 120. ...
- 121. ...
- 122. ...
- 123. ...
- 124. ...
- 125. ...
- 126. ...
- 127. ...
- 128. ...
- 129. ...
- 130. ...
- 131. ...
- 132. ...
- 133. ...
- 134. ...
- 135. ...
- 136. ...
- 137. ...
- 138. ...
- 139. ...
- 140. ...
- 141. ...
- 142. ...
- 143. ...
- 144. ...
- 145. ...
- 146. ...
- 147. ...
- 148. ...
- 149. ...
- 150. ...
- 151. ...
- 152. ...
- 153. ...
- 154. ...
- 155. ...
- 156. ...
- 157. ...
- 158. ...
- 159. ...
- 160. ...
- 161. ...
- 162. ...
- 163. ...
- 164. ...
- 165. ...
- 166. ...
- 167. ...
- 168. ...
- 169. ...
- 170. ...
- 171. ...
- 172. ...
- 173. ...
- 174. ...
- 175. ...
- 176. ...
- 177. ...
- 178. ...
- 179. ...
- 180. ...
- 181. ...
- 182. ...
- 183. ...
- 184. ...
- 185. ...
- 186. ...
- 187. ...
- 188. ...
- 189. ...
- 190. ...
- 191. ...
- 192. ...
- 193. ...
- 194. ...
- 195. ...
- 196. ...
- 197. ...
- 198. ...
- 199. ...
- 200. ...



LIMFOCYTY T TWORZĄCE WCZESNE ROZETKI  
II. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA LICZBĘ LIMFOCYTÓW T  
TWORZĄCYCH WCZESNE ROZETKI

T LYMPHOCYTES FORMING EARLY ROSETTES  
II. FACTORS MODULATING THE NUMBER OF T LYMPHOCYTES FORMING  
EARLY ROSETTES

Jolanta MYŚLIWSKA

Zakład Histologii, Instytut Biologii Medycznej, Akademia Medyczna, Gdańsk

*Streszczenie.* Wartości bezwzględne, jak i odsetek komórek tworzących wczesne rozetki podlegają zależnym od wieku wahaniom. Istnieje zależność pomiędzy stanem klinicznym pacjentów a liczbą rozetek we krwi. W schorzeniach związanych z niedoborami immunologicznymi, chorobach wirusowych oraz procesach nowotworowych dochodzi do spadku liczby komórek tworzących wczesne rozetki. Liczba komórek tworzących wczesne rozetki może być miarą odporności komórkowej organizmu. Wzrastające wartości sygnalizują zachodzącą odpowiedź immunologiczną, podczas gdy obniżony ich poziom wskazuje na brak mobilizacji immunologicznej.

*Summary.* The absolute values as well as the percentage of early rosette forming lymphocytes fluctuate with age. There was found a relationship between the clinical state of patients and the amount of rosettes; with tendency to become depressed in immunologic deficiency states, viral diseases and cancer processes. The number of early rosette forming lymphocytes is considered to be a measure of cell-mediated immunity. The increased values signalize an on — going immune response, while a decreased number of such cells points to the impairment of immunologic mobilization.

WPROWADZENIE

Miejsca receptorowe wiążące erytrocyty barana na powierzchni limfocytów T są strukturami podlegającymi procesowi ciągłej wymiany. Procesowi aktywnej syntezy nowych receptorów [3] towarzyszy uwalnianie starych cząstek receptorowych [32]. Proces ten jest szczególnie nasilony w limfocytach stymulowanych do transformacji blastycznej



i podziału, w komórkach spoczynkowych zaś wymiana receptorów jest niewielka.

Spontaniczna wymiana receptorów, wiążących erytrocyty barana, w komórkach spoczynkowych może być stymulowana nie tylko działaniem substancji o charakterze antygenowym bądź mitogennym, ale także przez szereg innych niespecyficznych substancji [36]. Przyjmuje się istnienie dwóch mechanizmów regulujących intensywność wymiany receptorów. Jeden z nich polega na bezpośrednim oddziaływaniu substancji — modyfikatora — na metabolizm limfocytów. Inne zaś substancje, w sposób niespecyficzny, wpływają na własności powierzchniowe limfocytów. Prowadzą one do zmiany ładunku elektrycznego powierzchni limfocytów, zmieniając wzajemną adhezję limfocytów i krwinek barana. Tak więc ilość wykrywanych rozetek jest wypadkową stanu metabolicznego limfocytów oraz niespecyficznego oddziaływania środowiska pozakomórkowego.

Pomimo istnienia tak wielu możliwości modyfikowania wzajemnych kontaktów między limfocytami T oraz krwinkami barana, liczba limfocytów T we krwi osób zdrowych wykazuje znaczną stabilność. Stanowi ona około 60–80% limfocytów krwi obwodowej. Czynniki pozakomórkowe wpływają natomiast na wielkość frakcji limfocytów T, posiadającej receptory wysokiego powinowactwa do krwinek barana, a więc tworzącej wczesne rozetki.

Do znacznych zmian w charakterze środowiska zewnątrzkomórkowego dochodzi w szeregu jednostkach chorobowych, w tym szczególnie w chorobach z niedoboru immunologicznego, chorobach wirusowych oraz nowotworowych [41]. W związku z tym, zależność między stanem zdrowia, w tym głównie odpornością komórkową, a zdolnością limfocytów do tworzenia wczesnych rozetek była przedmiotem licznych badań.

#### KORELACJA MIĘDZY POZIOMEM WCZESNYCH ROZETEK WE KRWI OBWODOWEJ CZŁOWIEKA A STANEM ZDROWIA

W warunkach zdrowia liczba limfocytów tworzących wczesne rozetki, oceniana zarówno metodą Wybrana [47], jak i za pomocą innych modyfikacji testu rozetowego, waha się w granicach od kilkunastu do ponad 40% limfocytów krwi obwodowej [4, 8, 11, 23, 29, 48]. Metoda Westa [44] ujawnia natomiast około 50% limfocytów posiadających receptory wysokiego powinowactwa do SRBC [44, 45], które odpowiadają komórkom tworzącym „aktywne” lub „wczesne” rozetki w metodzie Wybrana.

Mimo tak znacznych różnic w poziomie wyjściowym wczesnych rozetek we krwi obwodowej człowieka, kierunek odchylenia od tego poziomu



pozostaje w ścisłej korelacji ze stanem immunologicznym i klinicznym pacjenta, bez względu na stosowaną metodę oceny ilości tych komórek.

Najwięcej danych pochodzi jednak z badań przeprowadzonych metodą Wybrana. Badania te dostarczyły między innymi dowodu na istnienie zależności między poziomem limfocytów tworzących aktywne rozetki a stanem klinicznym pacjentów z chorobą nowotworową. Jak wykazano bowiem [47], odsetek tych komórek spada u chorych z procesem nowotworowym, przy czym szczególnie wyraźne obniżenie obserwuje się w zaawansowanym okresie choroby. Okresy remisji charakteryzują się natomiast normowaniem poziomu wczesnych rozetek. Spadek liczby wczesnych rozetek może wyprzedzać kliniczne, radiologiczne i chemiczne objawy przerzutów nowotworowych u chorych, którym usunięto nowotwór pierwotny chirurgicznie [11].

Tendencję spadkową można obserwować również u chorych ze schorzeniami wirusowymi [21, 22, 47].

Obniżenie odsetka aktywnych rozetek obserwowano także w chronicznej białaczce limfatycznej, gościu przewlekłe postępującym oraz w szeregu jednostkach niedoboru immunologicznego [8, 20, 47, 48].

Poziom aktywnych rozetek zmienia się także u biorców przeszczepów nerkowych. Badania pacjentów z chroniczną niedomogą nerek przygotowywanych do zabiegu intensywną immunosupresją [25] ujawniły, że w okresie tym dochodzi do spadku liczby aktywnych rozetek. Po zabiegu transplantacji liczba rozetek wzrasta osiągając wartości nieco niższe aniżeli u ludzi zdrowych. Ponowny spadek komórek tworzących aktywne rozetki obserwowano również w fazie ostrego odrzucenia przeszczepu. Kelly i wsp. [24] przeprowadzili kilkuletnie badania biorców, u których nie obserwowano objawów odrzucenia przeszczepu. Stwierdzili oni, że w 3–5 tygodni po zabiegu poziom wczesnych rozetek powrócił do wartości charakterystycznych dla okresu przedoperacyjnego. Dalsza obserwacja prowadzona przez okres dwuletni wykazała utrzymywanie się prawidłowego poziomu aktywnych rozetek — wskazując, że supresja farmakologiczna nie zawsze musi prowadzić do obniżenia liczby limfocytów posiadających receptory wysokiego powinowactwa do SRBC. Autorzy wnioskują, że poziom aktywnych rozetek nie może być wyznacznikiem skuteczności terapii farmakologicznej. Zakres bowiem stosowanej supresji farmakologicznej zależy przede wszystkim od stopnia odrębności antygenowej między dawcą i biorcą. Zdaniem autorów test rozetowy może być użyteczny we wczesnym rozpoznaniu odrzucenia przeszczepu.

Dane dotyczące zachowania się limfocytów z receptorami wysokiego powinowactwa do SRBC, wyznakowanych metodą Westa, pozwalają na ustalenie podobnych korelacji. Quan i wsp. [34] oraz West [44], zajmując



się głównie pacjentami z chorobą nowotworową, wykazali, że poziom limfocytów o wysokim powinowactwie do krwinek barana ulega wyraźnemu obniżeniu u chorych z zaawansowanym procesem nowotworowym. W trakcie stosowanego leczenia obserwuje się powrót do normy.

Liczba limfocytów o wysokim powinowactwie do krwinek barana spada także w chorobach wirusowych, a także okresie następującym bezpośrednio po przebyciu zabiegów chirurgicznych, jak: cholecystektomia, apendektomia, a także po zawale serca. Również w tym przypadku poprawie klinicznej towarzyszyło normowanie się poziomu rozetek. Zdaniem Westa [44] jego metoda jest szczególnie przydatna do wykrycia toczącego się procesu nowotworowego. Przyjęta przez autora temperatura  $+29^{\circ}\text{C}$  została ustalona empirycznie jako taka, w której najbardziej ujawniają się różnice w powinowactwie do SRBC między limfocytami od osób zdrowych i pacjentami z chorobą nowotworową.

Powszechnie przyjmuje się, że odsetek aktywnych rozetek, pozostając w ścisłej korelacji ze stanem zdrowia pacjenta, może być miarą odporności komórkowej. Jednym z przykładów pozwalających na wysunięcie takich wniosków są dane z badań Wybrana [48], w których ocenił on zachowanie się aktywnych rozetek w zespole Wiskotta-Aldricha, charakteryzującym się upośledzeniem odporności komórkowej. Zespół ten cechuje się podatnością na leczenie przy użyciu ekstraktu z leukocytów zwanego czynnikiem przenoszenia (transfer factor). Autor stwierdził, że u tej części pacjentów, która zareagowała na leczenie poprawą kliniczną, obserwowano dochodzenie do normy obniżonej wyjściowo liczby aktywnych rozetek. Podkreślając rolę aktywnych rozetek, jako wykładnika odporności komórkowej organizmu, autor wskazał na całkowity brak korelacji między statusem immunologicznym pacjenta a całkowitą ilością limfocytów T.

Zgodnie z poglądem Horwitza [20] zmiana odsetka komórek tworzących wczesne rozetki odzwierciedla zmianę stanu odporności komórkowej. Pogląd ten opiera się na badaniach, w których stwierdzono istnienie wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy liczbą wczesnych rozetek u pacjentów a reaktywnością *in vitro* ich limfocytów na stymulację za pomocą fitohemaglutyniny (PHA), komórek allogenicznych oraz zachowaniem się odczynów skórnych w następstwie stymulacji antygenowej.

Na fakt, że przyrost limfocytów tworzących wczesne rozetki jest pewnego rodzaju nieswoistą odpowiedzią na antygen wskazują uzupełniające się, przeprowadzone *in vivo* oraz *in vitro*, badania Felsburga. Wykazał on bowiem na grupie ochotników, którym jako antygen podano oczyszczony preparat tuberkuliny (PPD — purified protein derivative) oraz antygen tularemii, że w następstwie wtórnego podania antygeny,



obok zmanifestowania się pozytywnych odczynów skórnych, dochodzi także do wzrostu odsetka komórek tworzących wczesne rozetki [9]. W kolejnym badaniu uczulanie antygenem odbyło się *in vivo*, zaś wtórne podanie tego samego antygeny przeprowadzono *in vitro*. Również w tym przypadku zaobserwowano wzrost liczby wczesnych rozetek, towarzyszący wtórnej odpowiedzi immunologicznej [10].

Wzrost odsetka wczesnych rozetek w takich chorobach jak ostre reumatyczne zapalenie wsierdzia oraz płasawica [46] można także traktować jako nieswoistą odpowiedź na stymulację antygenową.

