

874035  
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 26, ISSUE 1/1999  
(1-216)

28.01.89  
Postępy  
Biologii  
Komórki

Advances  
in Cell  
Biology

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

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

Redaguje Kolegium – Editors:

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

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

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

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

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

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

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

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

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

*Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470.*

#### Recenzenci tomu 25 PBK, 1998, – Referees of the volume No 25, 1998

prof. Wanda Barańska, prof. Szczepan Biliński, prof. Maria Charzyńska, dr Leszek Chmielewski, prof. Halina Gabryś, prof. Barbara Grzelakowska-Sztabert, prof. Edward Gwóźdź, dr hab. Lila Hryniewiecka, prof. Marek Jakóbiński, prof. Adam Jaworski, prof. Jerzy Kawiak, prof. Wincenty KilarSKI, prof. Zofia Kiliańska, prof. Jerzy Klag, dr Beata Kozłowska-Boszkó, prof. Jacek Kuźnicki, prof. Maria Kwiatkowska, dr Witold Lasek, prof. Stanisław Lewak, prof. Renata Maryniak, prof. Jan Michejda, dr hab. Jacek Modliński, dr Katerzyna Nałęcz, prof. Maria Olszewska, prof. Krystyna Ossowska, prof. Barbara Płytycz, dr Zbigniew Polański, prof. Danuta Rożynkowska, prof. Wiesława Rudnicka, dr Ewa Sikora, dr Krzysztof Skowronek, prof. Witold Walerych, prof. Stanisław Więckowski, dr hab. Michał Witt, dr hab. Elżbieta Wyroba, prof. Maciej Zabel, prof. Maciej Zylicz

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

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

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

## W tym Zeszytcie Postępów Biologii Komórki

- W ciągu ostatnich pięciu lat osiągnięto zasadniczy postęp w identyfikowaniu genów, których produkty uczestniczą w percepcji roślinnych hormonów. Wyselekcjonowanie mutantów *Arabidopsis thaliana* o zmienionej „potrójnej odpowiedzi” na etylen umożliwiło zidentyfikowanie dwóch genów kodujących kinazy białkowe. Więcej o kinazach białkowych Czytelnik znajdzie na stronie 3 oraz w PBK 1998, 25, 75.
- Neutrofile (patrz str. 181) są pierwszymi komórkami docierającymi do tkanek w odpowiedzi na czynnik zapalny. Działają ochronnie, chociaż uwalnianie wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i rodników tlenowych może prowadzić do uszkodzenia tkanek. Nadreaktywność neutrofilii może zależeć od nadmiernej ich preaktywacji w odpowiedzi na małe stężenia czynników zapalnych (preaktywatorów).
- Na stronie 101 opisano rolę p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, które jest białkiem odgrywającym istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego jako inhibitor aktywności podziałowej komórek. Hamuje ono aktywność większości kompleksów: kinaza cykliczna-cyklina, odgrywających kluczową rolę w przechodzeniu komórki przez poszczególne fazy cyklu mitotycznego
- Większość roślin okrytozalążkowych wytwarza kwiaty obupłciowe. U niewielkiej liczby gatunków jednopiennych istnieje przestrzenne rozdzielanie organów płciowych polegające na istnieniu organów męskich i żeńskich w oddzielnych kwiatach tej samej rośliny. U roślin dwupiennych kwiaty męskie i żeńskie tworzą się na odrębnych osobnikach. W artykule na stronie 83 omówiono aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów genetycznych i molekularnych, które są podstawą jedno- i dwupienności.
- Fagocytoza jest zapoczątkowana przez oddziaływanie wyspecjalizowanych receptorów błonowych fagocyty z odpowiednimi ligandami na powierzchni pobieranej cząstki. Aktywacja receptorów skorelowana jest z ich agregacją – wstępnym etapem generacji sygnału fagocytarnego, który prowadzi ostatecznie do przebudowy podbłonowego układu filamentów aktynowych i internalizacji cząstki. Artykuł na ten temat znajdzie Czytelnik na stronie 59.







## RECEPTORY ETYLENU, CYTOKININ I BRASINOSTEROIDÓW – TRANSMEMBRANOWYMI KINAZAMI BIAŁKOWYMI?\*

ETHYLENE, CYTOKININ AND BRASSINOSTEROIDS RECEPTORS  
– ARE THEY TRANSMEMBRANE PROTEIN KINASES?

Stanisław KOWALCZYK, Anna JAKUBOWSKA

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

*Streszczenie:* W ciągu ostatnich pięciu lat osiągnięto zasadniczy postęp w identyfikowaniu genów, których produkty uczestniczą w percepcji roślinnych hormonów. Wyselekcjonowanie mutantów *Arabidopsis thaliana* o zmienionej „potrójnej odpowiedzi” na etylen umożliwiło zidentyfikowanie dwóch genów kodujących kinazy białkowe. Gen *ETR1* koduje białko homologiczne z kinazą histydynową, która u bakterii i drożdży funkcjonuje w dwuskładnikowym układzie transdukcji sygnału. Produkt genu *CTR1* jest homologiczny z kinazami serynowo/treoninowymi z rodziny Raf. Kinaza *CTR1*, będąc ogniwem szlaku transdukcji położonym w dół od *ETR1*, pełni funkcję negatywnego regulatora w transmisji sygnału. W ostatnim czasie zidentyfikowano gen *CKII* kodujący białko homologiczne z dwuskładnikowymi układami regulacji, które podobnie jak *ETR1* może funkcjonować jako receptor cytokinin. Analiza mutantów niewrażliwych na brasinosteroidy doprowadziła do sklonowania genu *BR11*. Białko *BR11* należy do rodziny transbłonowych kinaz białkowych zawierających zewnątrzkomórkową domenę z powtórzeniami bogatymi w leucynę i wewnątrzkomórkową domenę charakterystyczną dla kinaz serynowo/treoninowych.

*Słowa kluczowe:* etylen, cytokiny, brasinosteroidy, dwuskładnikowy układ transdukcji, receptory kinazy białkowe

*Summary:* Over the last five years, substantial progress has been made toward the identification of genes that are involved in plant hormone perception. Mutant screens in *Arabidopsis thaliana* looking for alterations in the „triple response” to ethylene have identified two key signal transduction genes, both of which are protein kinases. *ETR1* encodes a protein that is similar to the histidine kinases of two component systems of bacteria and yeast. The *CTR1* gene product is a homolog of the Raf family of serine/threonine

\*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 6P04C 050 09

protein kinases. *CTR1* acts downstream of *ETR1* and functions as a negative regulator of the ethylene signal transduction pathway. Recently, the gene *CK11* was found to encode a protein similar to two-component regulator, and by analogy, *CK11* supposedly plays role of the cytokinin receptor. A screen for brassinosteroid-insensitive mutants resulted in the cloning *BRI1* gene. *BRI1* belongs to a family of plant receptor-like transmembrane kinases containing leucine-rich repeat and intracellular serine/threonine protein kinase domains.

*Key words:* ethylene, cytokinins, brassinosteroids, two-component systems, receptor-like protein kinases

## WSTĘP

Poszukiwania mechanizmów percepcji roślinnych hormonów, zainicjowane w latach siedemdziesiątych, zwrócone były początkowo na identyfikację „miejsc wiążących hormony”. W założeniu „miejscami wiążącymi” powinny być białka, które specyficznie i odwracalnie wiążą fitohormony przenosząc informację na składniki komórki pełniące funkcje efektorowe. Białkowa koncepcja receptorów od samego początku zyskiwała powszechną akceptację, ponieważ uwzględniała konieczność precyzyjnego odróżnienia struktury chemicznej hormonu od ogromnej liczby związków chemicznych obecnych w roślinach. Tylko konformacja białka receptorowego pozwala na selektywne rozpoznanie określonego hormonu i wytworzenie kompleksu za pomocą odwracalnego wiązania niekowalencyjnego, co w efekcie prowadzi do ciągu zdarzeń kończących się odpowiedzią fizjologiczną. Tak więc białko receptorowe wykrywa sygnał, a zarazem stanowi pierwsze ogniwo w łańcuchu transmisji sygnału.

Na początku lat osiemdziesiątych sformułowano szereg kryteriów, które opisują charakter oddziaływań zachodzących między hormonem a jego receptorem oraz definiują właściwości samego receptora [117]. Kryteria te można by sformułować następująco:

- Receptorem może być białko charakteryzujące się wysoką specyficznością i selektywnością wiązania cząsteczek hormonu.
- Wiązanie hormonu z receptorem powinno być odwracalne, a jego usunięcie z receptora powinno znosić wywołany efekt.
- Liczba receptorów w komórce powinna być ograniczona, czego następstwem jest wysyceniowa kinetyka wiązania hormonu z receptorem.
- Powinny istnieć różnice tkankowe w występowaniu określonych receptorów odzwierciedlające różnice we wrażliwości tkanek na określony hormon.
- Wartości stałych wiązania powinny się mieścić w zakresie fizjologicznych stężeń hormonu.
- Stała szybkości wiązania hormonu przez receptor powinna być adekwatna do czasu pojawienia się reakcji biochemicznej bądź fizjologicznej.

Mimo upływu prawie 30 lat od czasu, gdy podjęto pierwsze próby izolacji białek wiążących fitohormony, postęp wiedzy na temat receptorów fitohormonów jest nadal

dalece niezadowolający. Wydaje się, że ten brak znaczącego postępu wynika głównie z podjętej przed wielu laty metodyki badań. Identyfikowanie i oczyszczanie białek wiążących hormony wydawało się podejściem oczywistym i prostym, a w dodatku mogącym prowadzić szybko do sukcesu. Z czasem dopiero okazało się, że biochemiczna identyfikacja białek wiążących fitohormony może prowadzić do licznych artefaktów, zwłaszcza wówczas gdy nie jest poparta poszukiwaniami funkcjonalnych powiązań między izolowanymi białkami a wywoływanymi przez hormon efektami biochemicznymi i fizjologicznymi [55,62,69,71,83,89,90,118,119]. Można więc przypuszczać, że to właśnie trudności metodyczne sprawiły, że poszukiwania receptorów fitohormonów, uważane za bardzo interesujące i ważne, faktycznie nie były podejmowane na szerszą skalę przez odpowiednio duże grono badaczy. Niewiele się zmieniło pod tym względem również wtedy, gdy problematyka percepcji sygnałów zewnątrzkomórkowych oraz przekazywania sygnałów wewnątrz komórki zaczęła być jednym z wiodących problemów biologii molekularnej. Ten wieloletni zastój zaczyna być obecnie szybko przełamany głównie dzięki wprowadzaniu do badań technik genetyki molekularnej. To nowe podejście zaowocowało niekwestionowanym postępem w poznawaniu receptorów niektórych fitohormonów jak też odkrywaniu nowych ogniw w szlaku transdukcji sygnału. Na szczególną uwagę zasługują badania, które w ostatnim pięcioleciu doprowadziły do poznania receptorów etylenu oraz odkrycia u roślin nowego mechanizmu odbierania i przetwarzania sygnałów tzw. dwuskładnikowego układu, znanego stosunkowo dobrze u bakterii, a niedawno odkrytego również u innych eukariontów. Godny odnotowania jest również fakt, że tego rodzaju dwuskładnikowy układ kinazy histydynowo/asparaginianowej pełni przypuszczalnie funkcję receptora cytokinin. Inna nowo odkryta transbłonowa kinaza białkowa zawierająca domeny charakterystyczne dla kinaz serynowo/treoninowych jest prawdopodobnie receptorem brasinosteroidów.