Z badań tych więc wynika, że liczba limfocytów o zdolności tworzenia wczesnych rozetek może być traktowana jako rodzaj wskaźnika. W przypadku podwyższonych wartości jest to sygnał pozytywny, świadczący o rozgrywającej się w ustroju odpowiedzi immunologicznej. Obniżenie liczby komórek tworzących wczesne rozetki świadczy o braku mobilizacji immunologicznej i jest objawem niekorzystnym.

Ciekawa wydaje się sugerowana przez Wybrana możliwość traktowania wczesnych rozetek jako indeksu nadzoru immunologicznego. Autor śledził przez wiele lat zachowanie się liczby aktywnych rozetek u wybranych osób [50]. Stwierdził on, że w pewnych przypadkach obniżony poziom rozetek na długi czas wyprzedzał pojawienie się objawów związanych z procesem nowotworowym. Obniżony poziom rozetek obserwował on także u znacznego odsetka osób należących do rodzin obciążonych dziedzicznie chorobą nowotworową.

#### WCZESNE ROZETKI W ASPEKCIE WIEKU CZŁOWIEKA

Całkowita pula limfocytów T wykazuje zależne od wieku zarówno ilościowe, jak i jakościowe przeobrażenia. Odsetek limfocytów T pozostaje niski w okresie dzieciństwa [2, 27] i osiąga najwyższe wartości w wieku dojrzałym [2]. Zmiany jakim ma podlegać zarówno odsetek, jak i bezwzględna zawartość limfocytów T u ludzi w okresie starzenia się są przedmiotem kontrowersji. Część bowiem autorów uważa, że liczba limfocytów T maleje z wiekiem [2, 26, 27, 35]. Istnieją jednak także doniesienia na temat stabilności tej puli w ciągu całego życia człowieka [5, 15, 33], a nawet wzrostu zawartości komórek T z wiekiem [16, 43].

Na tym tle w sposób charakterystyczny przebiegają przeobrażenia ilościowe w obrębie subpopulacji limfocytów T o wysokim powinowactwie do krwinek barana. Krew pępowinowa jest szczególnie bogata w komórki należące do frakcji posiadającej receptory wysokiego powinowactwa do erytrocytów barana. Stanowią one bowiem około 90% populacji limfocytów T, podczas gdy u człowieka dorosłego udział analogicznej frakcji tylko w krańcowych przypadkach osiąga wartość 70% [27].



Procesowi starzenia towarzyszą przesunięcia w puli limfocytów T. Clot i wsp. [4] oraz Kishimoto i wsp. [26] stosując test Wybrana wykazali wzrost liczby limfocytów tworzących aktywne rozetki we krwi ludzi starych. Stwierdzone przez nich różnice nie były wielkie, aczkolwiek znamienne statystycznie. Znacznie bardziej różnice te uwidoczniły się przy zastosowaniu w teście rozetowym temperatury  $+4^{\circ}\text{C}$  oraz uproszczonego środowiska inkubacyjnego [29]. Uchwycenie w tych warunkach większych różnic można uważać za wynik obniżonej temperatury. Neilan i wsp. [31] nie wykazali jednak istnienia związanych z wiekiem różnic w odsetku aktywnych rozetek.

Mimo dość zróżnicowanych poglądów na temat ilościowych zmian całkowitej puli limfocytów T w procesie starzenia wydaje się, że za najbardziej miarodajne dane można przyjąć wyniki najnowszych badań [5, 15], gdyż szczególną troską ich autorów było wyselekcjonowanie grupy ludzi starych nie ujawniających objawów jakichkolwiek schorzeń. Autorzy ci uważają, że liczba limfocytów T nie ulega zmianie z wiekiem. Obserwowane zaś upośledzenie funkcji limfocytów T przyjmowane jest jako wynik przesunięć w obrębie subpopulacji limfocytów T, jak również zaburzenia w zakresie kooperacji między limfocytami T oraz innymi komórkami limfatycznymi.

Towarzyszące procesowi starzenia zjawisko wzrostu liczby limfocytów T o wysokim powinowactwie do SRBC nie znalazło do tej pory wytłumaczenia. Świadczy ono w każdym razie o większym stopniu zaktywowania limfocytów T u ludzi starych aniżeli młodych. Być może jest to proces kompensacyjny wobec stopniowego obniżania się efektywności funkcji limfocytów T, powodujący zaangażowanie większej puli limfocytów T w aktualnie zachodzącą odpowiedź komórkową. Zwiększona liczba wczesnych rozetek w procesie starzenia może być związana z wyższą koncentracją cGMP limfocytów ludzi starych [40].

#### CZYNNIKI REGULUJĄCE WIELKOŚĆ PULI LIMFOCYTÓW T O WYSOKIM POWINOWACTWIE DO ERYTROCYTÓW BARANA

Fakt obserwowania w hodowlach stymulowanych limfocytów przyrostu komórek T zdolnych do tworzenia wczesnych rozetek sugerował, że u podstawy generowania tych komórek występuje proliferacja komórkowa [38].

Wyniki te nie wykluczały jednak istnienia innego mechanizmu tworzenia komórek o zdolności do „aktywnego” przyłączania SRBC. Komórki te mogą bowiem powstawać z istniejącej już puli limfocytów T w wyniku stymulacji. Obserwacje Felsburga [9, 10], z których wynika, że już po kilku godzinach kontaktu z antygenem dochodzi do wzrostu



liczby komórek tworzących aktywne rozetki, potwierdzają tę sugestię. Również z badań Gergely i wsp. [14] wynika, że proliferacja nie jest warunkiem niezbędnym dla wzrostu liczby limfocytów tworzących wczesne rozetki. Autorzy ci zaobserwowali, że w hodowlach stymulowanych mitogenami limfocytów, do wzrostu liczby komórek wiążących erytrocyty barana dochodzi już we wczesnym, poprzedzającym fazę proliferacji, etapie aktywacji komórek.

Pewne światło na mechanizm nabywania przez limfocyty zdolności wiązania SRBC rzucają badania Agbaty i wsp. [1] oraz Wybrana i wsp. [49]. Autorzy ci analizowali nadsącz pochodzący z hodowli limfocytów. W nadsączu tym wykryto obecność czynników wzmagających proces tworzenia aktywnych rozetek. Czynniki te określono jako: „rosetting factor” [49] oraz „rosette augmenting factor” [1]. Rosetting factor produkowany był w maksymalnej ilości między pierwszym a drugim dniem hodowli mieszanej. Hamujący wpływ cyklohexamidu i mitomycyny C na aktywność nadsączu sugerował, że czynnik wzmagający tworzenie rozetek jest aktywnie syntetyzowany przez komórki.

Zdaniem Wybrana [50] analogiczny proces mógłby zachodzić *in vivo* pod wpływem stymulacji antygenowej. Przyjmuje on także możliwość uwalniania „rosetting factor” do surowicy. Mogłoby to jego zdaniem tłumaczyć korzystny wpływ surowicy na tworzenie się rozetek w warunkach doświadczalnych *in vitro*.

Procesy immunologiczne nie są jednak jedyną drogą indukowania aktywnych rozetek. Jednym z czynników efektywnie indukującym proces tworzenia aktywnych rozetek jest bogate środowisko hodowlane. Cockerel i wsp. [6] preinkubując limfocyty w temperaturze  $+37^{\circ}\text{C}$  uzyskali wzrost liczby komórek limfatycznych zdolnych do wiązania SRBC, przy czym zakres tego wzrostu był większy aniżeli otrzymany w wyniku inkubacji limfocytów w obecności tymozyny. Tymozyna należy do tych stymulatorów procesu tworzenia rozetek, których efekt uwidacznia się już po krótkim okresie ekspozycji na jej działanie [6]. Podobny efekt wzmożenia zdolności limfocytów do wiązania SRBC obserwowano pod wpływem levamisolu [28] oraz karbacholu [42]. Czynniki te zaliczane są do immunostymulatorów.

Spośród innych immunostymulatorów także czynnik przenoszenia (transfer factor) [19] oraz lynestrenol [37] ułatwiają tworzenie aktywnych rozetek. Działanie czynnika przenoszenia w warunkach *in vitro* występuje również po krótkim kontakcie limfocytów z tym czynnikiem. Jego wpływ na limfocyty manifestuje się nie tylko wzmożeniem zdolności do tworzenia rozetek [19, 30], ale także przyspiesza on zdolność resyntezy receptorów dla SRBC na powierzchni komórek limfatycznych, poddanych działaniu trypsyny [19]. Znane są także obszerne badania kli-



niczne, których celem było wprowadzenie czynnika przenoszenia do terapii niektórych schorzeń związanych z niedoborami immunologicznymi. W badaniach tych wykazano istnienie dodatniego sprzężenia między zdolnością do indukowania komórek o wzmożonej aktywności w przyłączeniu SRBC a poprawą stanu klinicznego pacjentów oraz przywróceniem prawidłowych wartości dla niektórych testów immunologicznych [48]. Wyłącznie ta grupa pacjentów, która zareagowała poprawą stanu klinicznego, wykazała jednocześnie podwyższone wartości liczby limfocytów tworzących aktywne rozetki. Czynniki przenoszenia okazały się również skuteczne w leczeniu choroby Hodgkina. W schorzeniu tym limfocyty krwi obwodowej cechuje upośledzenie zdolności wiązania SRBC, zaś podanie ich działaniu czynnika przenoszenia zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, przywraca zdolność wiązania erytrocytów do poziomu charakterystycznego dla ludzi zdrowych [19]. Nekam [30] śledził wpływ czynnika przenoszenia na stan kliniczny pacjentów z różnego typu procesami nowotworowymi oraz na zachowanie się testu zahamowania migracji limfocytów. Cechą bowiem charakterystyczną limfocytów jest zahamowanie ich migracji w obecności antygeny. Własność tę limfocyty tracą podczas choroby nowotworowej, lecz odzyskują pod wpływem czynnika przenoszenia. Czynniki przenoszenia prowadziły do normalizacji liczby wczesnych rozetek u wszystkich pacjentów. Nie u wszystkich jednak chorych równoległe z normalizacją liczby rozetek doszło do poprawy stanu klinicznego.

Najczęściej proponowanym mechanizmem nadzorującym proces tworzenia wczesnych rozetek są zmiany w poziomie cyklicznych nukleotydów — cAMP i cGMP. Spadek poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP z jednoczesnym wzrostem poziomu cGMP jest zjawiskiem sprzyjającym tworzeniu rozetek [12, 13, 50]. Szereg wymienionych już związków z grupy stymulatorów procesu tworzenia rozetek, jak np. tymozyna i karbachol, prowadzą do tego właśnie rodzaju przesunięć w wewnątrzkomórkowym poziomie cyklicznych nukleotydów [12, 13]. Tak więc wzajemny stosunek między stężeniem cAMP i cGMP w limfocytach jest istotnym czynnikiem dla stanu receptorów na powierzchni komórek T.

Być może jednym z ogniw pośredniczących w procesie tworzenia wczesnych rozetek, podlegającym sterowaniu przez cykliczne nukleotydy, jest układ mikrotubul. Czynniki hamujące formowanie mikrotubul, jak immunosupresyjne alkaloidy roślinne — winblastyna i winkrystyna, wzmagają zdolność limfocytów do tworzenia wczesnych rozetek [50]. Zatem obok antygenów i mitogenów oddziałujących na określone subpopulacje komórek limfatycznych, również szereg nieswoistych substancji zwiększa zdolność limfocytów T do tworzenia wczesnych rozetek.

Ten sam charakter wahań w poziomie cyklicznych nukleotydów, który



przyczynia się do indukcji aktywnych rozetek — a więc wzrost koncentracji cyklicznego cGMP z równoczesnym spadkiem stężenia cAMP — obserwuje się również w komórkach stymulowanych do podziału antygenami bądź mitogenami [7, 17, 18, 39].

W limfocytach ludzi starych dochodzi do zaburzenia regulacji poziomu cyklicznych nukleotydów [40]. W komórkach tych obserwuje się spadek koncentracji cAMP oraz wielokrotne podwyższenie wartości stężenia cGMP. Tak więc związane z wiekiem zmiany w metabolizmie cyklicznych nukleotydów komórek limfatycznych stwarzają warunki sprzyjające procesowi tworzenia wczesnych rozetek.

O ile wzrośtowi liczby wczesnych rozetek w wyniku stymulacji antygenowej czy mitogennej towarzyszy z reguły także nabycie przez te komórki zdolności do manifestowania wyższej aktywności w testach immunologicznych, o tyle komórki aktywne indukowane działaniem nieswoistych stymulatorów nie zawsze objawiają lepszą kompetencję immunologiczną [6, 42].

Wybran [50] zwrócił uwagę na aspekt praktyczny testu tworzenia aktywnych rozetek — mianowicie sugeruje on zastosowanie tego testu do oceny immunostymulacyjnych własności leków podczas przeglądowych badań populacji ludzkich.