## ETYLEN

Ostatnia dekada przyniosła znaczący postęp w badaniach szlaku biosyntezy etylenu wyrażający się nie tylko poznaniem kolejnych etapów syntezy, ale również sklonowaniem syntazy i oksydazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxyowego – kluczowych enzymów tego szlaku. Osiągnięcia te prezentowane były w ostatnim czasie zarówno w polskich wydawnictwach i czasopismach monograficznych [47,95], jak też w licznych monografiach o zasięgu ogólnościowym [31,35,49,56,77,111,128]. Obecnie etylen budzi zainteresowanie badaczy głównie w aspekcie jego udziału w regulacji transkrypcji genów [30], regulacji syntezy w różnych warunkach stresowych [74,81,86], a także jego percepcji i szlaku przekazywania sygnału. Postęp, jaki się dokonał w tym ostatnim przypadku, jest na tyle znaczący, że po prawie 30 latach poszukiwań receptorów fitohormonów można z satysfakcją stwierdzić, że w przypadku etylenu osiągnięto niewątpliwy sukces. Tak znaczący przełom stał



się możliwy dzięki wykorzystaniu w badaniach mutantów rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) o zmienionej odpowiedzi na etylen, co ostatecznie doprowadziło do zidentyfikowania i sklonowania zmutowanych genów. O wadze tych przełomowych badań może świadczyć liczba prac przeglądowych na ten temat opublikowanych w literaturze światowej w ostatnich kilku latach [9,17,18,33,35,59,60].

### Białka wiążące etylen

Punktem wyjścia w poszukiwaniach receptora etylenu, podobnie jak w przypadku innych fitohormonów, było założenie, że białko receptorowe można będzie zidentyfikować na podstawie wiązania znakowanego izotopowo etylenu, jego analogów bądź inhibitorów wiązania. Zainicjowane pod koniec lat siedemdziesiątych pierwsze próby identyfikacji „miejsc wiążących” etylen, wskazywały na możliwość znalezienia takich białek, bowiem stwierdzono, że fragmenty błon liścieni fasoli wiążą swoiście etylen [110]. Wartości stałych szybkości wiązania są jednak stosunkowo niskie, bo mieszczą się w zakresie od kilku do kilkunastu godzin. W późniejszych badaniach wykazano, że z wyjątkiem liścieni fasoli, w tkankach innych roślin, takich jak: ryż, groch, rzodkiewnik, obecne są dwa rodzaje miejsc wiążących, które różnią się wartościami stałych szybkości wiązania i uwalniania etylenu. Tak więc oprócz poznanych już w fasoli miejsc wolno wiążących etylen, obecne są tutaj również miejsca, których wysycenie osiągnąć jest w czasie 40–60 min [100,101,102]. Badania autoradiograficzne oraz frakcjonowanie struktur komórkowych metodą wirowania w gradiencie sacharozy wykazały, że w liścieniach fasoli miejsca wiążące etylen zlokalizowane są głównie w błonach siateczki śródplazmatycznej, błonach ciał białkowych oraz w niewielkiej ilości w błonie plazmatycznej [110].

Niska szybkość uwalniania znakowanego etylenu z błon powinna sprzyjać oczyszczaniu białek wiążących. Okazało się jednak, że hydrofobowe białka po uwolnieniu z błon na ogół tracą zdolność wiązania etylenu. Pewien sukces odnieśli ostatnio Harpham i wsp. [43], oczyszczając do stopnia homogenności dwa polipeptydy o masie 26 i 28 kDa zachowujące właściwości wiązania etylenu. Sekwencja aminokwasowa N-końca, a także kilka wewnętrznych sekwencji większego polipeptydu, dających w sumie około 25% całego polipeptydu, nie wykazują homologii z żadną z sekwencji zdeponowanych w banku genów. Brak jest również jakiegokolwiek podobieństwa sekwencji z białkiem receptorowym ETR1 *A. thaliana* poznany przed pięciu laty [16].

Już od początku badań nad wiązaniem etylenu zwracano uwagę na związki, takie jak: propylen, acetylen, tlenek węgla, izocyjanek metylu, które w wyższych stężeniach wywołują efekty fizjologiczne takie same jak etylen. Poznano także grupę związków, które współzawodniczą o miejsca wiążące, ale nie wywołują efektów fizjologicznych (2,5-norbornadien, 1,3-butadien, *cis*-2-buten, cyklopentadien, cyklopropen) [41,109,110].

## Mutanty *A. thaliana* i pomidora o zmienionej odpowiedzi na etylen

Zmiany morfologiczne, pojawiające się u roślin rosnących w atmosferze zawierającej etylen, a także możliwość indukowania przez etylen dojrzewania owoców, zwróciły uwagę badaczy na możliwość wyselekcjonowania mutantów, których mutacje mogą dotyczyć białek biorących udział w percepcji i transdukcji sygnału. Szczególnie przydatne w identyfikowaniu tego typu mutantów okazały się znane już od dawna zmiany morfologiczne występujące u kiełkujących roślin dwuliścienych rosnących w ciemności w obecności etylenu. Zmiany te określane jako „potrójna odpowiedź” polegają na zahamowaniu wzrostu wydłużeniowego korzenia i hipokotyła, pogrubieniu hipokotyła wynikającego z reorientacji kierunku wzrostu z podłużnego na izodiametryczny i zwiększeniu zakrzywienia haczyka wierzchołkowego. Przypuszcza się, że zmiany te ułatwiają wzrost i służą m.in. ochronie merystemu wierzchołkowego w czasie przebijania się kiełków przez warstwę gleby.

Potrójna odpowiedź u *A. thaliana* jest bardzo podobna do reakcji kiełków grochu, która zwróciła uwagę biologów na etylen, a przez szereg lat była podstawą jakościowego, a nawet ilościowego oznaczania etylenu. Tak więc rośliny o zmienionej odpowiedzi na etylen są łatwe w identyfikacji, a ich selekcja spośród tysięcy „skróconych” w obecności etylenu osobników dzikich nie nastęrcza trudności. W ten sposób wyodrębniono 2 grupy mutantów wykazujących zmienioną odpowiedź na wysycające stężenie egzogenego etylenu. Do pierwszej grupy zalicza się te mutacje, które prowadzą do całkowitego bądź częściowego **zaniku wrażliwości na etylen**. Pierwszym mutantem tego typu, wyselekcjonowanym 10 lat temu jest mutant *etr1* (*ethylene resistant*) [8]. Wielkim ułatwieniem w identyfikowaniu zmutowanych osobników jest fakt, że już po 3 dniach od wysiania nasion, zmutowana roślina rzodkiewnika rosnąca w atmosferze etylenu wyróżnia się długością hipokotyła i korzenia, która jest prawie identyczna jak u roślin linii dzikiej rosnących na powietrzu. W testach pomiaru długości hipokotyła stwierdzono, że mutant *etr1* jest niewrażliwy na etylen nawet przy stężeniu równym 100  $\mu\text{l/l}$ , podczas gdy rośliny dzikie już przy stężeniu 1  $\mu\text{l/l}$  są krótsze o około 70%. Ponadto rośliny dzikie w obecności etylenu zawierają mniej chlorofilu w liściach i charakteryzują się prawie 3–4-krotnie wyższą aktywnością peroksydazy. Mutant *etr1* produkuje 5–10-krotnie więcej etylenu, co sugeruje, że nie funkcjonuje u niego mechanizm sprzężenia zwrotnego kontrolujący biosyntezę etylenu. Okazało się też, że mutant *etr1* w warunkach *in vivo* wiąże pięciokrotnie mniej etylenu niż rośliny dzikie [8]. Brak wrażliwości *etr1* na etylen jest cechą, która segreguje w następnym pokoleniu w stosunku 3:1, co dowodzi, że wyselekcjonowany mutant był heterozygotą, a mutacja miała charakter dominujący. W wyniku wstecznych krzyżowań z roślinami dzikimi uzyskano kilka linii homozygotycznych *etr1*, które w krzyżowaniach genetycznych posłużyły do ustalenia lokalizacji miejsca mutacji w chromosomie, a następnie do identyfikacji i sklonowania genu *ETR1*.

Zakończone sukcesem klonowanie genu *ETR1* przyczyniło się do wyselekcjonowania i scharakteryzowania szeregu innych mutantów. Do dzisiaj zidentyfikowano co najmniej 6 innych loci, w których mutacja dawała osobniki niewrażliwe na etylen. Mutantem allelicznym z *etr1* jest mutant *ein1* (*ethylene insensitive*) [40]. Obydwie mutacje położone są w chromosomie 1 i są dominujące. Mutacjami recesywnymi prowadzącymi w różnym stopniu do zaniku wrażliwości na etylen są mutacje *ein2*, *ein3*, *ein5*, *ein6* [19,99]. Szczególnie interesujące ze względu na przydatność w badaniach szlaku transdukcji sygnału są mutanty *ein2* i *ein3*. Mutant *ein2* charakteryzuje się tym, że po zakażeniu roślinnymi bakteriami patogennymi nie wykazuje objawów typu chloroz czy lezji, a więc zmian charakterystycznych dla tzw. reakcji nadwrażliwości [4]. Natomiast sklonowany gen *EIN3* koduje białko jądrowe, którego miejsce w szlaku transdukcji sygnału jest ostatnio intensywnie badane [19].

Druga grupa mutantów charakteryzuje się **konstytutywnymi zmianami fenotypu**, będącymi typowymi reakcjami na etylen, mimo że rośliny rosną w warunkach pozbawionych etylenu. W tej grupie można wyodrębnić 2 klasy mutantów.

Do pierwszej klasy zalicza się mutacje prowadzące do nadprodukcji etylenu. Efektem takiej mutacji jest wystąpienie „potrójnej odpowiedzi” przy braku egzogenego etylenu. Mutanty te określane mianem *eto* (*ethylene overproducers*) produkują od 10 do 100 razy więcej etylenu niż rośliny dzikie. Mutacje *eto* identyfikowane są na podstawie znoszenia charakterystycznych zmian fenotypowych przez związki hamujące syntezę etylenu (aminowinyloglicyna, kwas  $\alpha$ -aminoizomalousowy) bądź wspomniane już wcześniej związki hamujące wiązanie etylenu do białek (*trans*-cyklookten, jony srebra). Dotychczas zidentyfikowano 5 różnych loci *eto* [40,58].

Do drugiej klasy należą mutanty typu *ctr* (*constitutive triple response*), u których występuje „potrójna odpowiedź” w nieobecności egzogenego etylenu i to nawet wówczas, gdy zahamowana jest jego synteza bądź wiązanie. Mutacja *ctr* jest recesywna i prowadzi do drastycznych zmian morfologicznych i morfogenetycznych [58]. Ogólnie można stwierdzić, że mutanty *ctr*, mimo że nie produkują więcej etylenu niż szczepy dzikie, to w nieobecności egzogenego etylenu wykazują wiele fenotypowych podobieństw do osobników dzikich rosnących w obecności wysycających stężeń etylenu. I tak, liście i korzenie mutantów *ctr1* są mniejsze, kwiatostany są bardziej zwarte, a rośliny zakwitają później. Komórki epidermalne mutantu *ctr* są pięciokrotnie mniejsze niż u osobników dzikich rosnących na powietrzu. Zmniejszenie wielkości komórek u *ctr* i związane z tym mniejsze rozmiary liści, krótszy hipokotyl i zredukowany system korzeniowy są typowymi reakcjami roślin na etylen. Przypuszcza się, że zmiany te mają związek z reorientacją ścian komórkowych i cytoszkieletu [108]. Interesującą cechą fenotypową mutantów *ctr1* jest też tworzenie dodatkowych włośników korzeniowych w miejscach, gdzie na ogół włośniki nie występują [114]. Jednak jedną z najważniejszych cech mutantów *ctr1* jest



wysoki poziom ekspresji genów znanych jako geny regulowane przez etylen, mimo że zmutowana roślina rośnie w atmosferze pozbawionej etylenu [30,58]. Zmutowany allel *ctr1* przy krzyżowaniu wstecznym przekazywany jest rzadziej niż allel dziki przypuszczalnie z powodu defektu w gametoficie żeńskim *ctr1*.