#### LITERATURA

- [1] AGBATA A. J., KIRKPATRICK C. H., Release of E-rosette augmenting factor (ERAF) after stimulation of human leucocytes with mitogens or antigens, *J. Immunol.*, **122**: 1080–1086, 1979.
- [2] BEN ZWI A., GALILI U., RUSSEL A., SCHLESINGER E., Age-associated changes in subpopulations of human lymphocytes, *Clin. Immun. Immunopath.*, **7**: 139–149, 1977.
- [3] BUSHIN S. C., PANTIC V. S., GOOD R. A., RNA and protein synthesis in spontaneous rosette formation by T lymphocytes, *J. Immunol.*, **115**: 866–870, 1975.
- [4] CLOT J., CHARMASSON E., BRECHIER J., Age-dependent changes of human blood lymphocytes subpopulations, *Clin. Exp. Immunol.*, **32**: 346–351, 1972.
- [5] COBLEIGH M. A., BRAUN D. P., HARRIS J. E., Age-dependent changes in human peripheral blood B cells and T cells subsets: correlation with mitogen responsiveness, *Clin. Immun. Immunopath.*, **15**: 162–174, 1980.
- [6] COCKERELL G. L., BALDWIN C. L., Increased spontaneous erythrocyte rosette formation of feline lymphocytes preincubated at 37°C, *J. Immunol. Meth.*, **28**: 369–379, 1979.
- [7] DIAMANSTEIN T., ULMER A., Effect of cyclic nucleotides on DNA synthesis in mouse lymphoid cells, *Immun. Commun.*, **4**: 51–62, 1975.
- [8] ESPINOZA R. L., GAYLORD S. W., BERGEN L., VASEY F. B., GERMAIN B. F., OSTERLAND K., The „active” rosette test in rheumatoid arthritis:



- correlation with disease activity, *Clin. Immun. Immunopath.*, **17**: 110–116, 1980.
- [9] FELSBURG P. J., EDELMAN R., GILMAN R. H., The „active” E-rosette test: correlation with delayed cutaneous hypersensitivity, *J. Immunol.*, **116**: 1110–1114, 1976.
- [10] FELSBURG P. J., EDELMAN R., The „active” E-rosette test a sensitive in vitro correlate for human delayed hypersensitivity, *J. Immunol.*, **118**: 62–66, 1978.
- [11] FUDENBERG H. H., WYBRAN J., ROBBINS D. T., T-rosette forming cells. Cellular immunity and cancer, *N. Engl. J. Immunol.*, **292**: 475–476, 1975.
- [12] GALANT S. P., REMO R. A.,  $\beta$ -adrenergic inhibition of human T lymphocyte rosettes, *J. Immunol.*, **114**: 512–513, 1975.
- [13] GALANT S. P., LUNDAK R. L., EATON L., Enhancement of early human rosette formation by cholinergic stimuli, *J. Immunol.*, **117**: 48–51, 1976.
- [14] GERGELY P., VANKY F., KLEIN E., Spontaneous and PHA-induced rosetting of human blood, tonsil lymphocytes and MLC blasts with sheep, human and horse erythrocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **25**: 23–27, 1976.
- [15] GUPTA S., GOOD R. A., Subpopulations of human T lymphocytes. X. Alterations in T, B, third subpopulation cells with receptors for immunoglobulin M ( $T_{\mu}$ ) or G ( $T_{\gamma}$ ) in ageing humans, *J. Immunol.*, **112**: 1214–1219, 1979.
- [16] HALLGREN H. M., KERSEY J. H., DUBEY D. P., YUNIS E. J., Lymphocyte subsets and integrated immune functions in ageing humans, *Clin. Immun. Immunopath.*, **10**: 65–78, 1978.
- [17] HADDEN J. W., HADDEN E. M., HADDOV M. K., GOLDBERG N. D., Guanosine 3'5' cyclic monophosphate: a possible intercellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69**: 3024–3027, 1972.
- [18] HADDOX M. K., FURCHT L. Z., GENTRY S. L., MOSER M. E., STEPHENSON J. H., GOLDBERG N. D., Periodate-induced increase in cyclic GMP in mouse and guinea pig splenic cells in association with mitogenesis, *Nature*, **262**: 146–148, 1976.
- [19] HOLZMAN R. S., LAWRENCE H. S., In vitro augmentation of lymphocyte sheep cell rosette formation by leucocyte dialysates, *J. Immunol.*, **118**: 1672–1676, 1977.
- [20] HORWITZ S., GROSHONG T., ALBRECHT H., HONG R., The active rosette test in immunodeficiency diseases, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **4**: 405–414, 1975.
- [21] ISHIGURO T., OZAKI Y., YOKOYAMA M. M., TSENG C. H., CHAO W., Peripheral lymphatic subpopulations in patients with herpes genitalis, *Immunobiology*, **157**: 24–29, 1980.
- [22] ISHIGURO T., OZAKI Y., YOKOYAMA M. M., CHAO W., TSENG C. H., Alteration of early T lymphocyte count in patients with herpes genitalis, *Experientia*, **35**: 1519–1520, 1979.
- [23] JONSDOTTIR J., DILLNER M. L., PERLMAN P., Antibody-dependent cellular cytotoxicity and mitogen responsiveness of human peripheral blood lymphocytes differing in avidity for sheep erythrocytes, *Scand. J. Immunol.*, **10**: 525–533, 1979.
- [24] KELLY G. E., SHEIL A. G., E-rosette forming cell number in the blood of human renal allograft recipients, *Clin. Exp. Immun.*, **27**: 454–463, 1977.
- [25] KERMAN R. H., GEIS W. H., Total and active T cell dynamics in renal allograft recipients, *Surgery*, **79**: 398–407, 1976.



- [26] KISHIMOTO S., TOMITO S., INOMATA K., KOTEGAWA K., SAITO T., KUROKI M., MITSUYA H., HITSAMITSU A., Age related changes in the subsets and function of human lymphocytes, *J. Immunol.*, **121**: 1773-1780, 1978.
- [27] MACKLER B. F., RICHIE E., SWATE T., T cell subpopulation shifts in human cord blood high and low affinity E-RFC, *Clin. Immun. Immunopath.*, **15**: 238-244, 1980.
- [28] MORIYA N., MIYAWAKI K., SEKI H., KUBO M., NAGAOKI T., OKUDA N., TANIGUHI N., Induction of suppressor activity on B cell differentiation in human T cell subsets without Fc (IgG) receptors by levamisole, *Scand. J. Immunol.*, **10**: 535-541, 1979.
- [29] MYŚLIWSKA J., WITKOWSKI J., MYŚLIWSKI A., The proportion of early E-rosette formed by peripheral blood lymphocytes from young and aged subjects, *Gerontol.*, **27**: 140-145, 1981.
- [30] NEKAM K., KALMAR L., GERGELY P., KELEMEN G., FEKETE B., LANG I., LEVAI Y., PETRANYI G. Y., In vitro effect of transfer factor on „active” rosettes and leucocyte migration of patients with cancer, *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 416-420, 1977.
- [31] NEILAN B. A., ZADDEININ L., Active rosette-forming T cells in the elderly, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **27**: 170-173, 1979.
- [32] OWEN F. L., FANGER M. W., Studies on the human T lymphocyte population. III. Synthesis and release of the lymphocyte receptor for sheep red blood cells by stimulated human T lymphocytes, *J. Immunol.*, **115**: 765-770, 1975.
- [33] PORTARO R., GLICK G., ZIGHELBOIM J., Population immunology: Age and immune cell parameters, *Clin. Immunol., Immunopath.*, **11**: 339-345, 1978.
- [34] QUAN P. C., BURTIN P., E-rosette forming cells at 29°C an assay for evaluation of the immune status of cancer patients. *Br. J. Cancer*, **38**: 606-611, 1978.
- [35] REDDY M. M., KONG-OO G. B., B and T lymphocytes in man. IV. Circulating B, T, and null lymphocytes in ageing population. *J. Gerontol.*, **34**: 5-8, 1979.
- [36] SERGENT I. L., SALAMAN M. R., VALDIMARSSON H., Dual action of leucocyte dialysates and of thymosin on the recovery of sheep-cell-rosetting capacity in trypsinized human lymphocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **47**: 183-190, 1982.
- [37] SEKALY R. P., The 4th European Immunological Meeting, Budapest, str. 50, 1978.
- [38] SEMENZATO G., AMADORI G., SARASIN P., GASPAROTTO G., Active E-rosette formation by human lymphoblasts, *Immunology*, **34**: 721-724, 1978.
- [39] SMITH J. W., STEINER A., NEWBERRY W. M., PARKER C. W., Cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation, *J. Clin. Invest.*, **50**: 423-441, 1971.
- [40] TAM C. F., WALFORD R. L., Alteration in cyclic nucleotides and cyclase specific activities in T lymphocytes in ageing normal humans and patients with Down's syndrome, *J. Immunol.*, **125**: 1665-1670, 1980.
- [41] THEOFILOLOULOS A. N., Evaluation and clinical significance of circulating immune complexes, *Progr. Clin. Immunol.*, **4**: 63-106, 1980.
- [42] TRAYCOFF R. B., WORTSMAN J., MYERS W. L., ROGERS W., The significance of the „active” E-rosette forming cells, *Clin. Immunol. Immunopath.*, **13**: 383-393, 1979.



- [43] WEINER W. H., SCRIBNER D. L., SCHOCKET A. L., Increased proliferative response of human blood lymphocytes to anti-immunoglobulin antibodies, *Clin. Immun. Immunopath.*, **9**: 356-362, 1978.
- [44] WEST W. H., SIENKNECHT C. W., TOWNES A. S., HERBERMAN R. B., Performance of E-rosette assay between lymphocytes and sheep erythrocytes to study patients with cancer and other diseases, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **5**: 60-66, 1976.
- [45] WEST W. H., BOOZER R. B., HERBERMAN R. B., Low affinity E-rosette formation by human K cells, *J. Immunol.*, **120**: 90-95, 1978.
- [46] WILLIAMS R. C., ZABRISKIE J. B., MAHROS F., HASSABALLA F., ABDIN Z. H., Lymphocyte surface markers in acute rheumatic fever and post-streptococcal acute glomerulonephritis, *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 135-142, 1977.
- [47] WYBRAN J., FUDENBERG H. H., Thymus-derived rosette forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases, *J. Clin. Invest.*, **52**: 1026-1032, 1972.
- [48] WYBRAN J., LEVIN A. S., SPLITER L., FUDENBERG H. H., Rosette forming cells, immunologic deficiency diseases and transfer factor, *N. Engl. J. Med.*, **288**: 710-713, 1973.
- [49] WYBRAN J., GOAVERTS A., The rosetting factor of human mixed lymphocyte cultures, *Clin. Immun. Immunopath.*, **9**: 240-247, 1978.
- [50] WYBRAN J., The active T rosette test: its significance and its use. 12th Leucocyte Culture Conference, *Wyd. Quatsel M., Academic press, New York*, 745-754, 1979.

*Otrzymano: 30 czerwca 1982.*

*Przyjęto: 9 grudnia 1982.*

*Adres autorki: ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk.*



TRANSFORMOWANIE KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH PRZEZ  
OBCY MATERIAŁ GENETYCZNY: EKSPRESJA GENU REDUKTAZY  
DIHYDROFOLIANOWEJ

TRANSFORMATION OF EUKARIOTIC CELLS IN VITRO BY EXOGENOUS  
GENETIC MATERIAL: EXPRESSION OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE GENE

Barbara GRZELAKOWSKA-SZTABERT

Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej  
im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

*Streszczenie.* W artykule dokonano przeglądu metod stosowanych do transformowania komórek ssaków przez obcy materiał genetyczny. Szczególną uwagę zwrócono na badania transformowania komórek przez gen reduktazy dihydrofolianowej, dokonywane za pomocą hybrydyzacji komórek somatycznych, przez wprowadzenie chromosomów metafazalnych, czy też fragmentów DNA komórkowego lub określonych sekwencji genowych. Podkreślono znaczenie takich badań dla wyjaśnienia mechanizmów kontrolujących ekspresję genów w ogóle, a w szczególności genu reduktazy dihydrofolianowej — zjawiska niezmiennie istotnego ze względu na rolę tego enzymu w oporności komórek na antyfoliany.

*Summary.* The methods of DNA-mediated gene transfer and cell transformation have been reviewed. The attention was focussed on the transformation of eukaryotic cells by dihydrofolate reductase gene, achieved by means of the hybridization of somatic cells, introduction of isolated metaphase chromosomes and transfer of cellular DNA or even specific genomic sequences into recipient cells. The importance of understanding of the mechanisms controlling expression of the dihydrofolate reductase gene has been underlined, because of its role in cellular resistance towards antifolates.