Interesujące z punktu widzenia przewidywania miejsca produktów zmutowanych genów w szlaku transdukcji sygnału są badania mające na celu śledzenie oddziaływań poszczególnych genów na ujawnienie cech fenotypowych zdeterminowanych przez zmutowane geny. Zależności te określane mianem epistazy badane były w krzyżowaniach między poszczególnymi mutantami. Wykazano w ten sposób, że epistaza między mutacjami *ctr1* a *etr1*, *ein2*, *ein3* i *ein4* jest kompletna oraz że podwójna mutacja pomiędzy *etr1*, *ein2*, *ein3* i *ein4* nie jest addytywna w odniesieniu do zmian fenotypowych [17,18,46,57,58,99]. Na tej podstawie zaproponowano następujące wzajemne położenie produktów zmutowanych genów w łańcuchu transdukcji sygnału:

### *EIN2*

etylen ⇔ *ETR1* ⇔ *CTR1* ⇔ zmiany fenotypowe

### *EIN3*

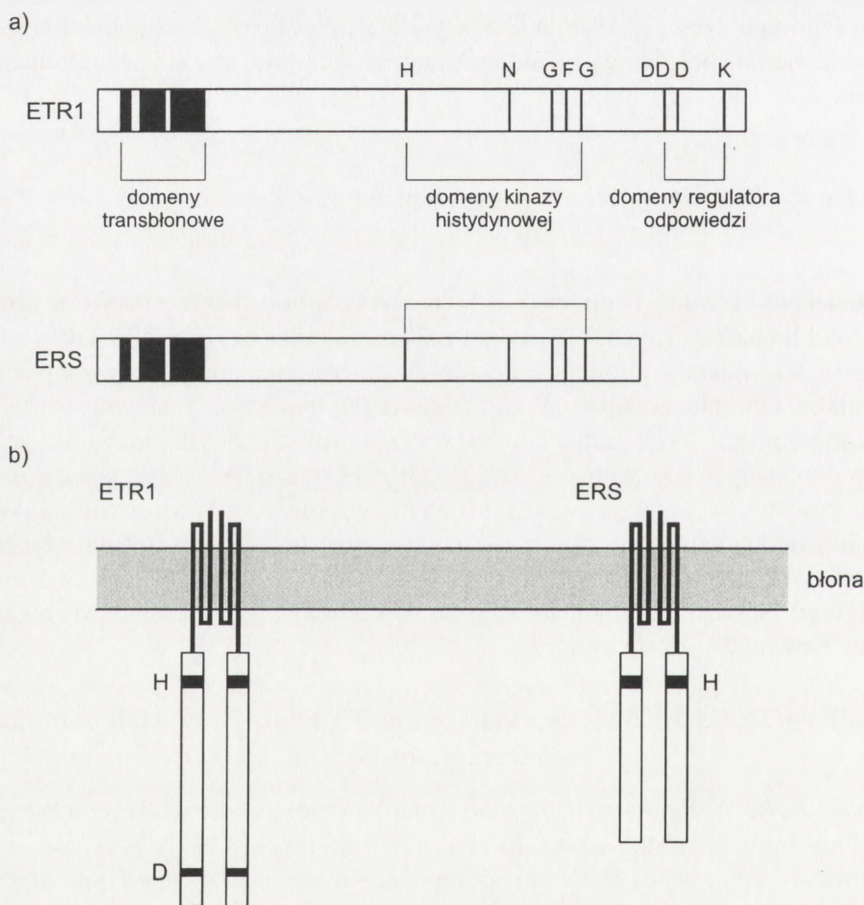
Dzisiaj już wiadomo, że etylen jest kluczowym hormonem w regulacji dojrzewania owoców klimakterycznych, takich jak: jabłko, pomidor czy gruszka. Od wielu lat znane są też mutanty pomidora, u których dojrzewanie owoców jest opóźnione lub całkowicie zahamowane. W ostatnich latach zwrócono ponownie uwagę na znanego od ponad 40 lat mutantu *nr* (*never ripe*), u którego tylko niewielki procent genów określanych jako geny dojrzewania ulega ekspresji. W ostatnim czasie stwierdzono ponadto, że spośród badanych mutantów pomidora tylko *nr* nie wykazuje potrójnej odpowiedzi. Nie obserwowano u niego również zmian epinastycznych i zmian związanych ze starzeniem i opadaniem kwiatów [68]. Ostatecznie mutant *nr*, którego mutacja ma charakter częściowo dominujący, okazał się również mutantem niewrażliwym na etylen.

Białka *ETR1* i *ERS A. thaliana* oraz TXTR-14 i eTAE1 pomidora  
– receptorami etylenu

Locus *ETR1 A. thaliana* mapowano techniką *chromosome walking*, a następnie określony fragment DNA użyto do *screeningu* biblioteki cDNA [16]. Tak zidentyfikowane 4 zmutowane allele były dominujące w stosunku do alleli typu dzikiego. Porównując sekwencję cDNA z sekwencją genomową ustalono, że gen zawiera 6 intronów. Eksony kodują 738 aminokwasów, które tworzą białko o wyliczonej masie 82,5 kDa. Sekwencja aminokwasowa N-końcowego fragmentu zawierającego 313 aminokwasów nie wykazuje homologii z żadną ze znanych sekwencji. W tej



części położone są 3 fragmenty hydrofobowe (pozycje:26-43, 48-76 i 83-115) tworzące domeny transbłonowe (rys. 1). Interesujący z punktu widzenia funkcjonowania białka ETR1 jest fakt, że wszystkie 4 alleliczne mutacje *etr1* powstałe w wyniku zamiany 1 nukleotydu zlokalizowane są w obrębie tych trzech regionów hydrofobowych [16]. Gen *ETR1* nie zawiera sekwencji sygnałowej, co przy braku badań dotyczących wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka nie pozwala przewidzieć, z jakimi błonami komórkowymi jest ono związane. Pozostała wewnątrzkomórkowa sekwencja zawiera domeny charakterystyczne dla bakteryjnego dwuskładnikowego układu transdukcji [91]. Obejmują one 5 konserwatywnych sekwencji „sensora” i 3 charakterystyczne domeny „regulatora odpowiedzi” (rys. 1). W domenie kinazy



RYSUNEK 1. Białka receptorowe ETR1 i ERS: a – schemat budowy z zaznaczonymi trzema domenami transbłonowymi, domenami kinazy histydynowej transmitera oraz domenami regulatora odpowiedzi w białku ETR1; b – topologiczny model homodimerycznych receptorów ETR1 i ERS z zaznaczonym miejscem autofosforylacji histydyny (H) i fosforylacji reszty asparaginianu (D) w regulatorze odpowiedzi (na podstawie danych [16,46,105])

histrydnowej „transmittera” położone są konserwatywne sekwencje MNHEMRTPM LMQIILNIVGNA VKDSGAGIN IFTKF GSGLGL z resztą histydy ulegającą autofosforylacji. Regulator odpowiedzi zawiera konserwatywne sekwencje DE D K. W bakteryjnych układach dwuskładnikowych reszta kwasu asparaginowego w części „regulatora odpowiedzi” ulega ufosforylowaniu w wyniku przeniesienia reszty fosforanowej z histydy „transmittera”.

Białko ETR1 izolowane z błon *A. thaliana* oraz drożdży transformowanych genem *ETR1* ma masę cząsteczkową 147 kDa [105]. Związki hydrosulfidowe zrywające wiązania dwusiarczkowe umożliwiają elektroforetyczny rozdział polipeptydów o masie cząsteczkowej wynoszącej 79 kDa, co dowodzi, że natywne białko jest homodimerem (rys. 1). Jest zatem wielce prawdopodobne, że sąsiadujące ze sobą polipeptydy dimerycznego receptora ETR1 mogą fosforylować konserwatywne reszty histydy sąsiedniego monomeru.

Transformowanie genu *ETR1* do komórek drożdży jednoznacznie potwierdziło receptorową rolę ETR1 [104]. Zrekombinowane białko wiąże odwracalnie etylen, a stała dysocjacji równa  $2,4 \times 10^{-9}$  M jest wartością podobnego rzędu do tych, jakie uzyskano wcześniej w przypadku błon komórkowych izolowanych z różnych roślin [110]. Wiązanie ma charakter wysyceniowy, hamowane jest przez 2,5-norbornadien i *trans*-cyklookten i charakteryzuje się stałą szybkości dysocjacji równą 12,5 godz. W warunkach, gdy ekspresji w drożdżach podlegał tylko N-końcowy fragment *ETR1* (od pozycji 1 do 165), w obrębie którego położone są wszystkie 3 domeny hydrofobowe, to syntetyzowany tak skrócony polipeptyd nadal wiązał etylen. Na podstawie wcześniejszych obserwacji przypuszcza się, że w wiązaniu etylenu mogą uczestniczyć reszty cysteiny, histydy bądź metioniny mogące koordynacyjnie wiązać metale (cynk, miedź). Interesujący z tego punktu widzenia jest mutant *etr1-1*, w którym cysteina w pozycji 65 położona w drugiej domenie transbłonowej została zamieniona na tyrozynę. Białko ETR1-1 drożdży transformowanych tak zmutowanym genem nie wiąże etylenu, co sugeruje, że to właśnie ta reszta cysteiny bezpośrednio uczestniczy w wiązaniu hormonu. Zamiana cysteiny w pozycji 99 (trzecia domena transmembranowa) oraz w pozycjach 4 i 6 nie wpływa istotnie na wiązanie hormonu, co może wskazywać, że reszty tych cystein mogą uczestniczyć w tworzeniu mostków dwusiarczkowych między monomerami [104].

Całkowity brak wiązania etylenu przez zmutowane białko ETR1-1 produkowane w komórkach drożdży oraz niekompletny zanik wiązania u mutantu *etr1-1* wskazywały na obecność u *A. thaliana* innych białek wiążących etylen [8]. Przypuszczenie to okazało się trafne, bowiem stosując sondę cDNA komplementarną z *ETR1* znaleziono w genomowej bibliotece fragmenty hybrydujące z *ETR1* [46]. Sklonowany gen *ERS* (*ethylene response sensor*) położony w chromosomie 2 koduje białko, które w części N-końcowej (reszty 1-321) jest identyczne w 75% z ETR1, a w domenie kinazy histydy procent identyczności wynosi 58. W części C-końcowej białko ERS jest jednak krótsze od ETR o 125 reszt aminokwasów, bowiem nie

zawiera domeny „regulatora odpowiedzi” (rys. 1). Stwierdzenie tak zasadniczej różnicy nasuwa pytanie o funkcję, jaką pełni każde z tych białek w percepcji etylenu. Próbę wyjaśnienia tego problemu podjęto w doświadczeniach, w których zmutowanym punktowo genem *ERS* (izoleucyna w pozycji 62 zastąpiona fenylalaniną podobnie jak w mutancie *etr1-4*) transformowano dziki szczep *A.thaliana*. Okazało się, że tak zmutowany gen *ers1* w mieszańcach z osobnikami dzikimi segregował jako gen dominujący dając linie nie wykazujące „potrójnej odpowiedzi” [46]. Wyniki te sugerują zatem, że obok ETR także ERS jest białkiem receptorowym wiążącym etylen. Można również zakładać, że obydwa monomeryczne białka mogą tworzyć funkcjonalne homo- i heterodimery, czego efektem może być zróżnicowana wrażliwość tkanek na etylen. Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie o to, czy kinaza ERS w transdukcji odebranego sygnału współdziała z oddzielnym niezidentyfikowanym jeszcze „regulatorem odpowiedzi”, podobnie jak to jest w większości przypadków u bakterii.

W kontekście poszukiwań receptorów etylenu u *A. thaliana* zainteresowanie badaczy budził również wspomniany wcześniej mutant *nr* pomidora. W pierwszej kolejności nasuwało się pytanie o to, czy genom pomidora zawiera sekwencje homologiczne z ETR1. W próbach poszukiwania odpowiedzi na to pytanie wykonano *screening* biblioteki cDNA z owoców, w którym użyto sondy hybrydyzacyjnej przygotowanej przy użyciu fragmentu zawierającego około 50% sekwencji kodującej *ETR1*. W ten sposób wyselekcjonowano klon oznaczony jako *TXTR-14* zawierający w otwartej ramce odczytu sekwencję kodującą 635 aminokwasów tworzących białko o masie 71 kDa [123]. Białko TXTR-14 jest w 68% identyczne z ETR1, jednakże podobnie jak ERS nie ma fragmentu o długości 103 aminokwasów odpowiadającego domenie „regulatora odpowiedzi”. Porównując gen *TXTR-14* mutantu *nr* i rośliny dzikiej stwierdzono, że mutant w pozycji 36 ma resztę leucyny zamiast prolina. Zamiana tych aminokwasów w tej pozycji jest następstwem zamiany w jednej trójce nukleotydów DNA z C na T. Prolina w pozycji 36 jest konserwatywna w ETR1 i ERS, co sugeruje, że mutacja w tym miejscu może być przyczyną braku wrażliwości na etylen mutantu *nr*. Transkrypcja genu *TXTR-14* indukowana jest przez etylen, ale tylko w owocach wyrośniętych i zielonych, natomiast nie zachodzi w owocach niedojrzałych, a także, co się wydaje oczywiste, u mutantu *nr* [123].

Sondą hybrydyzacyjną *ETR1* wyznakowano w genomie pomidora co najmniej 5 loci, co wyraźnie wskazywało, że *TXTR-14* jest przedstawicielem rodziny genów [126]. Wkrótce z biblioteki cDNA dojrzewających owoców wyizolowano klon *tETR*, który podobnie jak *TXTR-14* koduje białko w 70% identyczne z ETR1, nie zawierające również domeny regulatora odpowiedzi [93]. W ostatnim czasie, cDNA genu *ETR1* wykorzystano jako sondę do *screeningu* biblioteki cDNA przygotowanej na bazie mRNA ze strefy odcinania liści pomidora. Tak wyizolowano klon *eTAE1*, który koduje polipeptyd o długości 754 aminokwasów i wyliczonej masie równej 84 kDa. Białko to jest w 81% identyczne z białkiem ETR1 i podobnie jak ETR1



oprócz domeny kinazy histydynowej ma domenę „regulatora” odpowiedzi. Stwierdzono ponadto, że eTAE1 podlega konstytutywnej ekspresji we wszystkich badanych tkankach [129].

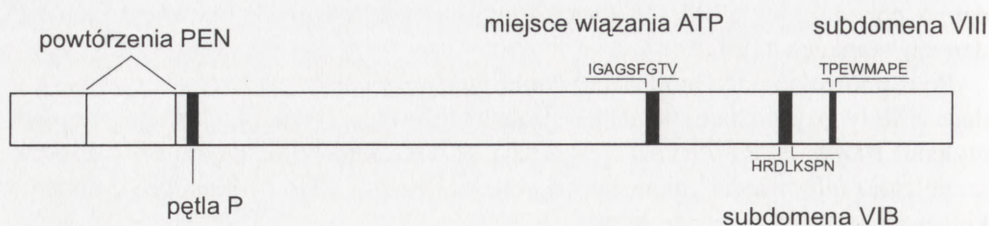
Podsumowując dotychczasowe wyniki można zatem stwierdzić, że obydwie badane rośliny mają co najmniej dwa rodzaje białek mogących pełnić funkcję receptora etylenu. Białka ETR1 i eTAE1 zawierają domenę kinazy histydynowej i domenę „regulatora odpowiedzi”, podczas gdy białka ERS i TXTR-14 mają tylko domenę kinazy histydynowej transmittera.

### Białko CTR – serynowo/treoninowa kinaza białkowa homologiczna z białkami rodziny Raf

Mutanty *A. thaliana* klasy *ctr* nie produkują więcej etylenu niż rośliny dzikie, a mimo to rosnąc na powietrzu fenotypowo przypominają rośliny dzikie rosnące w obecności etylenu [58]. Mutacja *ctr* położona jest na chromosomie 5 i jest mutacją recesywną, aczkolwiek nie segreguje ściśle w stosunku 3:1. Przypuszcza się, że przyczyną nieco zmienionego stosunku (4,8:1) jest obniżona żywotność gametofitu bądź zmienione właściwości łagiewki pyłkowej.

Gen *CTR1* zidentyfikowany metodą mutagenезы insercyjnej (*T-DNA tagging*), zawiera 15 eksonów kodujących białko zbudowane z 821 aminokwasów o wyliczonej masie około 90 kDa (rys. 2). Ustalono również sekwencję nukleotydową 4 mutantów alelicznych *ctr*. W sekwencji aminokwasowej stwierdzono 11 subdomen charakterystycznych dla wszystkich kinaz białkowych, jednakże najwyższy stopień homologii (41%) łączy CTR1 z kinazami serynowo/treoninowymi rodziny Raf. O przynależności do tej rodziny kinaz białkowych świadczą sekwencje subdomeny VIB (HRDLKSPN) i subdomeny VIII (TPEWMAPE). Chociaż białko CTR1 jest bardziej podobne do kinaz serynowo/treoninowych niż kinaz tyrozynowych, to homologia między *CTR1* a genem *KYK1* z *Dictyostelium* kodującym kinazę białkową o podwójnej specyficzności jest również znacząca [72]. Domena kinazowa obejmuje ponadto konserwatywną sekwencję (IGAGSFGTV) położoną w subdomenie I (pozycja 557 do 565), która jest miejscem wiązania ATP. Chociaż aktywność kinazowa CTR1 nie została jeszcze potwierdzona eksperymentalnie, to o takiej właśnie funkcji mogą świadczyć dwie z 5 mutacji, które dotyczą zamiany aminokwasów zajmujących konserwatywne pozycje we wszystkich znanych kinazach białkowych. U mutantu *ctr1-1* zamiana ta dotyczy kwasu asparaginowego w subdomenie VII, który został zastąpiony przez kwas glutaminowy, natomiast u mutantu *ctr1-4* kwas glutaminowy położony w subdomenie III został zamieniony na lizynę.

W części N-końcowej CTR1 nie zawiera hydrofobowej domeny transbłonowej, natomiast ma sekwencję podobną do białek Raf z charakterystycznymi regionami bogatymi w serynę. To podobieństwo jest szczególnie intrygujące zważywszy, że kinazy Raf modulują odpowiedź komórki na sygnały zewnątrzkomórkowe [67,94].



RYSUNEK 2. Schemat budowy cytoplazmatycznej kinazy CTR1 z zaznaczonymi fragmentami typowymi dla białek z rodziny Raf (powtórzenia PEN, pętla P) oraz domenami kinazy serynowo/treoninowej (na podstawie danych [58])

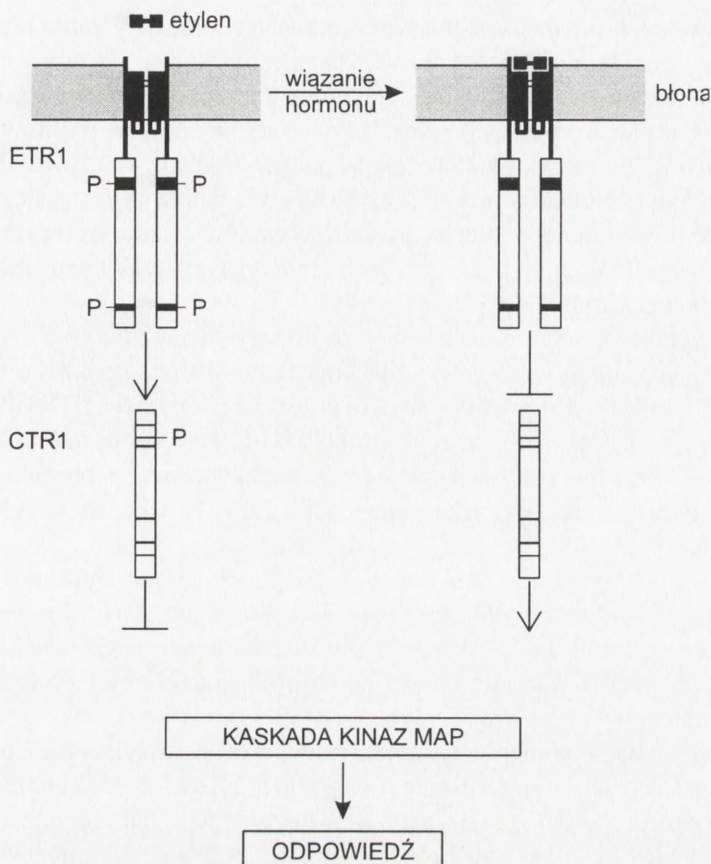
W części N-końcowej położone są też charakterystyczne dla Raf krótkie sekwencje (-GGX-) określane jako powtórzenia PEN, a także tzw. pętla P utworzona przez sekwencję wiążącą ATP lub GTP (rys. 2). Zakłada się, że te charakterystyczne fragmenty kinaz Raf działają jako negatywne regulatory aktywności kinazowej w części C-końcowej. Podobnie może być również w przypadku kinazy CTR1, gdyż trzy z pięciu poznanych mutacji alelu *ctr* położone są w części N-końcowej.

### Percepcja i transdukcja sygnału

Dominujący charakter mutacji *etr1* można tłumaczyć modelem, w którym domena kinazy histydynowej jest aktywna w nieobecności związanego z receptorem etylenu (rys. 3). W ten sposób receptor ETR1 funkcjonuje jako negatywny regulator następných ogniw szlaku transdukcji sygnału. Zgodnie z tym mechanizmem, wiązanie etylenu przez ETR1 prowadzi do inaktywacji kinazy histydynowej i derepresji szlaku odpowiedzi. Zmutowany receptor, który nie potrafi związać etylenu, pozostaje zatem w stanie permanentnej aktywności, pobudzając szlak odpowiedzi, czyli w sposób bezpośredni lub pośredni aktywując kinazę CTR1. Aktywna kinaza CTR hamuje aktywność kaskady kinaz MAP, czego końcowym efektem jest brak ekspresji odpowiednich genów. Związanie etylenu przez ETR, któremu towarzyszy zahamowanie aktywności kinazy histydynowej receptora, prowadzi do zahamowania aktywności kinazy serynowo/treoninowej CTR, a w efekcie do aktywacji kaskady kinaz MAP i aktywacji czynników transkrypcyjnych.

Proponowany mechanizm przypomina sposób działania receptora FixL/FixJ *Rhizobium meliloti* regulującego ekspresję genów związanych z asymilacją azotu [39]. Na podobnej zasadzie działa u drożdży mechanizm rejestrujący zmiany osmolarności środowiska zewnętrznego, określane skrótowo jako HOG (*high osmolarity glycerol response*) [97].

W alternatywnym modelu funkcjonowania receptora ETR1 zakłada się, że wiązanie etylenu przez receptor uaktywnia kinazę histydynową, która bezpośrednio



RYSUNEK 3. Schemat ilustrujący funkcjonowanie receptora ETR1 i kinazy CTR1 w percepcji etyleny i przekazywaniu sygnału na kaskadę kinaz MAP. Autofosforylacja receptora, fosforylacja reszty kwasu asparaginowego w „regulatorze odpowiedzi” i ufosforylowanie domeny regulatorowej kinazy CTR1 mają miejsce wówczas, gdy receptor nie jest związany z etylenem. Ufosforylowanie kinazy CTR1 (kinaza kinazy kinazy MAP; MAPKKK) powoduje jej aktywację i zahamowanie szlaku kinaz MAP. Związanie etyleny przez ETR1 hamuje aktywność kinazy histydynowej i fosforylację kinazy CTR1, co prowadzi do derepresji szlaku kaskady kinazy MAP i w efekcie do aktywacji czynników transkrypcyjnych. Schemat nie przedstawia alternatywnego mechanizmu opisanego krótko w tekście (wg [9,17,-18,33,35,59,60], zmodyfikowane)

lub pośrednio hamuje aktywność kinazy CTR1. W obu modelach ETR1 pośrednio lub bezpośrednio reguluje aktywność kinazy serynowo/treoninowej CTR1, która działa jako negatywny regulator odpowiedzi na etylen. Sugestia ta opiera się na założeniu, że mutacje w *CTR1* znoszą aktywność kinazową, czego efektem są zmiany fenotypowe charakterystyczne dla odpowiedzi na etylen.

Odkrycie kinazy CTR1 zwraca uwagę na roślinne kinazy homologiczne z kinazami Raf, pełniącymi rolę „pierwszego stopnia” w kaskadzie kinaz białkowych MAP. Kinazy MAP (MAPKs – *mitogen-activated protein kinases*) są kinazami seryno-



wo/teoninowymi, które u eukariontów pośredniczą w przekazywaniu różnorodnych sygnałów zewnątrzkomórkowych na wewnątrzkomórkowe efekторы, integrując w ten sposób różne szlaki transdukcji sygnałów [50,116]. Regulacja kaskady kinaz MAP odbywa się w drodze fosforylacji konserwatywnych reszt teoniny i tyrozyny w motywie -T-X-Y-, który położony jest w pobliżu domeny kinazowej (subdomena VII). Na podstawie wyników prowadzonych obecnie badań sugeruje się, że roślinne kinazy MAP pośredniczą w przekazywaniu sygnałów między receptorami odbierającymi informacje o zranieniach, stresach abiotycznych, ataku patogenów a czynnikami transkrypcyjnymi [44,125].