WSTĘP

Doświadczalne wprowadzenie obcego materiału genetycznego do komórek ssaków datuje się od 1962 r. Udało się wówczas przenieść gen kodujący fosforybozylotransferazę hipoksantynową [45] do komórek niesyntetyzujących tego enzymu. Od tego czasu, zwłaszcza w ostatnich



latach, coraz liczniejsze są doniesienia o efektywnym przeniesieniu innych genów, a w szczególności genów kodujących kinazę tymidynową [3, 47, 50], fosforybozylotransferazę adeninową [48], fosforybozylotransferazę hipoksantynową [7], reduktazę dihydrofolianową [10, 19–21, 41–43, 49, 53], czy też genu odpowiedzialnego za syntezę  $\beta$ -globiny [3, 51]. Autorzy zajmujący się badaniami mechanizmów włączania obcych genów do materiału genetycznego komórek ssaków często nazywają ten proces transformacją\*, analogicznie do transformacji bakteryjnej, i określają go jako zmianę genotypu komórek — biorców pod wpływem wprowadzonego obcego DNA [48]. Transformację taką można często wykryć dzięki pojawieniu się trwałej i dziedzicznej zmiany fenotypu komórek — biorców.

Znamy obecnie wiele technik biologicznych, biochemicznych, a zwłaszcza technik inżynierii genetycznej, za pomocą których można wprowadzać do komórek ssaków obcy materiał genetyczny. Techniki te określa się często literowym symbolem DMGT, który jest skrótem angielskiego terminu: „DNA-mediated gene transfer” [36]. Są to przede wszystkim: hybrydyzacja komórek somatycznych, spontaniczna lub stymulowana (działaniem zinaktywowanego wirusa Sendai albo środków chemicznych [1, 21, 32]); hybrydyzacja komórek somatycznych ze strukturami subjądrowymi typu mini- [8] lub mikrokomórek [9, 11, 35, 39, 50], wprowadzanie do komórek somatycznych chromosomów metafazowych [20, 24, 25, 27, 35, 41] lub określonych fragmentów komórkowego DNA [17, 47, 49], a nawet wyodrębnionych określonych sekwencji genowych [5, 33, 49]. Możliwe jest także wprowadzenie DNA do komórek drogą mikroiniekcji [3, 4], jak również za pomocą liposomów [37]. Otrzymane poliferydujące hybrydy komórkowe oraz „stransformowane” komórki zawierające fragment materiału genetycznego dawców kodujący badany enzym bada się następnie w różnego typu środowiskach hodowlanych, umożliwiającą ekspresję wprowadzonych genów. Z reguły środowiska takie zawierają związek hamujący działanie badanego enzymu oraz końcowe produkty szlaku przemian, w których uczestniczy dany enzym. Często stosuje się środowisko selekcyjne zawierające hipoksantynę, aminopterynę (inhibitor reduktazy dihydrofolianowej) i tymidynę, zwane krótko HAT od inicjałów podstawowych składników [45]. Środowisko to znalazło na przykład zastosowanie do izolowania komórek, do których wprowadzono gen kinazy tymidynowej lub reduktazy dihydrofolianowej. Do badań zaś transformacji przy użyciu genu fosforybozylotransferazy ade-

\* Od Redakcji: termin „transformowania komórek” i „komórki stransformowane” należy stosować do szerszego zakresu zjawisk komórkowych dotyczących wszelkich, doświadczalnych zmian w genomie. Termin „transformowanie” należy także stosować na określenie innych zmian w strukturze genomu, które prowadzą do zmian fenotypu transformowanej komórki.



ninowej stosuje się środowisko zawierające azaserynę (inhibitor biosyntezy puryn de novo) oraz adeninę [48].

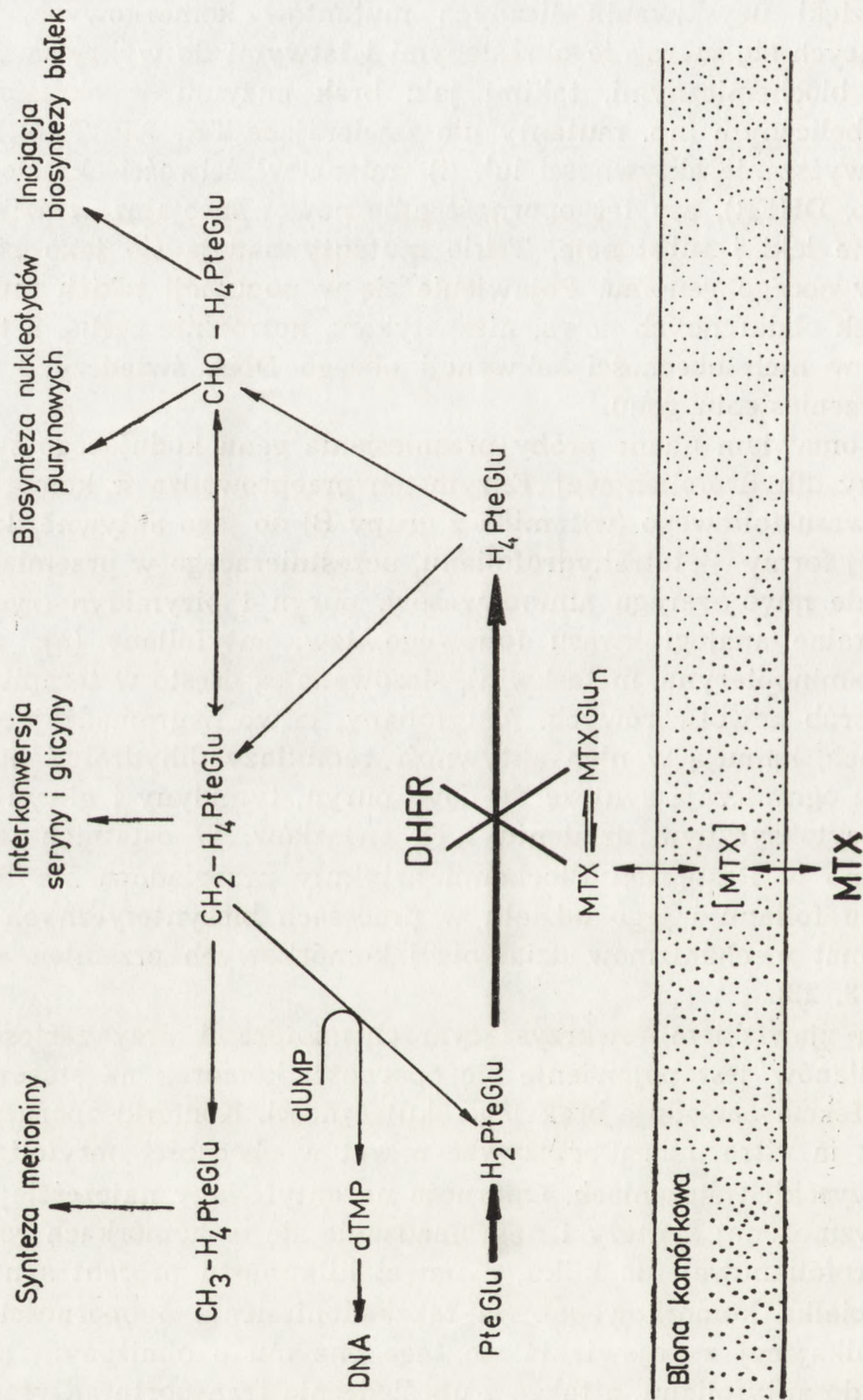
Rozwój badań nad transformacją komórek eukariotycznych stał się możliwy dzięki uzyskiwaniu licznych mutantów komórkowych, charakteryzujących się wyraźnie określonymi i łatwymi do wykrycia właściwościami biochemicznymi, takimi jak: brak enzymu w określonym ciągu metabolicznym (np. mutanty nie zawierające TK, APRT, DHFR), trwałe podwyższenie aktywności lub (i) zmiana właściwości określonego enzymu (np. DHFR), czy też oporność albo nawet specjalna wrażliwość na określone leki i substancje. Takie mutanty nadają się jako biorcy fragmentów obcego genomu. Pojawienie się w populacji takich mutantów komórek obdarzonych nową, niespotykaną normalnie cechą, a także wykazanie w nich obecności sekwencji obcego DNA świadczy o skutecznym przeniesieniu genu.

Poniżej omawiam udane próby przeniesienia genu kodującego syntezę reduktazy dihydrofolianowej. Enzym ten przeprowadza w komórkach redukcję kwasu foliowego (witamina z grupy B) do jego aktywnej koenzymatycznej formy — tetrahydrofolianu, uczestniczącego w przemianach i syntezie de novo szeregu aminokwasów, puryn i pirymidyn (ryc. 1).

Strukturalne analogi kwasu foliowego, tzw. antyfoliany (np. ameptopteryna, aminopteryna, metaskwin), stosowane są często w terapii niektórych chorób nowotworowych. Antyfoliany, łatwo nagromadzające się w komórkach, hamują w nich aktywność reduktazy dihydrofolianowej, a w efekcie ograniczają syntezę de novo puryn, tymidyny i glicyny, co stanowi o cytoksycznym działaniu tych związków. W ostatnich latach opublikowano w *Postęпах Biochemii* artykuły przeglądowe na temat metabolizmu folianu i jego udziału w procesach biosyntetycznych [12] oraz na temat mechanizmów działania i komórkowych przemian antyfolianów [13, 23].

Częstym zjawiskiem towarzyszącym chemioterapii przy zastosowaniu antyfolianów jest pojawienie się oporności komórek na stosowany lek, co w efekcie powoduje brak jego skuteczności. Komórki odporne, tak *in vivo* jak *in vitro*, mogą przeżywać nawet w obecności antyfolianów w bardzo wysokich stężeniach. Oporność na antyfoliany najczęściej jest skutkiem wzmożonej syntezy i nagromadzenia się w komórkach reduktazy dihydrofolianowej (do kilku, a nawet kilkunastu procent syntetyzowanego białka komórkowego). Są także doniesienia o oporności komórek wynikającej z pojawienia się tego enzymu o obniżonym powinowactwie do antyfolianu, a także z upośledzenia transportu antyfolianu do komórek [14, 15]. W ostatnich latach wykazano przy zastosowaniu wielu metod, że zwiększenie ilości DHFR w komórkach opornych wynika ze zwielokrotnienia w nich genu odpowiedzialnego za syntezę tego





Ryc. 1. Ogólny schemat przemian folianu oraz udziału pochodnych folianowych w metabolizmie komórkowym. Przekreślona strzałka oznacza zahamowanie enzymu przez ametoptyrynę



białka [38]. Zwielokrotnienie genu *dhfr* pociąga za sobą zwiększenie w komórce ilości właściwego mRNA [2, 38]. Wyizolowanie z mysich komórek AT-3000 [5] oraz komórek chomiczych [19] mRNA reduktazy dihydrofolianowej pozwoliło na zsyntetyzowanie DNA komplementarnego (cDNA) wobec tego mRNA. Wyizolowane cDNA stosuje się z powodzeniem w badaniach mechanizmu zwielokrotnienia genu *dhfr*, a przede wszystkim w identyfikacji jego pozycji w materiale genetycznym. Od tego bowiem, czy zwielokrotniony gen został zintegrowany z materiałem genetycznym komórek i może być przekazywany do komórek potomnych, czy też znajduje się w elementach pozachromosomowych (double minutes chromosomes) zależy w znacznym stopniu trwałość oporności komórek na czynnik selekcyjny [14]. Komplementarny wobec mRNA reduktazy dihydrofolianowej cDNA jest także ostatnio stosowany jako gen *dhfr* w doświadczalnym transformowaniu komórek. Znaczenie reduktazy dihydrofolianowej w metabolizmie komórkowym sprawia, że wszelkie badania genu *dhfr*, a zwłaszcza badania jego struktury [29] i wyjaśnienia mechanizmów kontrolujących jego ekspresję w różnych układach biologicznych, mają szczególne znaczenie zarówno z teoretycznego, jak i klinicznego punktu widzenia.

#### TRANSFORMOWANIE KOMÓREK PRZY ZASTOSOWANIU HYBRYDYZACJI KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Przy zastosowaniu tej techniki próbowano odpowiedzieć na pytanie niezmiernie istotne dla zrozumienia zjawiska oporności komórek na antyfoliany, a mianowicie czy cecha oporności komórek na antyfoliany dziedziczy się jako cecha dominująca czy recesywna [10]. Dominację czy też recesywność genu *dhfr* badano hybrydując komórki dobrze scharakteryzowanych pod względem biochemicznym różnych mutantów komórek jajnikowych chomika chińskiego, CHO [10]. Oporność zastosowanych mutantów na ametoptynę wynikała (tabela 1) bądź to z obecności w nich reduktazy dihydrofolianowej o zmniejszonym powinowactwie do antyfolianu (mutanty  $MTX^{RI}$ ), bądź to ze zwiększonego poziomu zmienionej reduktazy (mutanty  $R^{II}$ ), bądź też z obniżonej zdolności transportu antyfolianu do komórek (mutanty  $MTX^{RII}$ ). Mutanty te różniły się także od linii wyjściowej zapotrzebowaniem na prolinę, wrażliwością na temperaturę i na obecność strofantyny G. Cechy te okazały się bardzo przydatne przy selekcji otrzymanych hybrydów. Hybrydy komórek opornych mutantów poszczególnych klas z wrażliwymi na ametoptynę komórkami CHO izolowano w odpowiednich środowiskach selekcyjnych, a następnie badano ich wrażliwość na antyfolian, wyznaczając krzywe wzrostowe w obecności różnych dawek ametoptyny (ryc. 2



TABELA 1

Charakterystyka mutantów komórek CHO (z danych [10])

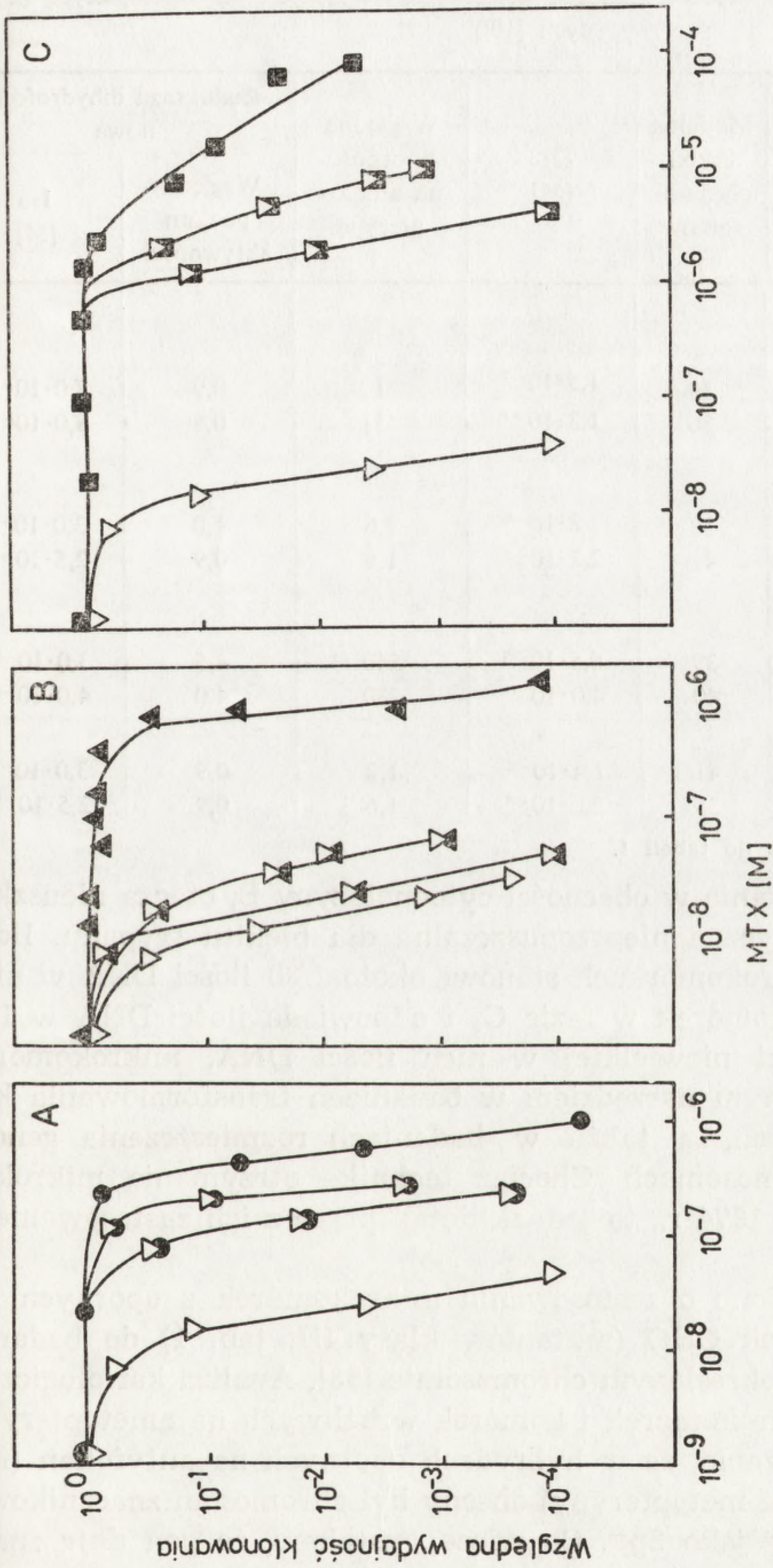
Komórki	Modalna liczba chromosomów	$D_{10}$ [M]	Względna oporność na ametoptynę	Reduktaza dihydrofoliowa	
				względny poziom aktywności	$I_{50}$ [M]
Wrażliwe na ametoptynę					
Pro-3	21	$1,2 \cdot 10^{-8}$	1,0	1,0	$3 \cdot 10^{-9}$
Pro-4 Oua <sup>R</sup> 2-4	21	$2 \cdot 10^{-8}$	1,6	1,0	$3 \cdot 10^{-9}$
Oporne na ametoptynę					
Mutanty klasy I					
Pro-3MTX <sup>RI</sup> 3-3	21	$2,1 \cdot 10^{-7}$	17,5	1,0	$3 \cdot 10^{-8}$
Pro-4MTX <sup>RI</sup> Oua <sup>R</sup> 6-3	21	$2 \cdot 10^{-7}$	16,6	1,0	$3 \cdot 10^{-8}$
Mutanty klasy II					
Pro-3MTX <sup>RII</sup> 5-3	20	$6,6 \cdot 10^{-7}$	55	0,9	$2,5 \cdot 10^{-9}$
Pro-4MTX <sup>RII</sup> Oua 2-4	20	$6 \cdot 10^{-7}$	50	1,0	$2 \cdot 10^{-9}$
Mutanty klasy III					
Pro-3MTX <sup>RIII</sup> 1-2	21	$6,5 \cdot 10^{-6}$	540	11,0	$3 \cdot 10^{-8}$
Pro-4MTX <sup>RIII</sup> Oua 1-6	21	$6 \cdot 10^{-6}$	500	12,0	$2 \cdot 10^{-8}$

$D_{10}$  oznacza stężenie ametoptyny zmniejszające przeżycie komórek do 10%,  $I_{50}$  zaś stężenie ametoptyny, które hamuje aktywność DHFR w 50%.

ABC) oraz oznaczając poziom aktywności i właściwości DHFR. W tabeli 1 podano charakterystykę komórek użytych do hybrydyzacji, a w tabeli 2 — charakterystykę niektórych z uzyskanych hybrydów. Na podstawie analizy danych zebranych w tab. 2 i na ryc. 2 można było ustalić, że we wszystkich hybrydach komórek wrażliwych i mutantów CHO klasy I i III, cechy odpowiedzialne za wystąpienie oporności na antyfolian były cechami dominującymi. Natomiast hybrydy komórek wrażliwych i mutantów klasy II, cechujących się upośredzonym transportem antyfolianu, przypominały swoimi właściwościami komórki wrażliwe, a więc cechy oporności mutantów klasy II były cechami recesywnymi. Te ustalenia stanowiły niezbędną podstawę do dalszego stosowania tych mutantów w eksperymentalnym transformowaniu komórek za pomocą chromosomów [43].

Pewną odmianą, a właściwie rozwinięciem techniki hybrydyzacji komórek, jest ich hybrydyzacja ze strukturami subjądrowymi, zawierającymi niewielki fragment genomu. Takimi strukturami są tzw. „mini-segregants” [39], powstające podczas przetrzymywania dzielących się komórek w niskiej temperaturze, oraz tzw. mikrokomórki uzyskiwane z komórek prawidłowych po wywołaniu w nich mikronukleacji jądra działaniem kolchicyny [9]. Utworzone mikrojądra, „wyciągnięte” z ko-





- ▽ - komórki wrażliwe na działanie ametoptyryny ; ● - komórki mutantów klasy I
- ▲ - komórki mutantów klasy II ; ■ - komórki mutantów klasy III
- ◻, ◻● - hybrydy z mutantami klasy I ; ◻, ◻■ - hybrydy z mutantami klasy II
- ◻, ◻▲ - hybrydy z mutantami klasy III

Ryc. 2. Krzywe wzrostowe hybrydów uzyskanych w wyniku fuzji chemicznych komórek CHO wrażliwych na działanie ametoptyryny z komórkami mutantów opornych na działanie tego antyfolianu i należącymi do różnych klas (według [10])



TABELA 2

Charakterystyka typowych hybrydów komórek wrażliwych i opornych na ametoptyerynę (z danych [10])

Komórki	Modalna liczba chromosomów	$D_{10}$ [M]	Względna oporność na ametoptyerynę	Reduktaza dihydrofolianowa	
				Względny poziom aktywności	$I_{50}$ [M]
Wrażliwe x mutant klasy I					
Hyb $R^I-1$	39	$1,5 \cdot 10^{-7}$	12	0,9	$7,0 \cdot 10^{-9}$
Hyb $R^I-3$	36	$1,3 \cdot 10^{-7}$	11	0,8	$8,0 \cdot 10^{-9}$
Wrażliwe x mutant klasy II					
Hyb $R^{II}-1$	38	$2 \cdot 10^{-8}$	1,6	1,0	$3,0 \cdot 10^{-9}$
Hyb $R^{II}-3$	41	$2,2 \cdot 10^{-8}$	1,8	0,9	$2,5 \cdot 10^{-9}$
Wrażliwe x mutant klasy III					
Hyb $R^{III}-1$	39	$6,5 \cdot 10^{-6}$	540	4,5	$3,0 \cdot 10^{-8}$
Hyb $R^{III}-4$	40	$4,0 \cdot 10^{-6}$	330	4,0	$4,0 \cdot 10^{-8}$
Wrażliwe x wrażliwe					
Hyb-1	41	$1,4 \cdot 10^{-8}$	1,2	0,9	$3,0 \cdot 10^{-9}$
Hyb-3	38	$2,0 \cdot 10^{-8}$	1,6	0,9	$2,5 \cdot 10^{-9}$

Oznaczenia jak w opisie do tabeli 1.

mórek podczas wirowania w obecności cytocholazyny B, otacza nieuszkodzona błona plazmatyczna nieprzepuszczalna dla błękitu trypanu. Ilość DNA zawarta w mikrokomórkach stanowi około 1/30 ilości DNA w nie-naruszonym jądrze komórek w fazie  $G_1$  i odpowiada ilości DNA w 1-2 chromosomów. Dzięki niewielkiej w nich ilości DNA, mikrokomórki mogą stać się dogodnym narzędziem w badaniach transformowania komórek eukariotycznych, a także w badaniach rozmieszczenia genów w określonych chromosomach. Chociaż technikę otrzymania mikrokomórek opisano już w 1974 r., to jednak dotąd prace z ich zastosowaniem są nieliczne.

W 1981 r. doniesiono o zastosowaniu mikrokomórek z opornych na ametoptyerynę komórek CHO (mutantów klasy III, tab. 1) do badania pozycji genu *dhfr* w określonym chromosomie [53]. Analiza kariologiczna hybrydów takich mikrokomórek i komórek wrażliwych na ametoptyerynę pozwoliła na stwierdzenie, że w hybrydach opornych na antyfolian (rosły w obecności  $10^{-6}$ M metoptyeryny) obecny był chromosom znacznikowy z mutanta, oznaczony jako  $2p^-$ . Co więcej, ustalono, że gen *dhfr* znajduje się na krótszym ramieniu chromosomu  $2p^-$ . Wykazano także, że właściwości reduktazy dihydrofolianowej hybrydów są niemal identyczne



z właściwościami tego enzymu w mutantach użytych do otrzymania mikrokomórek. W eksperymencie tym wykazano zarazem, że wraz z genem kodującym DHFR zostały również przeniesione geny kodujące wrażliwość komórek CHO na emetynę i chrom. Możliwe stało się zatem jednoczesne eksperymentalne przeniesienie trzech selekcjonujących się markerów, znajdujących się na jednym chromosomie. Taki zestaw markerów może być bardzo użyteczny w badaniach mechanizmów mutacji i segregacji.