Jak już wcześniej wspomniano, epistaza między mutacjami *ctrl1* a *ein2* i *ein3* jest kompletna. Mutacje *ein2* i *ein3* maskują fenotyp mutantu *ctrl1*, co wskazuje, że w szlaku transdukcji sygnału ogniwa te położone są poniżej CTR1 [99]. Można więc założyć, że CTR1 przez regulację aktywności kaskady kinaz MAP wpływa na aktywność niezidentyfikowanych jeszcze białek będących produktami genów *EIN2* i *EIN3* tworząc następującą kaskadę reakcji: ETR $\Rightarrow$ CTR1 $\Rightarrow$ MAPKK $\Rightarrow$ MAPK $\Rightarrow$ EIN2; EIN3

Końcowymi ogniwami szlaku transdukcji sygnału mogą być białka EREBPs (*ethylene-responsive element-binding proteins*), które wiążą się do specyficznych sekwencji promotorowych DNA (*GCC box*) określanych skrótem ERE (*ethylene response elements*). W ostatnim czasie zidentyfikowano cztery tego rodzaju białka charakteryzujące się masą cząsteczkową 24–33 kDa [14,87].

Równoległe z badaniami genetycznymi podejmowane były również badania biochemiczne mające na celu śledzenie fosforylacji białek. Stwierdzono, że indukowanej przez etylen ekspresji genów związanych z patogenezą towarzyszy fosforylacja białek [98]. Do podobnych wniosków prowadzą również wyniki badań prowadzonych na *Arabidopsis*, fasoli, grochu i tytoniu [6,61,66,85,107].

Pewne doświadczenia wskazują również na udział białek G w indukowanym przez etylen starzeniu się kwiatów *Phalaenopsis* [96]. Częściowo oczyszczona frakcja białek zawierająca białka wiążące etylen wiąże również GTP. Ponadto liścienie traktowane etylenem wykazują wyższy poziom wiązania GTP przez białko o masie cząsteczkowej 23 kDa, które reaguje z przeciwciałami przeciwko białku Ras [73]. Podobne doświadczenia wykonane na *Arabidopsis* sugerują, że białka typu Ras mogą uczestniczyć w regulacji CTR analogicznie do regulacji kinaz Raf u zwierząt i drożdży [124].

## CYTOKININY

Cytokininy zostały odkryte dzięki ich zdolności do indukowania podziałów komórkowych, ale obecnie wiadomo, że wspólnie z innymi fitohormonami uczestniczą w regulacji i koordynacji wielu procesów fizjologicznych na różnych etapach wzrostu i rozwoju roślin [7,55,80]. Przez wiele lat badania cytokinin zmierzały do poznania



ich natury chemicznej, lokalizacji tkankowej oraz aktywności biologicznej. Dopiero w ostatnich latach rozpoczęto badania genetyczne mające na celu poznanie działania cytokinin na poziomie molekularnym [45,55].

Różnorodność odpowiedzi na cytokininy oraz ich współdziałanie z innymi fitohormonami w wywoływaniu pojedynczej odpowiedzi sprawia, że poznanie mechanizmu działania cytokinin nie jest łatwe. Już od dłuższego czasu wiadomo, że cytokininy regulują ekspresję genów [21,28,38,76,106]. Wyniki badań wskazują na to, że kontrola ekspresji genów zachodzi na poziomie transkrypcji, a także translacji, chociaż jak na razie szlak transdukcji sygnału hormonalnego jest nieznany. Przypuszcza się, że cytokininy podobnie jak inne roślinne regulatory wzrostu inicjują szlak transdukcji sygnału przez związanie ze specyficznym receptorem.

### Białka wiążące cytokininy

Poszukiwania białek wiążących cytokininy – CBP (*cytokinin-binding proteins*) rozpoczęto prawie 30 lat temu, kiedy po raz pierwszy zidentyfikowano „miejsca wiążące” cytokininy we frakcji rybosomalnej [5]. Od tego czasu obecność białek wiążących cytokininy stwierdzono u wielu gatunków roślin wyższych, a także u mchu *Funaria hygrometrica* [11,13,65,79]. Większość CBP są to rozpuszczalne białka izolowane z frakcji cytosolowej, chociaż stwierdzono także występowanie CBP we frakcji mikrosomalnej oraz frakcji błon tylakoidów [11]. W większości przypadków, białka te mają zdolność specyficznego wiązania cytokinin, a także charakteryzują się wysokim powinowactwem względem hormonu. Jednakże podobnie jak w przypadku innych fitohormonów nie udało się uchwycić związku między wiązaniem cytokinin przez CBP a efektami biochemicznymi bądź fizjologicznymi wywoływanymi przez hormon, a zatem nie dostarczono dowodów na to, że CBP pełnią funkcję receptorów.

### Mutanty ze zmienioną odpowiedzią na cytokininy

Badania mutantów, które zaowocowały sukcesem w poszukiwaniach receptora etylenu, są znacznie trudniejsze w przypadku cytokinin. Przyczyna tych trudności leży głównie w braku dostatecznej wiedzy z zakresu biochemii i fizjologii tych związków, a także złożoności efektów fizjologicznych [121]. W ostatnich latach nastąpił jednak i tutaj pewien postęp, który umożliwił wyselekcjonowanie mutantów ze zmienioną odpowiedzią na hormon [7,34,45,106,121].

Na podstawie zmian morfologicznych wyizolowano kilka recesywnych mutantów cytokininowych, które wykazują odpowiedzi związane z nadprodukcją cytokinin bądź brakiem wrażliwości na hormon. Wśród mutantów należących do pierwszej grupy najlepiej scharakteryzowanym jest karłowaty mutant *amp1 A. thaliana*, wy-

kazujący zredukowaną dominację wierzchołkową i wytwarzający w czasie kiełkowania zwiększoną liczbę liścieni i liści [20].

Do drugiej grupy należą mutanty, u których mutacja zmieniła wrażliwość na cytokininy. Mutanty *ckr* (*cytokinin-resistant*) *A. thaliana* i *Nicotiana plumbaginifolia* mają zmieniony system korzeniowy i wykazują zdolność kiełkowania w warunkach wyższego niż  $10^{-5}$  M stężenia cytokinin, uważanego za hamujące wzrost lub wręcz toksyczne dla roślin [10,113].

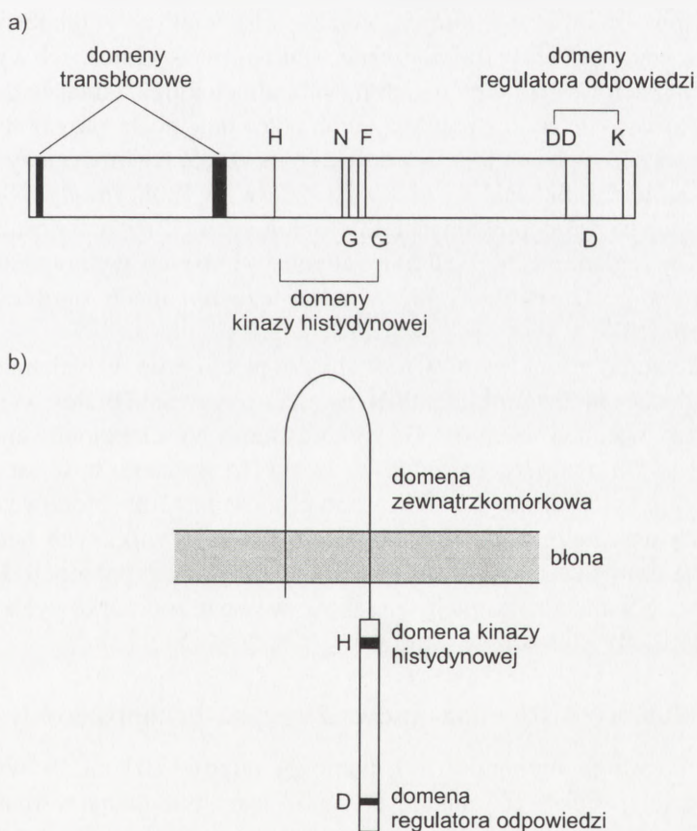
W przypadku *N. plumbaginifolia*, monogeniczne, recesywne mutanty, nazwane oryginalnie *ckr1*, wykazywały znaczny wzrost w środowisku zawierającym benzyloadeninę (syntetyczna cytokinina) w stężeniu 20  $\mu$ M. Ponadto stwierdzono, że rośliny *ckr1* mają znacznie obniżony poziom endogennego kwasu absycynowego (ABA), co przypuszczalnie jest spowodowane defektem w końcowym etapie szlaku biosyntezy ABA [92]. Nadal nie jest jasne, czy brak wrażliwości na cytokininy powoduje u tych mutantów defekt w szlaku biosyntezy ABA, czy też jest efektem wtórnym wywołanym przez zmiany w poziomie ABA.

Mutanty *A. thaliana* niewrażliwe na cytokininy izolowano na podstawie zmian w wyglądzie systemu korzeniowego. Zidentyfikowano pięć niezależnych recesywnych alleli nowego loci określonych jako *ckr1* oraz ustalono, że miejsce mutacji znajduje się w chromosomie 5. W dalszych badaniach okazało się, że mutanty *ckr* *A. thaliana* są niewrażliwe również na etylen [15]. Rośliny kiełkujące przy niskim stężeniu benzyloadeniny w ciemności, poza wytwarzaniem charakterystycznego systemu korzeniowego, wykazywały także typową dla etylenu „potrójną odpowiedź”. Uzyskane rezultaty wskazują na to, że *ckr1* jest prawdopodobnie alleliczny ze wspomnianym w poprzednim rozdziale niewrażliwym na etylen mutantem *ein2*. Wyniki te wskazują na związek między odpowiedzią roślin na cytokininy i etylen, a także są doskonałym przykładem złożoności funkcjonowania fitohormonów oraz trudności z ustaleniem odpowiedzi na pojedynczy hormon.

Zastosowanie technik genetyki molekularnej umożliwiło w ostatnim czasie uzyskanie nowej klasy mutantów o zmienionej odpowiedzi na cytokininy, określonych jako *cki* (*cytokinin-independent*) [52]. Kalusy pochodzące z hipokotyli kiełków *A. thaliana* transformowano aktywowanym przez „znakowanie” T-DNA (*T-DNA tagging*) z *Agrobacterium* i hodowano w nieobecności cytokinin. Wyselekcjonowano spośród nich pięć mutantów, które mimo braku tego fitohormonu w agarze, wykazywały typowe dla niego odpowiedzi, a więc ulegały szybkim podziałom komórkowym, wytwarzały kielki, miały zahamowany wzrost korzenia i były zielone. Mutanty oznaczone jako *cki1-1* do *4* nie wytwarzały korzeni ani normalnych kwiatów i były sterylne. Mutant *cki2* różnił się fenotypowo od wymienionych czterech mutantów, bowiem wytwarzał korzenie, normalne kwiaty i nasiona, a zdolność do wzrostu przy braku cytokinin była dziedziczna. Zidentyfikowany i wyizolowany gen *CKII* po włączeniu do kalusów typu dzikiego indukował odpowiedzi typowe dla cytokinin w nieobecności egzogennych cytokinin.