#### TRANSFORMOWANIE KOMÓREK PRZY UŻYCIU CHROMOSOMÓW METAFAZOWYCH (CMGT)

Użycie chromosomów metafazowych do przenoszenia genów jest stosowane od szeregu lat pomimo niewielkiej (rzędu  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ ) na ogół częstotliwości transformacji. Jednakże łatwość wykonania, możliwość przeprowadzenia transformowania niezależnie od przynależności gatunkowej dawcy lub biorcy chromosomów, od rodzaju przenoszonego genu, zastosowanego systemu selekcyjnego czy metody użytej do izolowania chromosomów decyduje o jej szerokim zastosowaniu. Szczegółowy opis techniki transformowania komórek za pomocą chromosomów metafazowych, jak również metody otrzymywania chromosomów metafazowych oraz metody analizy otrzymanych transformantów podane są w licznych artykułach przeglądowych [24, 25, 35]. Obecnie przedstawię zatem tylko najogólniejsze zasady metody. Komórki eukariotyczne zdolne są do fagocytowania dodanych do środowiska chromosomów metafazowych z przeciętną szybkością 1 chromosom/komórkę/godzinę. Przeważająca część DNA sfagocytowanych chromosomów ulega degradacji pod działaniem enzymów lizosomowych do małych, funkcjonalnie nieaktywnych fragmentów. Pozostałe biologicznie aktywne fragmenty (tzw. transgenom) są niewielkie, na ogół nie zawierają centromerów, a wielkość ich stanowi ułamek procentu wielkości genomu dawcy. Po upływie określonego czasu wzrostu komórek w środowisku selekcyjnym pojawiają się kolonie komórek przejawiające nowe cechy, będące wynikiem ekspresji genów przeniesionych przez chromosomy. Początkowo komórki takie charakteryzują się niestabilnym fenotypem, po pewnym dopiero czasie następuje jego utrwalenie. Stabilizacja transgenomu następuje dzięki jego integracji z chromosomowym DNA biorców. W przypadku transformowania mysich komórek przy użyciu genu kinazy tymidynowej chromosomów komórek ludzkich [16] wykazano, że w komórkach stransformowanych o niestabilnym fenotypie, przeniesiony fragment chromosomowy może występować w postaci dużego makrotransgenomu lub też w postaci niewyróżnialnego metodami cytologicznymi mikrotransgenomu;



obydwa jednak znikają z komórek z określoną (różną dla każdego typu transgenomu) szybkością. Co więcej, komórki te różnią się także poziomem aktywności transkrypcyjnej przeniesionego genu. Obecność obcego DNA wprowadzonego do komórek wykrywa się za pomocą metod hybrydyzacji kwasów nukleinowych (np. metodą Southerna, [40]); świadczy o niej także pojawianie się w komórkach produktów kodowanych przez przeniesiony gen.

Przy użyciu techniki CMGT badano przede wszystkim możliwość uzyskania komórek opornych na antyfoliany w efekcie wprowadzenia do nich genu kodującego reduktazę dihydrofolianową [20, 42] oraz rozmieszczenie różnych genów szlaku przemian pochodnych folianowych w określonych chromosomach [41]. Przebadano szereg czynników mogących mieć wpływ na częstotliwość transformacji komórek [20]. Przede wszystkim wykazano, że chociaż przy użyciu chemicznego genu *dhfr* [42] następowało transformowanie komórek chemicznych, to jednak znacznie lepszymi biorcami chromosomów chemicznych okazały się mysie komórki L (20). Dlatego w dalszych badaniach jako biorców używano mutanty komórek L nie zawierające kinazy tymidynowej i wrażliwe na działanie ametoptyryny. Umożliwiło to jednoczesne badanie przenoszenia genu *dhfr* i genu kinazy tymidynowej. Następnie stwierdzono zależność wydajności transformowania od czasu inkubacji komórek z chromosomami, jak również od zwiększenia ilości dodawanych chromosomów. Stwierdzono również pozytywny wpływ pulsowego (30 min) działania DMSO na częstość pojawiania się kolonii stransformowanych komórek. Porównywanie wydajności transformowania komórek w różnych doświadczeniach i przez różnych autorów jest trudne i niedokładne, niemniej Lewis i wsp. [20] sądzą, że zastosowanie chromosomów chemicznych jako dawców *dhfr* i mysich komórek jako biorców zwiększa przeciętnie 5–20-krotnie częstość transformacji.

Przy transformowaniu komórek L przez wprowadzenie do nich chemicznego genu reduktazy dihydrofolianowej wraz z chromosomami metafazowymi, otrzymano komórki stransformowane o stabilnym i niestabilnym fenotypie. Komórki stransformowane trwale zachowywały oporność na ten antyfolian nawet po 48 dniach wzrostu w nieobecności ametoptyryny w środowisku. Charakteryzowały się one wysokim poziomem DHFR o wrażliwości na antyfolian porównywalnej z wrażliwością tego enzymu z komórek chemicznych, z których pochodziły chromosomy. W niektórych komórkach, które szybko traciły oporność na ametoptyrynę, znajdowano podwyższony poziom DHFR, lecz o obniżonym powinowactwie do tego antyfolianu [20]. Przytoczone badania wykazały zatem, że jest możliwe stransformowanie komórek ssaków przez *gen dhfr*



obecny w chromosomach metafazowych i co więcej, że możliwa jest w komórkach mysich ekspresja obcego gatunkowo genu.

W 1977 r. ukazała się praca donosząca o jednoczesnym przeniesieniu za pomocą chromosomów metafazowych genu *dhfr* i genów dwóch innych enzymów funkcjonujących w szlaku przemian folianu, tj. enzymu odpowiedzialnego za tworzenie poliglutaminianowych pochodnych folianowych oraz enzymu związanego z syntezą glicyny [41]. W badaniach tych posługiwano się mutantami chemicznych komórek CHO charakteryzującymi się opornością na ametoptynę dzięki podwyższeniu w nich aktywności DHFR o obniżonym powinowactwie do tego antyfolianu (mutanty klasy III, tab. 1) oraz mutantami komórek CHO z zaburzeniami syntezy poliglutaminianów oraz syntezy glicyny [26]. Wysznięto wówczas przypuszczenie, że geny trzech enzymów w szlaku przemian folianu mogą znajdować się w jednym chromosomie. Mogłoby to sugerować, że ich ekspresja, podobnie jak w bakteriach, mogłaby pozostawać pod wspólną kontrolą. Jednakże, ze względu na niemożność powtórzenia tych eksperymentów, jeden ze współautorów, Siminovitch [20], wyrażał w 1980 r. wątpliwość czy technologia stosowana wówczas rzeczywiście gwarantowała skuteczne przeniesienie genów.

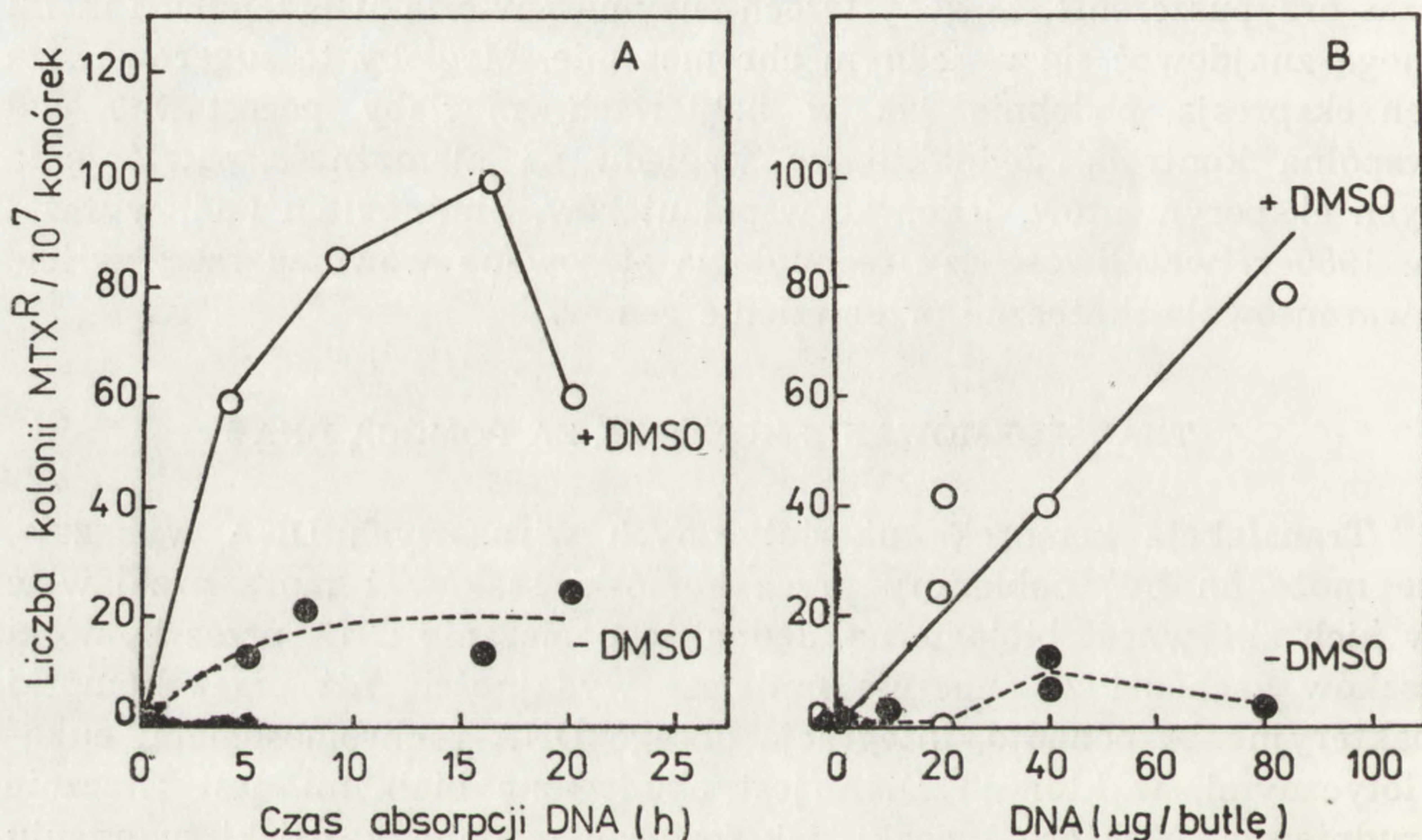
#### TRANSFORMOWANIE KOMÓREK ZA POMOCĄ DNA

Transfekcja komórek eukariotycznych wirusowych DNA wykazała, że może on być pobierany przez komórki ssaków i może przejawiać w nich aktywność biologiczną. Jednakże pobieranie DNA przez komórki ssaków zachodzi ze znacznie mniejszą wydajnością niż przez komórki bakteryjne. A ponadto, integracja obcego DNA z chromosomami eukariotycznymi, w których DNA jest obudowane białkami, jest znacznie trudniejsza. Niektóre związki, jak fosforan wapniowy, dzięki tworzeniu kompleksów z DNA powodują jego precypitację, przez co ułatwiają w znacznym stopniu pobieranie go przez komórki, prawdopodobnie na drodze endocytozy [17]. Co więcej, DNA w kompleksie z fosforanem wapnia jest niepodatny na działanie enzymów nukleolitycznych obecnych w surowicy [22]. Ostatnio doniesiono, że komórki poddane działaniu krótkotrwałych bodźców elektrycznych pobierają DNA z większą wydajnością [52]. DNA pobrany przez komórki musi być przeniesiony z cytoplazmy do jądra poprzez otoczkę jądrową i zintegrowany z materiałem genetycznym komórek. Zaledwie jednak w 1–5% jąder wykryto kompleks DNA—fosforan [22]. Transport DNA z cytoplazmy do jądra wydaje się zatem być jednym z ważniejszych czynników ograniczających przenoszenie genów. Ponadto olbrzymia większość pobranego przez



komórki obcego DNA ulega w nich degradacji przez nukleazy, a tylko niektóre fragmenty DNA mogą ulegać integracji z chromosomami [34].

Jeszcze niedawno wyrażano wątpliwość co do możliwości transformowania komórek przez wprowadzony DNA i sposobu jej detekcji [17]. Jednak już w 1978 r. doniesiono o stransformowaniu mysich komórek L, ze szczepu cechującego się brakiem aktywnej kinazy tymidynowej, za pomocą wirusowego DNA zawierającego gen tego enzymu [47, 50]. Zalety systemu, w którym DNA może stanowić źródło czynnika transformującego są niewątpliwe. Przede wszystkim DNA można otrzymać z komórek interfazowych, można go także frakcjonować na fragmenty przy użyciu enzymów restrykcyjnych. W przyszłości może to pozwolić



Ryc. 3. Wpływ czasu absorpcji (A), ilości zużytego DNA (B) oraz obecności DMSO (A, B) na efektywność przeniesienia genu *dhfr* obecnego w DNA z komórek CHO—MTX<sup>R</sup> mierzony ilością komórek opornych na ametoptynę (według [20])

na precyzyjne umiejscawianie różnych genów w poszczególnych chromosomach. I to tłumaczy dlaczego, mimo mniejszej częstości występowania transformacji pod wpływem wyizolowanego DNA niż przy użyciu chromosomów metafazowych, badania te są ciągle rozwijane.

Transformowanie mysich komórek przez wprowadzenie genu *dhfr* zawartego w DNA z chomiczych komórek CHO opornych na ametoptynę (tab. 1, klasa III) badano równolegle z transformowaniem przez gen *dhfr* obecny w chomiczych chromosomach metafazowych [20]. Podobnie jak w przypadku transformacji wywołanej przy użyciu chromo-



somów metafazowych, także i przy zastosowaniu DNA, jako czynnika wprowadzającego gen *dhfr*, stwierdzono bardzo wyraźną zależność częstości transformacji od czasu kontaktu komórek z DNA, ilości podawanego DNA, obecności DMSO oraz czasu ekspresji wprowadzonego genu (ryc. 3). Ilość kolonii komórek stransformowanych (charakteryzujących się nową cechą oporności na ametoptynę) dzięki wprowadzeniu w nie zwielokrotnionego genu kodującego syntezę DHFR o obniżonym powinowactwie do ametoptyny była 20–30 razy mniejsza niż w przypadku zastosowania do tego celu chromosomów metafazowych. Otrzymane transformanty były niestabilne, prawdopodobnie ze względu na trudności integracji obcego DNA z materiałem genetycznym komórek — biorców.

Bardziej efektywne transformowanie komórek niż pod wpływem fragmentów DNA uzyskuje się przy zastosowaniu fragmentów DNA przyłączonych do wektorów różnego typu, tzn. niewielkich cząsteczek DNA zdolnych do autonomicznej replikacji. Wektorami mogą być plazmidy oraz wirusowe czy też drożdżowe DNA odpowiednio przekonstruowane przez działanie właściwych enzymów restrykcyjnych. Za pomocą wektorów geny obecne w fragmencie DNA zostają wprowadzone do komórek, w których ulegają powieleniu i ewentualnie ekspresji. Obecnie jest możliwe transformowanie w ten sposób nie tylko bakterii, lecz także komórek eukariotycznych.

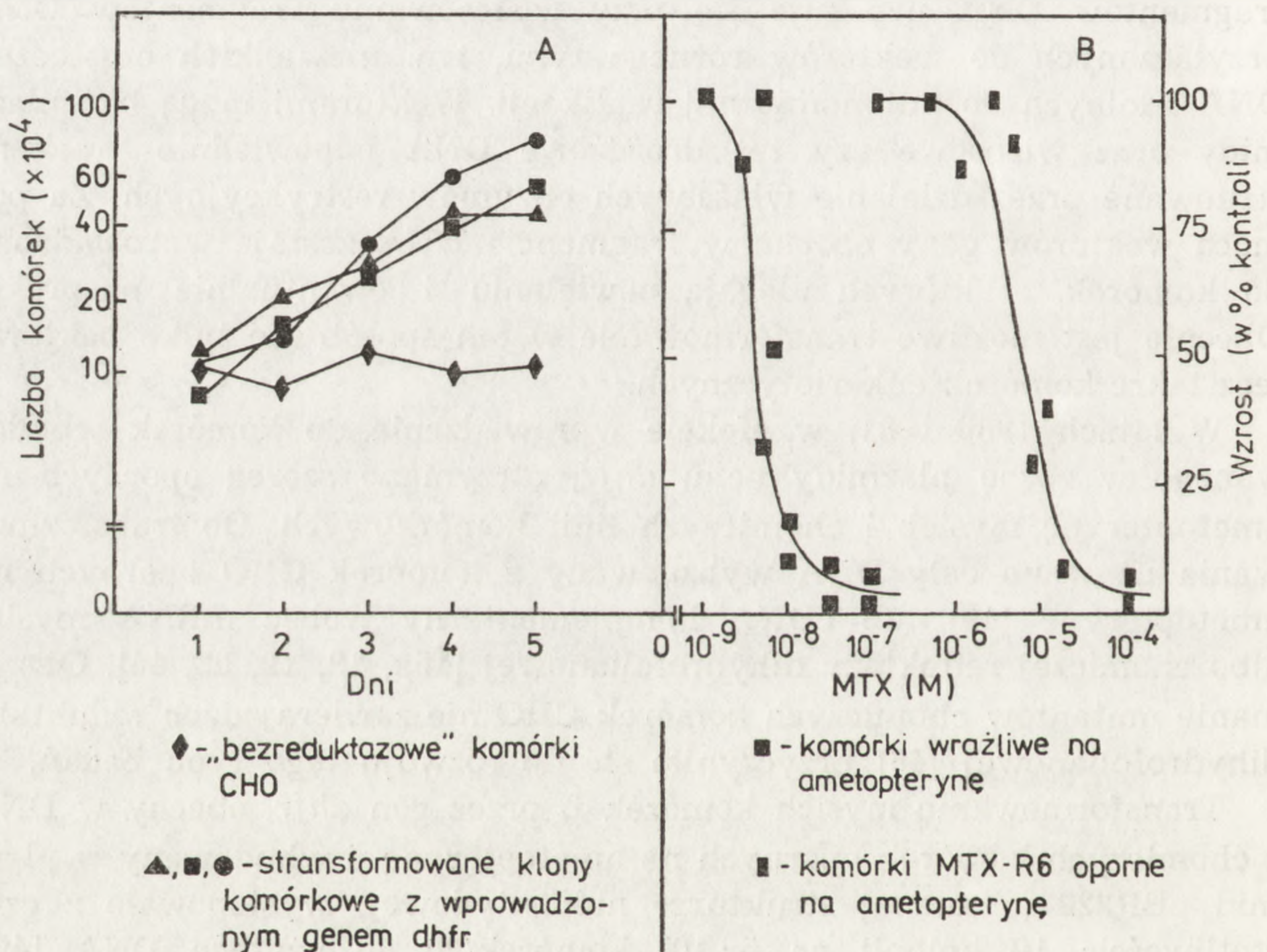
W latach 1980–1981, w efekcie wprowadzenia do komórek wbudowanego w różne plazmidy genu *dhfr*, otrzymano szereg opornych na ametoptynę mysich i chomiczych linii komórkowych. Do transformowania używano całego DNA wyizolowanego z komórek CHO opornych na ametoptynę [49] lub cDNA komplementarny wobec mRNA mysiej albo chomiczej reduktazy dihydrofolianowej [15a, 18, 19, 33, 44]. Otrzymanie mutantów chomiczych komórek CHO nie zawierających reduktazy dihydrofolianowej [46] przyczyniło się do rozwoju tego typu badań.

Transformowanie mysich komórek L przez gen *dhfr*, obecny w DNA z chomiczych komórek opornych na ametoptynę, i wbudowany w plazmid pBR322 (o znanej strukturze nukleotydowej) występowało z częstością 10 kolonii na  $5 \cdot 10^5$  komórek/20  $\mu\text{g}$  użytego DNA [49]. Otrzymane komórki cechowała obecność genu chomiczego oprócz endogenego mysiego genu *dhfr*. Co więcej, podczas adaptowania takich stransformowanych komórek do wzrostu w obecności ametoptyny w coraz to wyższych jej stężeniach zwielokrotnieniu ulegał jedynie wprowadzony gen chomiczy. W komórkach stransformowanych stwierdzono także zwiększenie ilości wprowadzonych sekwencji plazmidowych. Niezależnie od tego, jaki jest mechanizm odpowiedzialny za zwielokrotnienie genu *dhfr*, jest oczywiste, że powielany odcinek jest większy niż sam gen *dhfr*. A to zdaniem Wiglera i wsp. [49] pozwala myśleć o możliwości



wprowadzenia do komórek za pomocą genu *dhfr* także i innych genów.

Gdy transformowanie „bezreduktazowych” mutantów komórek chomiczych przeprowadzono przy użyciu cDNA mysiej reduktazy, połączonego z plazmidem z sekwencjami bądź to wirusa SV40 [44], bądź też wirusa MMTV (18), stransformowane komórki cechowała ilość reduktazy dihydrofolianowej wystarczająca do skompensowania defektu wyjściowych mutantów. Co więcej, w komórkach stransformowanych przy użyciu cDNA obecnego w plazmidzie z DNA wirusa SV40, syntezę DHFR można było modulować działaniem hormonów glikokortykoidowych [18], co wskazuje na obecność we wprowadzonym fragmencie DNA (z wirusa SV40) regionu wrażliwego na działanie hormonów.



Ryc. 4. A. Transformowanie chomiczych, „bezreduktazowych” komórek CHO przez gen *dhfr* dołączony do plazmidu pMDSG (według [33]). Środowisko hodowlane bez glicyny i tymidyny; B. Wrażliwość na ametoptynę transformowanych komórek chomiczych klonu wyjściowego i wyprowadzonych komórek linii MTX.R6, opornych na ametoptynę (według [33])

W 1981 r. doniesiono o udanym stransformowaniu „bezreduktazowych” komórek chomiczych przy zastosowaniu plazmidu pMDSG, który zawierał jednocześnie sekwencje cDNA wobec mRNA mysiej reduktazy dihydrofolianowej oraz bakteryjny gen *xgp<sup>r</sup>t*, kodujący syntezę fosfory-



bozylotransferazy hipoksantynowej [33]. Stransformowane komórki były zdolne do wzrostu zarówno w środowisku nie zawierającym glicyny i tymidyny (ryc. 4A), jak również w środowisku z dodatkiem ksantyny i kwasu mykofenolowego. Świadczy to o zachodzącej w nich syntezie obu badanych enzymów. Otrzymane komórki stransformowane były niemal 100-krotnie bardziej wrażliwe na ametoptynę, wnioskowano więc, że ilość wprowadzonego genu *dhfr* była znacznie mniejsza niż w komórkach chemicznych szczepu dzikiego. Jeden z otrzymanych stransformowanych szczepów (pMDSG) udało się jednak zaadaptować do wzrostu w obecności ametoptyny w wyższych stężeniach. Wytworzona oporność utrzymywała się w nieobecności antyfolianu w środowisku. Uzyskane komórki odporne — MTXR6 (ryc. 4B) charakteryzowały się kilkusetkrotnym zwiększeniem ilości białka reduktazy dihydrofolianowej i odpowiedniego mRNA, przy około 50-krotnym zwielokrotnieniu ilości kopii genu *dhfr* (tab. 3). Stwierdzono zwielokrotnienie wprowadzonego fragmentu kodującego (cDNA), co pozwoliło autorom dyskutować rolę innych elementów genu *dhfr* (e.g. intervening sequences) w procesie amplifikacji.

TABELA 3

Względne zawartości białka enzymatycznego DHFR i XGPRT oraz odpowiednio RNA i DNA w komórkach MTX.R6 opornych na ametoptynę (według [33])

Enzym	Białko	RNA	DNA
DHFR	300–500	250–500	40–60
XGPRT	nie oznaczono	40–70	40–60

Za 1 przyjęto odpowiednie wartości w komórkach PMDSG, 9, wrażliwych na działanie ametoptyny.

W komórkach stransformowanych, w których wytworzono oporność na ametoptynę (MTX.R6), stwierdzano także kilkudziesięciokrotne zwiększenie ilości DNA i RNA odpowiedzialnych za syntezę bakteryjnej XGPRT (tab. 3).

Komórki eukariotyczne mogą także ulegać transformacji pod działaniem DNA pochodzenia bakteryjnego. Tak na przykład, udało się stransformować mysie komórki L za pomocą plazmidu pKC1 zawierającego DNA z bakteryjnego czynnika R, który warunkuje oporność bakterii na antyfolian — trimetoprim (30). W stransformowanych komórkach L, które stały się odporne na działanie ametoptyny, następowała synteza dwóch prokariotycznych reduktaz dihydrofolianowych odznaczających się osłabionym powinowactwem do ametoptyny lub wręcz niewrażliwością na działanie tego antyfolianu [31].



## PODSUMOWANIE

Przedstawiono badania, z których wynika, że wprowadzając obce DNA można efektywnie transformować *in vitro* komórki eukariotyczne. Wskazuje to na brak ograniczeń w komórkach eukariotycznych w ekspresji obcych gatunkowo genów, a nawet genów prokariotycznych. Wykazano ponadto możliwość jednoczesnego przenoszenia kilku genów, a także ich umiejscowienie w określonym chromosomie. W przypadku reduktazy dihydrofolianowej uzyskano także dalsze informacje na temat mechanizmu amplifikacji genu *dhfr* i regulacji w komórkach jego ekspresji.

Nasuwa się pytanie, czy możliwe jest transformowanie komórek w warunkach *in vivo*. Dotychczas ukazały się tylko dwa doniesienia mówiące o funkcjonowaniu *in vivo* komórek szpiku kostnego myszy uprzednio transformowanych w warunkach *in vitro* przez wirusowy gen kinazy tymidynowej [27], a także gen mysiej reduktazy dihydrofolianowej [6]. W szpiku kostnym biorców zachodziła intensywne proliferacja transformowanych komórek, a w śledzienie następowało podwyższenie poziomu aktywności reduktazy dihydrofolianowej i w konsekwencji tolerowanie przez myszy wyższych dawek ametoptyryny [6]. Chociaż nie wykazano dotąd w genomie proliferujących komórek szpiku obecności wprowadzonego genu *dhfr*, prawdopodobnie ze względu na jego podobieństwo strukturalne z genem natywnym, jednak zwiększona synteza DHFR przemawia wyraźnie za udaną transformacją. Transformowanie komórek *in vivo* może mieć olbrzymie znaczenie kliniczne. Tak na przykład wprowadzenie do komórek określonych narządów genu kodującego zwiększoną syntezę enzymu będącego głównym celem ataku antymetabolitu, może umożliwić tolerowanie przez organizm wyższych dawek tego związku, przy zachowaniu dużej wrażliwości komórek nowotworu, zwiększając tym samym skuteczność chemioterapii. Dzięki wprowadzeniu nowych genów można też myśleć o możliwości korygowania określonych wad metabolicznych.