## Białko CKI1 homologiczne z ETR1 – receptorem cytokinin?

Sekwencja wyizolowanego cDNA mutanta *cki1* zawiera otwartą ramkę odczytu kodującą 1122 aminokwasy tworzące białko o masie cząsteczkowej 125 kDa (rys. 4). Sekwencja aminokwasowa CKI1 wykazuje znaczne podobieństwo do bakteryjnych dwuskładnikowych układów transdukcji sygnałów, bowiem podobnie jak i inne białka z rodziny kinaz histydynowo/asparaginianowych, ma dwa charakterystyczne regiony homologiczne z domeną „transmittera” oraz domeną „regulatora odpowiedzi” [52]. W obszarze N-końcowym występują dwie domeny transbłonowe, a między nimi znacznej długości fragment zewnątrzkomórkowy zawierający 11 potencjalnych miejsc dla N-glikozylacji. Katalityczna domena kinazy histydynowej, podobnie jak w innych układach dwuskładnikowych, zawiera pięć konserwatywnych sekwencji ASHDIRGAL, LKQILNNLVSNA, VDDTGKGIP, VFENY GTGLGL z miejscem fosforylacji His<sup>405</sup>, a domena „regulatora odpowiedzi” trzy homo-



RYSUNEK 4. Schemat budowy białka CKI1: a – zaznaczone są dwie domeny transbłonowe oraz domeny kinazy histydynowej i „regulatora odpowiedzi”; b – schemat ułożenia pętli zewnątrzkomórkowej w stosunku do hydrofobowych fragmentów transbłonowych i domen kinazy histydynowo/asparaginianowej (na podstawie danych [52])



logiczne sekwencje DD, **D**, K z miejscem fosforylacji Asp<sup>1050</sup>. Charakterystyczną cechą CKII jest stosunkowo długi (około 300 aminokwasów) odcinek zawarty między dwiema domenami transbłonowymi, mogący pełnić funkcję wiązania fitohormonu. Tak więc podobieństwo CKII do receptora etyleny ETR1 sugeruje, że CKII może być receptorem dla cytokinin. Sugestię tę może potwierdzać również fakt, że nadekspresja genu *CKII* indukuje reakcje typowe dla cytokinin. Efekt ten może być związany z reagowaniem transformowanych komórek na niski poziom endogennych cytokinin, przy którym w normalnych komórkach nie występują charakterystyczne zmiany fizjologiczne.

## BRASINOSTEROIDY

Brasinosteroidy (Br), roślinne substancje przypominające budową chemiczną hormony steroidowe, budzą w ostatnich latach coraz większe zainteresowanie. Obserwowane od wielu lat efekty fizjologiczne, a także powszechność ich występowania w różnych tkankach wskazywały na ich hormonalną naturę. Jednakże dopiero identyfikacja i sklonowanie genów regulowanych przez brasinosteroidy oraz znalezienie mutantów niewrażliwych i mutantów z defektem w szlaku ich biosyntezy przyczyniło się do powszechnego uznania tej grupy związków za fitohormony. Nazewnictwo, struktura chemiczna, występowanie, efekty fizjologiczne Br zostały ostatnio opisane w artykułach przeglądowych opublikowanych w polskich wydawnictwach i czasopismach monograficznych [3,48], a także czasopismach ogólnościatowych [2,26,27,37,103,127].

W odróżnieniu od fitohormonów pozostałych pięciu grup, w badaniach percepcji brasinosteroidów brak jest prób identyfikowania i izolowania białek wiążących hormon. W poszukiwaniach receptora Br wykorzystano wyselekcjonowane wcześniej mutanty *A. thaliana* o zmienionej odpowiedzi na Br. Badania te w ostatnim czasie doprowadziły do sklonowania genu, którego produkt jest transbłonową kinazą białkową pełniącą przypuszczalnie funkcję receptorową. Wyniki tych badań zdecydowanie zmieniają dotychczasową koncepcję dotyczącą percepcji Br, która w zasadzie nawiązywała do znanych u ssaków wewnątrzkomórkowych receptorów wiążących hormony steroidowe i hormony tarczycy [53,112].

### Mutanty *A. thaliana* niewrażliwe na brasinosteroidy

W identyfikowaniu mutantów o zmienionej odpowiedzi na Br wykorzystano poznane wcześniej efekty fizjologiczne, takie jak: stymulacja wzrostu wydłużeniowego pędu czy hamowanie wzrostu korzenia pierwotnego. Te ostatnie zmiany okazały się szczególnie przydatne w poszukiwaniach mutantu niewrażliwego na

Br [23,24,27]. Wyselekcjonowany mutant *bri1* (*brassinosteroidinsensitive*) wyróżnia się tym, że ma długie korzenie i bardzo krótki hipokotyl w warunkach, gdy roślina rośnie na pożywce zawierającej Br (24-epibrasinolid). Ten uderzająco odmienny fenotyp jest widoczny również u rośliny dojrzałej. Mutant jest krańcowo skarłowaciały, ma zgrubiałe ciemnozielone liście, wykazuje zredukowaną dominację wierzchołkową, jest męskosterylny, a ponadto rosnąc w ciemności wykazuje cechy rośliny deetiologowanej [24]. Mimo tak drastycznych zmian fenotypowych mutant *bri1* jest w pełni wrażliwy na działanie auksyn, cytokinin, etylenu, giberelin i kwasu abscysynowego. Przy krzyżowaniu z osobnikami dzikimi fenotyp *bri1* występuje w stosunku 1: 3, co świadczy o tym, że jest zdeterminowany przez pojedynczy recesywny allel. Położenie mutacji na chromosomie 4 różni mutant *bri1* od innych wcześniej poznanych mutantów o zmienionej wrażliwości na hormony. Tak więc mutant *bri1* nie jest alleliczny w stosunku do żadnego ze znanych wcześniej „skarłowatych” mutantów [24]. Mutantem fenotypowo bardzo podobnym i jak się okazało allelicznym w stosunku do *bri1* jest mutant *cbb2* (*cabbage 2*) [54]. U obu tych mutantów, żaden z plejotropowych defektów rozwojowych nie jest znoszony przez egzogennie podawany Br. Ta cecha odróżnia *cbb2* od pozostałych dwóch mutantów *cbb*, a mianowicie *cbb1* i *cbb3*, które w obecności egzogenego Br upodobniają się fenotypowo do roślin dzikich. Co ważniejsze, brasinosteroidy nie zmieniają ekspresji genów u mutant *cbb2*, natomiast indukują ekspresję genów *TCH4* i *meri5* u mutantów *cbb1* i *cbb3* [54]. Wyniki powyższe świadczą o tym, że mutacje typu *cbb1* i *cbb3* prowadzą raczej do nieokreślonych defektów w szlaku biosyntezy Br, natomiast nie zmieniają percepcji Br. W ostatnim czasie Li i Chory [70] zidentyfikowali 18 nowych niewrażliwych na Br, „skarłowatych” mutantów *bri1-101* do *-118*.

### Budowa i funkcja białka BRI1

Gen *BRI1* kodujący białko zbudowane z 1196 aminokwasów, o masie 130 kDa został sklonowany przez Li i Chory [70]. Komputerowe porównanie sekwencji *BRI1* z sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych wskazywało na podobieństwo *BRI1* z białkami zawierającymi powtórzenia bogate w leucynę LRR (*leucine-rich repeat*). Jak się jednak okazało, największy stopień identyczności łączy *BRI1* z niedawno poznanymi genami *ERECTA* [115] i *CLAVATA1* [22], należącymi do rodziny roślinnych receptorowych kinaz transbłonowych RLK (*receptor-like kinase*).

Na rysunku 5 pokazany jest schemat budowy białka *BRI1* z zaznaczonymi charakterystycznymi jego domenami. Położony na N-końcu hydrofobowy peptyd sygnałowy skierowuje nowo syntetyzowany polipeptyd do siateczki śródplazmatycznej. Za peptydem sygnałowym położony jest motyw „zamka leucynowego”, utworzony przez siedmioaminokwasowe sekwencje, które jak obecnie wiadomo, są zaangażowane w tworzenie form dimerycznych. Największą domenę zewnątrzko-

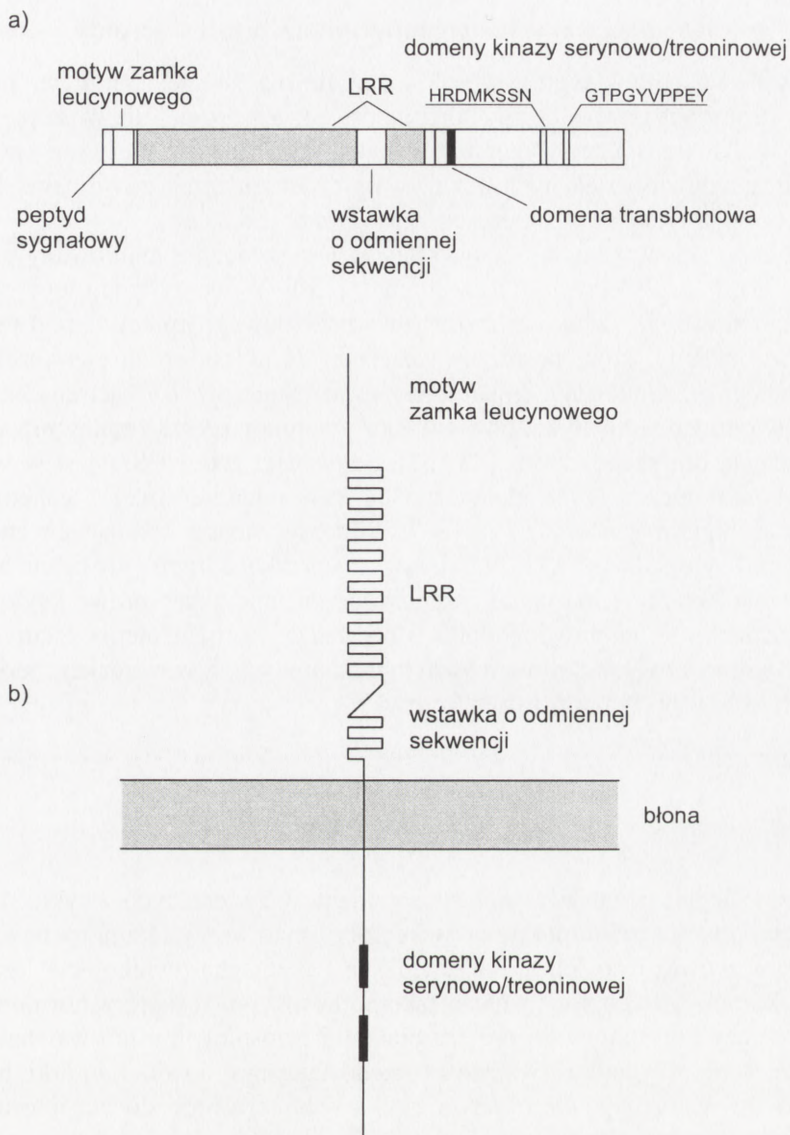
mórkową tworzy 25 powtórzeń 24-aminokwasowego fragmentu o charakterystycznej konserwatywnej sekwencji (F--F--L--L-LS-N-FSG-IP--) określanego jako powtórzenie bogate w leucynę. Między 21 a 22 powtórzeniem tej charakterystycznej sekwencji, domena LRR jest przerwana przez 70-aminokwasową „wstawkę” o odmiennej sekwencji. W tej części u jednego z mutantów (*bri1-113*) glicyna (pozycja 611) została zastąpiona przez kwas glutaminowy, co dowodzi znaczącej roli tego fragmentu w wiązaniu hormonu bądź w interakcji z innym składnikiem receptora Br. Oprócz domen zewnątrzkomórkowych BRI1 zawiera fragment transbłonowy zbudowany z 21 aminokwasów oraz wewnątrzcytoplazmatyczną domenę charakterystyczną dla kinaz białkowych. Domena ta obejmuje 12 konserwatywnych subdomen, w obrębie których położonych jest aż 15 aminokwasów w pozycjach konserwatywnych we wszystkich kinazach białkowych. Sekwencje HRDMKSSN w subdomenie VIB i GTPGYVPPEY w subdomenie VIII są wysoko konserwatywne we wszystkich kinazach serynowo/treoninowych [42]. Oprócz wspomnianego już allelu *bri1-113* wszystkie pozostałe zsekwencjonowane allele, mają zmienione sekwencje w domenie kinazowej. Zmiany te występują w obrębie 50-aminokwasowego fragmentu (od pozycji 1031 do 1080).