## LITERATURA

- [1] AHKONG Q. F., FISHER D., TAMPION W., LUCY J. A., Mechanisms of cell fusion, *Nature*, **253**: 194–195, 1975.
- [2] ALT F. W., KELLEMS R. E., BERTINO J. R., SCHIMKE R. T., Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells, *J. Biol. Chem.*, **253**: 1357–1370, 1978.
- [3] ANDERSON W. F., KILLOS L., SANDERS-HAIGH L., KRETSCHMER P. J.,



- DIACUMAKOS E. G., Replication and expression of thymidine kinase and human globin genes microinjected into mouse fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 5399–5403, 1980.
- [4] CAPECCHI M. R., High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells, *Cell*, **22**: 479–488, 1980.
- [5] CHANG A. C. Y., NUNBERG J. H., KAUFMAN R. J., EHRLICH H. A., SCHIMKE R. T., COHEN S. N., Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase, *Nature*, **275**: 617–624, 1978.
- [6] CLINE M. J., STANG H., MERCOLA H., MORSE L., RUPRECHT R., BROWNE J., SALSER W., Gene transfer in intact animals, *Nature*, **284**: 422–425, 1980.
- [7] DEGNEN G. E., MILLER J. L., ADELBERG E. A., EISENSTADT J. M., HPRTase expression in mouse gene transferents, [w:] *Brookhaven Symposia in Biology, Genetic interaction and gene transfer*, red. C. W. Anderson, Upton, **29**: 135–146, 1978.
- [8] EDGE T., HAMBERG H., KRONDAKL U., ERICSSON J., GINGERTZ N. R., Characterization of minicells (nuclei) obtained by cytochalasin enucleation, *Exptl. Cell Res.*, **87**: 365–377, 1974.
- [9] EDGE T., RINGERTZ N. R., Preparation of microcells by enucleation of micronucleate cells, *Exptl., Cell Res.*, **87**: 378–382, 1974.
- [10] FLINTOFF W. F., SPINDLER S. M., SIMINOVITCH L., Genetic characterization of methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells, *In vitro*, **12**: 749–757, 1976.
- [11] FOURNIER R. E. K., RUDDLE F. H., Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster and human somatic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 319–323, 1977.
- [12] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., Transport i metabolizm folianu w komórkach zwierząt i drobnoustrojów, *Post. Biochem.*, **22**: 345–385, 1976.
- [13] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., Metabolizm aminoanalogów folianu, *Post. Biochem.*, **23**: 559–579, 1977.
- [14] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., Molecular mechanisms of cellular resistance to folate analogs, [w:] *Proc. XIII Intern. Cancer Congress, Seattle*, w druku.
- [15] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B., Mechanizmy oporności komórek na antyfoliany, *Post. Biochem.*, **29** (2), 1983, w druku.
- [15a] KAUFMAN R. J., SHARP P. A., Amplification and expression of sequences cotransferred with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene, *J. Mol. Biol.*, **159**: 601–621, 1982.
- [16] KLOBUTCHER L. A., MILLER C. L., RUDDLE F. H., Chromosome-mediated gene transfer results in two classes of unstable transformants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3610–3614, 1980.
- [17] LOCKS S. A., Mechanisms of DNA uptake by cells [w:] *Brookhaven Symposia in Biology, Genetic interaction and gene transfer*, red. C. W. Anderson, Upton, **29**: 147–160, 1978.
- [18] LEE F., MULLIGAN R., BERG P., RINGOLD G., Glucocorticoids regulate expression of dihydrofolate reductase cDNA in mouse mammary tumor virus chimeric plasmids, *Nature*, **294**: 228–232, 1981.
- [19] LEWIS J. A., KURTZ D. T., MELERA P. W., Molecular cloning of Chinese hamster dihydrofolate reductase specific cDNA and the identification of mul-



- tiple dihydrofolate reductase mRNAs in antifolate resistant Chinese hamster lung fibroblasts, *Nucleic Acids Res.*, **9**: 1311–1322, 1981.
- [20] LEWIS W. H., SRINIVASAN P. R., STOKOE N., SIMINOVITCH L., Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dihydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosomes or DNA, *Somatic Cell Genetics*, **6**: 333–347, 1980.
- [21] LITTLEFIELD J. W., Hybridization of hamster cells with high and low folate reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **62**: 88–95, 1969.
- [22] LOYTER A., SCANCOS G. A., RUDDLE F. H., Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 422–426, 1982.
- [23] MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA M., Biochemiczne podstawy cytotoksycznego działania ametoptyryny, *Post. Biochem.*, **24**: 93–115, 1978.
- [24] McBRIDE O. W., ATHWAL R. S., Genetic analysis by chromosome mediated gene transfer, *In vitro*, **12**: 777–786, 1976.
- [25] McBRIDE O. W., ATHWAL R. S., Chromosome mediated gene transfer with resultant expression and integration of the transferred genes in eukaryotic cells, [w:] *Brookhaven Symposia in Biology, Genetic interaction and gene transfer*, red. C. W. Anderson, Upton, **29**: 116–126, 1978.
- [26] McBURNEY M. W., WHITMORE G. P., Isolation and biochemical characterization of folate deficient mutants of Chinese hamster cells, *Cell* **2**: 173–182, 1974.
- [27] MERCOLA K. E., STANG H. D., BROWNE J., SALSER W., CLINE M. J., Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice, *Science*, **208**: 1033–1035, 1980.
- [28] MINNA J. D., LOLLEY P. A., FRANCKE U., Comparative mapping using somatic cell hybrids, *In vitro*, **12**: 726–733, 1976.
- [29] NUNBERG J. H., KAUFMAN R. J., CHANG A. C. Y., COHEN S. N., SCHIMKE R. T., Structure and genomic organization of the mouse dihydrofolate reductase gene, *Cell*, **19**: 355–364, 1980.
- [30] O'HARE K., BENOIST C., BREATHNACH R., Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 1527–1531, 1981.
- [31] PATTISHALL K., ACAR J., BURCHALL J. J., GOLDSTEIN F. W., HARVEY R. J., Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups, *J. Biol. Chem.*, **252**: 2319–2323, 1977.
- [32] POSTE G., Mechanisms of virus-induced cell fusion, *Intern. Rev. Cytol.*, **33**: 157–252, 1972.
- [33] RINGOLD G., DIECKMAN B., LEE F., Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the *Escherichia coli* XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**: 165–175, 1981.
- [34] ROBINS D. M., RIPLEY S., HENDERSON A., AXEL R., Transforming DNA integrates into the host chromosome, *Cell*, **23**: 29–39, 1981.
- [35] RUDDLE F. H., FOURNIER R. E. K., Somatic cell genetic analysis of gene transfer in mammalian cells [w:] *Brookhaven Symposia in Biology, Genetic interaction and gene transfer* red. C. W. Anderson, Upton, **29**: 96–105, 1978.



- [36] SCANGOS G., RUDDLE F. H., Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells — a review, *Gene*, **14**: 1–10, 1981.
- [37] SCHAEFER-RIDDER M., WANG Y., HOFSCHEIDER P. H., Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene, *Science*, **215**: 166–168, 1982.
- [38] SCHIMKE R. T., KAUFMAN R. J., ALT F. W., KELLEMS R. E., Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells, *Science*, **202**: 1051–1055, 1978.
- [39] SCHOR S. L., JOHNSON R. T., MULLINGER A. M., Perturbation of mammalian cell division. II Studies on the isolation and characterization of human mini segregant cells, *J. Cell Sci.*, **19**: 281–303, 1975.
- [40] SOUTHERN E. M., Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**: 503–517, 1975.
- [41] SPANDIDOS D. A., SIMINOVITCH L., Linkage of markers controlling consecutive biochemical steps in CHO cells as demonstrated by chromosome transfer, *Cell*, **12**: 235–242, 1977.
- [42] SPANDIDOS D. A., SIMINOVITCH L., Transfer of codominant markers by isolated metaphase chromosomes in Chinese hamster ovary cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 3480–3484, 1977.
- [43] SPANDIDOS D. A., SIMINOVITCH L., Genetic analysis by chromosome-mediated gene transfer in hamster cells [w:] *Brookhaven Symposia in Biology, Genetic interaction and gene transfer* red. C. W. Anderson, Upton, **29**: 127–134, 1978.
- [44] SUBRAMANI S., MULLIGAN R., BERG P., Expression of the mouse dihydrofolate reductase cDNA in simian virus 40 vectors, *Mol. Cell. Biol.*, **1**: 854–864, 1981.
- [45] SZYBALSKA E. H., SZYBALSKI W., Genetics of human cell lines, IV DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**: 2026–2034, 1962.
- [46] URLAUB G., CHASIN L. A., Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 4216–4220, 1980.
- [47] WIGLER M., PELLICER A., SILVERSTEIN S., AXEL R., Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor, *Cell*, **14**: 725–731, 1978.
- [48] WIGLER M., PELLICER A., SILVERSTEIN S., AXEL R., URLAUB G., CHASIN L., DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1373–1376, 1979.
- [49] WIGLER M., PERUCHO M., KURTZ D., DANA S., PELLICER A., AXEL R., SILVERSTEIN S., Transformation of mammalian cells with amplifiable dominant-acting gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 3567–3570, 1980.
- [50] WIGLER M., SWEET R., SIMA G. K., WOLD B., PELLICER A., LACY E., MANIATIS T., SILVERSTEIN S., AXEL R., Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes, *Cell*, **16**: 777–785, 1979.
- [51] WOLD B., WIGLER M., LACY E., MANIATIS T., SILVERSTEIN S., AXEL R., Introduction and expression of a rabbit  $\beta$ -globin gene in mouse fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5684–5688, 1979.
- [52] WONG T. K., NEUMANN E., Electric field mediated gene transfer, *Biophys. Res. Commun.*, **107**: 584–587, 1982.



- [58] WORTON R. G., DUFF C., FLINTOFF W., Microcell-mediated cotransfer of genes specifying methotrexate resistance, emetine sensitivity and chromate sensitivity with Chinese hamster chromosome 2, *Mol. Cell. Biol.*, 1: 330-335, 1981.

*Przyjęto: 20 stycznia 1983.*

*Otrzymano: 11 listopada 1982.*

*Adres autorki: ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.*

#### STOSOWANE SKRÓTY

- DMGT — DNA-mediated gene transfer  
przeniesienie genu za pomocą DNA
- CMGT — chromosome-mediated gene transfer  
przeniesienie genu za pomocą chromosomów
- TK — kinaza tymidynowa (2.7.1.21)
- APRT — fosforybozylotransferaza adeninowa (2.4.2.7)
- DHFR — reduktaza dihydrofolianowa (1.5.1.3)
- XGPRT — fosforybozylotransferaza hipoksantynowa (2.4.2.8)

Nazwy genów poszczególnych enzymów oznaczono małymi literami

- PteGlu — folian
- H<sub>2</sub>PteGlu — dihydrofolian
- H<sub>4</sub>PteGlu — tetrahydrofolian
- CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu — metylotetrahydrofolian
- CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu — metylenotetrahydrofolian
- CHO-H<sub>4</sub>PteGlu — formylotetrahydrofolian
- dUMP — dezoksyurydynomonofosforan
- dTMP — dezoksytymidynomonofosforan
- MTX — ametoptyryna
- MTXGlu<sub>n</sub> — poliglutaminiany ametoptyryny



**Warunki prenumeraty kwartalnika  
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 320 zł, półrocznie 160 zł

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada, na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych, PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter), 00-901 Warszawa, oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise  
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7. Poland.

Our-bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.



**SPIS TREŚCI**

J. GEMEL, Rola manganu w chloroplastach . . . . .	65
M. WITT, Biochemia głównych antygenów zgodności tkankowej H-2 myszy i HLA człowieka . . . . .	93
J. MYŚLIWSKA, Limfocyty T tworzące wczesne rozetki. I. Charakterystyka limfocytów T tworzących wczesne rozetki . . . . .	109
J. MYŚLIWSKA, Limfocyty T tworzące wczesne rozetki. II. Czynniki wpływające na liczbę limfocytów T tworzących wczesne rozetki . . . . .	125
B. GRZELAKOWSKA-SZTABERT, Transformowanie komórek eukariotycznych przez obcy materiał genetyczny: ekspresja genu reduktazy dihydrofolianowej	137