Zmiany fenotypowe towarzyszące mutacji *bri1*, a także znacząca homologia białka BRI1 z szeregiem receptorowych kinaz białkowych, mogą sugerować, że białko BRI1 jest rzeczywiście początkowym ogniwem w szlaku transdukcji sygnału Br [32]. Obecnie uważa się, że ligandami dla receptorów zawierających domenę LRR są krótkie peptydy bądź glikoproteiny [63]. Można więc założyć, że Br wiązane są przez specjalne białka wiążące, a dopiero taki kompleks rozpoznawany jest przez domenę LRR receptora BRI1. Koncepcja ta wydaje się bardzo prawdopodobna zważywszy na fakt, że genom *A. thaliana* zawiera sekwencje homologiczne ze zwierzęcymi białkami wiążącymi steroidy SHBG (*sex hormone binding globulin*) [82]. Zidentyfikowanie takich białek w roślinach byłoby kolejnym niezwykle ważnym krokiem w poznawaniu mechanizmu percepcji Br.

W rozważaniach potencjalnych mechanizmów percepcji Br nie można też wykluczyć możliwości, że to sama domena LRR bezpośrednio wiąże Br bądź że miejsce wiążące położone jest w 70-aminokwasowej „wstawce”. Ta ostatnia możliwość jest prawdopodobna o tyle, że w tej części znajduje się miejsce mutacji w allelu *bri1-113*.

Przy braku ostatecznej odpowiedzi na pytanie, czy BRI1 jest białkiem receptorowym wiążącym Br, czy tylko transbłonową kinazą wchodzącą w interakcję z białkiem wiążącym Br, można jedynie oczekiwać, że rozstrzygnięcie przyniosą wyniki badań prowadzonych na zrekombinowanym białku BRI1 izolowanym na większą skalę z bakterii lub drożdży transformowanych genem *BRI1*.





RYSUNEK 5. Schemat budowy transbłonowej kinazy serynowo/treoninowej BRI1; a – zaznaczone są domeny zamka leucynowego, 25 powtórzeń fragmentu bogatego w leucynę przedzielonych krótkim fragmentem o odmiennej sekwencji, domeny transbłonowej i domen kinazy serynowo/treoninowej; b – topologiczny model receptora BRI1 obrazujący położenie zewnątrzkomórkowej domeny zawierającej powtórzenia bogate w leucynę (LRR), krótkiego fragmentu o odmiennej sekwencji, hydrofobowego fragmentu transbłonowego i domen kinazy serynowo/treoninowej (na podstawie danych [70])



## Regulacja ekspresji genów przez brasinosteroidy

Identyfikacja genów regulowanych przez Br ma istotne znaczenie, ponieważ z jednej strony potwierdza hormonalną naturę Br, a z drugiej ułatwi w przyszłości badania szlaku transdukcji sygnału wewnątrz komórki. Już pierwsze badania na początku lat dziewięćdziesiątych wskazywały, że Br zmieniają poziom transkryptów mRNA w epikotylach soi i kiełkach *A. thaliana* [23,25,26].

Pierwszym sklonowanym genem, który jest specyficznie regulowany przez Br, jest gen *BRU1* (*brassinosteroid upregulated*) [130]. W identyfikacji tego genu wykorzystano zmiany w szybkości wzrostu wydłużeniowego epikotyła pod wpływem Br, a więc zmiany, które posłużyły wcześniej do sklonowania pierwszego genu regulowanego przez auksyny. Zmiany fenotypowe w obu przypadkach charakteryzują się jednak odmienną kinetyką, bowiem Br wywołują większe zmiany niż auksyny, ale wymagają dłuższego czasu [23,131]. Sekwencja genu *BRU1* jest w wysokim stopniu homologiczna (77% identyczności, 89% podobieństwa) z genem *meri-5* [78] i z szeregiem genów *XET* (48–74% identyczności) kodujących endotransglikozylazę ksyloglukanową [1,29,88]. Enzym ten odcina fragmenty łańcucha ksyloglukanowego, które są następnie przenoszone na inne akceptorowe ksyloglukany [36,84]. Zmiany te najprawdopodobniej prowadzą do rozluźnienia ściany komórkowej i syntezy nowych polimerów ksyloglukanowych, a więc reakcji, które przyspieszają wzrost komórki.

## UWAGI KOŃCOWE

Znacznie lepiej poznane receptory organizmów zwierzęcych zwykle dzieli się na błonowe i wewnątrzkomórkowe. Receptory błonowe występują na powierzchni błony komórkowej i do ich aktywacji nie jest wymagane wniknięcie liganda do wnętrza komórki. Receptory wewnątrzkomórkowe, np. receptory hormonów steroidowych czy hormonów tarczycy są białkami cytosolowymi lub wewnątrzjądrowymi. W tym przypadku związanie przedostającego się do komórki hormonu prowadzi do wzrostu powinowactwa białka receptorowego do akceptora występującego w obrębie chromatyny jądrowej i w efekcie do ekspresji genów specyficznych białek związanych z odpowiedzią komórki na hormon.

Receptory błonowe wiążące różne ligandy na powierzchni komórki można podzielić na trzy klasy. Receptory pierwszej klasy (receptory jonotropowe) funkcjonują jako kanały jonowe zamieniające informację niesioną przez hormon na zmiany w przepływie przez błonę określonych jonów. Do tej grupy można zaliczyć również kanały napięciowe, które reagują zmianami przepuszczalności na zmiany potencjału w najbliższym otoczeniu receptora. Druga klasa receptorów funkcjonuje w ramach trójściłkowego układu transdukcji przekazując odebrany sygnał przez białka

G na specyficzne układy enzymów bądź kanałów jonowych, co w efekcie prowadzi do zmiany stężenia wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników (cAMP, cGMP,  $Ca^{+2}$ , metabolity fosfolipidów). Trzecią klasę receptorów stanowią białka transbłonowe, które po stronie zewnątrzkomórkowej mają domenę wiążącą ligand, natomiast po stronie wewnątrzkomórkowej domenę enzymatyczną kinaz białkowych. Związanie liganda przez domenę receptorową, której towarzyszy często oligomeryzacja białek receptorowych, moduluje aktywność kinazy białkowej, a pośrednio innych wewnątrzkomórkowych enzymów.

Przedstawione w pracy białka receptorowe etylenu, cytokinin i brasinosteroidów należą do klasy transbłonowych kinaz białkowych. Najwięcej uwagi poświęcono omówieniu receptorowych kinaz białkowych uczestniczących w percepcji etylenu u rzodkiewnika i pomidora, które są jedynymi dotychczas dobrze scharakteryzowanymi receptorami hormonów roślinnych. Osobliwością tych kinaz białkowych jest fakt, że zarówno budową, jak też sposobem działania nawiązują do bakteryjnego i drożdżowego dwuskładnikowego układu transdukcji sygnału. W białkach ETR1 i eTAE1, a także w CKII – hipotetycznym receptorze cytokinin, domeny „transmittera” i „receivera” położone są w obrębie tego samego białka. Taka budowa dwuskładnikowego układu transdukcji u bakterii jest raczej rzadkością, bowiem znacznie częściej „sensor”, w którego obrębie położona jest domena „transmittera” i „receiver” utworzone są przez dwa oddzielne białka. W kontekście tych różnic rodzi się pytanie o to, czy białka ERS i TXTR-14 mają oddzielne, swoiste „regulatory odpowiedzi”, analogiczne do układów bakteryjnych i drożdżowych. Nie wiadomo również czy domeny „transmittera” i „regulatora odpowiedzi” roślinnych receptorów wykazują, podobnie jak u bakterii, aktywność fosfataz białkowych [91].

Białko BRI1 będące przypuszczalnie receptorem brasinosteroidów należy do rodziny roślinnych transbłonowych kinaz serynowo/treoninowych. W tej grupie obok kinaz, takich jak: ERECTA, CLAVATA1, TMK1, RLK5 [12,22,115,120], których funkcja jest jeszcze nieznana, mieszczą się również kinazy, których właściwości i funkcja zostały już częściowo zbadane. Należy tu przede wszystkim wymienić rodzinę kinaz SRK uczestniczących w mechanizmie samoniegodności sporofitycznej. Szczegółowe omówienie budowy i funkcji tych kinaz zainteresowany Czytelnik może znaleźć w pracy przeglądowej opublikowanej w *Postęпах Biologii Komórki* [64].

Dzisiaj już wiadomo, że wszystkie fitohormony uczestniczą w regulacji ekspresji genów. Ponadto szereg obserwacji świadczy o bardzo precyzyjnym sposobie tej regulacji. Stało się więc jasne, że między percepcją sygnału a ostatecznym efektem fizjologicznym sygnał musi ulec odpowiedniemu przetworzeniu i wzmocnieniu w mniej lub bardziej skomplikowanym układzie transdukcji. Nasza wiedza na temat szlaków transdukcji sygnałów hormonów roślinnych, zwłaszcza w skomplikowanych odpowiedziach fizjologicznych, jest nadal bardzo ograniczona. W ostatnich latach coraz więcej faktów przemawia za tym, że podobnie jak u zwierząt, w transmisji

i wzmocnieniu sygnałów wewnątrzkomórkowych uczestniczy kaskada kinaz MAP. Aktywacja kinazy MAP odbywa się przez fosforylację reszt treoniny i tyrozyny katalizowanej przez kinazę kinazy MAP o podwójnej specyficzności, ta zaś jest aktywowana w wyniku ufosforylowania reszty seryny. Obecnie wiadomo już, że genom *A.thaliana* zawiera co najmniej 9 genów kodujących różne kinazy MAP [44]. Dotychczas stosunkowo dobrze poznanym szlakiem transmisji sygnału obejmującym kaskadę kinaz MAP jest szlak prowadzący do uruchomienia mechanizmów obronnych skierowanych przeciwko patogenom. Odkrycie kinazy CTR1 homologicznej z kinazami Raf dowodzi, że ten szlak transdukcji zaangażowany jest również w przekazywanie sygnałów hormonalnych.

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach prowadzą do wniosku, że w roślinach funkcjonuje więcej niż jeden mechanizm działania fitohormonów. Wydaje się niemal pewne, że oprócz receptorowych kinaz białkowych, w percepcji sygnałów hormonalnych uczestniczą białka współdziałające z białkami G. Dotychczas sklonowano z *A. thaliana*, pomidora i kukurydzy szereg genów kodujących białka homologiczne z podjednostką  $\alpha$  białka G. Podjednostka  $G\alpha$  zawiera wszystkie konserwatywne regiony charakterystyczne dla białek G drożdży i ssaków [75]. Ponadto, do niedawna tylko pośrednie dane wskazujące na obecność w roślinach receptorów z 7 domenami transbłonowymi uzyskały ostatnio bezpośrednie potwierdzenie [51,122]. Można więc oczekiwać, że dzięki technikom genetyki molekularnej rozumienie mechanizmów percepcji i transdukcji sygnałów hormonalnych w roślinach ulegnie w najbliższych latach zdecydowanemu pogłębieniu.

## LITERATURA

- [1]ARROWSMITH DA, DE SILVA J. Characterization of two tomato fruit-expressed cDNA encoding xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 391–403.
- [2]ARTECA RN. Brassinosteroids. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1995: 206–213.
- [3]BAJGUZ A, CZERPAK R. Biosynteza i przemiany metaboliczne brassinosteroidów. *Kosmos* 1997;**46**: 259–268.
- [4]BENT AF, INNES R, ECKER J, STASKAWICZ B. Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 1992; **5**:372–378.
- [5]BERRIDGE MV, RALPH RK. The binding of kinetin to plant ribosomes. *Biochem J* 1970; **119**: 75–84.
- [6]BERRY AW, COWAN DSC, HARPAM NVJ, HEMSLEY RJ, NOVIKOVA GV, SMITH AR, HALL MA. Studies on the possible role of protein phosphorylation in the transduction of the ethylene signal. *Plant Growth Regul* 1996; **18**: 135–141.
- [7]BINNS AN. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic, and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **45**: 173–196.
- [8]BLEECKER AB, ESTELLE MA, SOMERVILLE C, KENDE H. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 1988; **241**:1086–1089.



- [9]BLEECKER AB, SCHALLER GE. The mechanism of ethylene perception. *Plant Physiol* 1996; **111**: 653–660.
- [10]BLONSTEIN AD, PARRY AD, HORGAN R, KING PJ. A cytokinin-resistant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* is wilty. *Planta* 1991; **183**: 244–250.
- [11]BRAULT M, MALDINEY R, MIGINIAC E. Cytokinin-binding proteins. *Physiol Plantarum* 1997; **100**: 520–527.
- [12]BRAUN DM, WALKER JC. Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 70–73.
- [13]BRINEGAR C. Cytokinin binding proteins and receptors. [w] Mok DWS, Mok MC [red.] Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor 1994: 217–232.
- [14]BUTTNER M., SINGH KB. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5961–5966.
- [15]CARY AJ, LIU W, HOWELL SH. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol* 1995; **107**: 1075–1082.
- [16]CHANG C, KWOK SF, BLEECKER AB, MEYEROWITZ EM. *Arabidopsis* ethylene-responsive gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 1993; **262**: 539–544.
- [17]CHANG C, MEYEROWITZ EM. The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: A eukaryotic two-component signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4129–4133.
- [18]CHANG C. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 129–133.
- [19]CHAO Q, ROTHENBERG M., SOLANO R, ROMAN G, TERZAGHI W, ECKER JR. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 1997; **89**: 1133–1144.
- [20]CHAUDCHURY AM, LETHAM S, CRAIG S, DENNIS ES. *Amp1* – a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J* 1993; **4**: 907–916.
- [21]CHEN C-M, JIN G, ANDERSEN BR, ERTL JR. Modulation of plant gene expression by cytokinins. *Aust J Plant Physiol* 1993; **20**: 609–619.
- [22]CLARK SE, WILLIAMS RW, MEYEROWITZ EM. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 1997; **89**: 575–585.
- [23]CLOUSE SD, LANGFORD M., HALL AF, MCMORRIS TC, BAKER ME. Physiological and molecular effects of brassinosteroid on *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Growth Regul* 1993; **12**: 61–66.
- [24]CLOUSE SD, LANGFORD M., MCMORRIS TC. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 1996; **111**: 671–678.
- [25]CLOUSE SD, ZUREK DM, MCMORRIS TC, BAKER ME. Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1377–1383.
- [26]CLOUSE SD. Molecular genetic analysis of brassinosteroid action. *Physiol Plant* 1997; **100**: 702–709.
- [27]CLOUSE SD. Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant J* 1996; **10**: 1–8.
- [28]CROWELL DN, AMASINO RM. Cytokinins and plant gene regulation. [w] Mok DWS, Mok MC [red.] Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor 1994: 233–242.
- [29]DE SILVA J, JARMAN CD., ARROWSMITH DA, STRONACH MS, CHENGAPPA S, SIDEBOTTOM C, REID JS. Molecular characterization of a xyloglucan-specific *endo*-(1,4)-

- $\beta$ -D-glucanase (xyloglucan *endo*-transglycosylase) from nasturtium seeds. *Plant J* 1993; **3**: 701–711.
- [30]DEIKMAN J. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plant* 1997; **100**: 561–566.
- [31]DOLAN L. The role of ethylene in the development of plant form. *J Exp Bot* 1997; **48**: 201–210.
- [32]ECKER JR BRI-ghtening the pathway to steroid hormone signaling events in plants. *Cell* 1997; **90**: 825–827.
- [33]ECKER JR. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 1995; **268**: 667–675.
- [34]FAISS M, ZALUBILOVÁ J, STRNAD M, SCHMÜLLING T. Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinin in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J* 1997; **12**: 401–415.
- [35]FLUHR R, MATTOO AK. Ethylene-biosynthesis and perception. *Crit Rev Plant Sci* 1996; **15**: 479–523.
- [36]FRY SC, SMITH RC, RENWICK KF, MARTIN DJ, HODGE SK, MATTHEWS KJ. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem J* 1992; **282**: 821–828.
- [37]FUJIOKA S, SAKURAI A. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol Plant* 1997; **100**: 710–715.
- [38]GAUDINO RJ, PIKAARD CS. Cytokinin induction of RNA polymerase I transcription in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6799–6804.
- [39]GILLES-GONZALEZ MA, GONZALES G. Regulation of the kinase activity of heme protein FixL from the two-component system FixL/FixJ of *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16293–16297.
- [40]GUZMAN P., ECKER JR. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 1990; **2**: 513–523.
- [41]HALL MA, SMITH AR. Transduction of ethylene responses. [w] Aducci P. [red.] Signal Transduction in Plants. Birkhauser Verlag Basel/Switzerland 1997: 65–81.
- [42]HANKS SK, QUINN AM. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Meth Enzymol* 1991; **200**: 38–62.
- [43]HARPHAM NVJ, BERRY AW, HOLLAND MG, MOSHKOV IE, SMITH AR, HALL MA. Ethylene binding sites in higher plants. *Plant Growth Regul* 1996; **18**: 71–77.
- [44]HIRT H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 11–15.
- [45]HOBBIE L, TIMPTE C, ESTELLE M. Molecular genetics of auxin and cytokinin. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1499–1519.
- [46]HUA J, CHANG C, SUN Q, MEYEROWITZ EM. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* *ERS* gene. *Science* 1995; **269**: 1712–1714.
- [47]JAKUBOWICZ M. Etylen-jego udział w regulacji dojrzewania owoców i starzenia się kwiatów. Aspekty biotechnologiczne. *Post Biochem* 1996; **42**: 65–72.
- [48]JANKIEWICZ LS. Brasinosteroidy i związki pokrewne. [w] Jankiewicz LS [red.] Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 72–82.
- [49]JOHN P. Ethylene biosynthesis: the role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiol Plant* 1997; **100**: 583–592.
- [50]JONAK C, HEBERLE-BORS E, HIRT H. MAP kinases: universal multi-purpose signaling tools. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 407–416.
- [51]JOSEFSSON L-G, RASK L. Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 1997; **249**: 415–420.
- [52]KAKIMOTO T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 1996; **274**: 982–985.

- [53]KATZENELLENBOGEN JA, KATZENELLENBOGEN BS. Nuclear hormone receptor: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chemistry Biology* 1996; **3**: 529–536.
- [54]KAUSCHMANN A, JESSOP A, KONCZ C, SZEKERES M., WILLMITZER L, ALTMANN T. Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. *Plant J* 1996; **9**: 701–713.
- [55]KENDE H, ZEEVAART JAD. The five „classical” plant hormones. *Plant Cell* 1997; **9**: 1197–1210.
- [56]KENDE H. Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 283–307.
- [57]KIEBER JJ, ECKER JR. Ethylene gas: it’s not just for ripening anymore. *Trends Genet* 1993; **9**: 356–362.
- [58]KIEBER JJ, ROTHENBERG M., ROMAN G, FELDMANN KA, ECKER JR. *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 1993;**72**: 427–441.
- [59]KIEBER JJ. The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 277–296.
- [60]KIEBER JJ. The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 1997; **48**: 211–218.
- [61]KIM JH, KIM WT, KANG BG, YANG SF. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylase oxidase mRNA by ethylene in mung bean hypocotyls: involvement of both protein phosphorylation and dephosphorylation in ethylene signaling. *Plant J* 1997 ;**11**: 399–405.
- [62]KLAMBT D. Plant hormone receptors from binding proteins to functional units. [w] Smith AR, Berry AW, Harpham NVJ, Moshkov IE, Novikova GV, Kulaeva ON, Hall MA. [red.] Plant hormone signal perception and transduction. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London. 1996; 37–39.
- [63]KOBÉ B, DEISENHOFER J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 415–421.
- [64]KRZYWNICKA E, KOWALCZYK S. Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegające samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 75–98.
- [65]KULAEVA ON, KARAVAIKONN, SELIVANKINASY, MOSHKOV IE, NOVIKOVA GV, ZEMLYACHENKO YV, SHIPILOVA SV, ORUDGEV EM. Cytokinin signalling systems. [w] Smith AR [red.] Plant Hormone Signal Perception and Transduction. Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1996: 57–65.
- [66]KWAK S-H, LEE SH. The requirements for  $Ca^{2+}$ , protein phosphorylation, and dephosphorylation for ethylene signal transduction in *Pisum sativum* L. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 1142–1149.
- [67]KYRIAKIS JM, APPH, ZHANG X, BANERJEE P., BRAUTIGAN DL, RAPPUR, AVRUCH J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992; **358**: 417–[68]LANAHAN MB, YEN H-C, GIOVANNONI JJ, KLEE HJ. The *never ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 1994; **6**: 521–530.
- [69]LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos*. 1995; **44**: 601–622.
- [70]LI J, CHORY J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 1997; **90**: 929–938.
- [71]LIBBENGA KR, MENNES AM. Hormone binding and signal transduction. [w] Davies PJ [red.] Plant hormones Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London 1995; 272–297.
- [72]LINDBERGRA, QUINN AM, HUNTER T. Dual-specificity protein kinase: will any hydroxyl do? *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 114–119.



- [73]LOW A, FAULHANMER HG, SPRINZL M. Affinity labeling of GTP-binding proteins in cellular extracts. *FEBS Lett* 1992; **303**: 64–68.
- [74]LYNCH J, BROWN KM. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiol Plant* 1997; **100**: 613–619.
- [75]MA H. GTP-binding proteins in plant: new member of an old family. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1611–1636.
- [76]MCDANIEL KL, LIGHTFOOT DA. Accumulation of a gene specific mRNA in response to cytokinin treatment of leaves in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 1997; **35**: 373–380.
- [77]MCKEON TA, FERNANDEZ-MACULET JC, YANG S-F. Biosynthesis and metabolism of ethylene. [w] Davies PJ [red.] Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London 1995: 118–139.
- [78]MEDFORD JI, ELMER JS, KLEE HJ. Molecular cloning and characterization of genes expressed in shoot apical meristems. *Plant Cell* 1991; **3**: 359–370.
- [79]MITSUIS, WAKASUGIT, SUGIURA M. A cytokinin-binding protein complex from tobacco leaves. Smith AR [red.] Plant Hormone Signal Perception and Transduction. Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1996: 77–81.
- [80]MOOK MC. Cytokinins and plant development – an overview. [w] Mok DWS, Mok MC [red.] Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor 1994: 155–166.
- [81]MORGAN PW, DREW MC. Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* 1997; **100**: 620–630.
- [82]NAKHLA AM, ROMAS NA, ROSNER W. Estradiol activates the prostate androgen receptor and prostate-specific antigen secretion through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6838–6841.
- [83]NAPIER RM, VENIS MA. Receptors for plant growth regulators: recent advances. *J Plant Growth Regul* 1990; **9**: 113–126.
- [84]NISHITANI K, TOMINAGA R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J Biol Chem* 1992; **267**: 21058–21064.
- [85]NOVIKOVA GV, MOSHKOV IE, SMITH AR, HALL MA. Ethylene and phosphorylation of pea epicotyl proteins. [w] Pech JC, Latche A, Balague [red.] Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Kluwer Academic Publishers, London, 1993: 371–372.
- [86]ODONNELL PJ, CALVERT C, ATZORN R, WASTERNAK C, LEYSER HMO, BOWLES DJ. Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 1996; **274**: 1914–1917.
- [87]OHME-TAKAGI M., SHINSI H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 1995; **7**: 173–182.
- [88]OKAZAWA K, SATO Y, NAKAGAWA T, ASADA K, KATO I, TOMITA E, NISHITANI K. Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J Biol Chem* 1993; **268**: 25364–25368.
- [89]PALME K. From binding proteins to hormone receptor? *J Plant Growth Regul* 1993; **12**: 171–178.
- [90]PALME K. Receptor-like proteins of higher plants. [w] Smith AR, Berry AW, Harpham NVJ, Moshkov IE, Novikova GV, Kulaeva ON, Hall MA [red.] Plant hormone signal perception and transduction. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London 1996: 239–246.
- [91]PARKINSON JS. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 1993; **73**: 857–871.
- [92]PARRY AD, BLONSTEIN AD, BABIANO MJ, KING PJ, HORGAN R. Abscisic-acid metabolism in a wilted mutant of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 1991; **183**: 237–243.
- [93]PAYTON S, FRAY RG, BROWN S, GRIERSON D. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol Biol* 1996; **31**: 1227–1231.



- [94]PELECH SL, SANGHERA JS. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* 1992; **17**: 233–238.
- [95]PLICH H. Etylen.[w] Jankiewicz LS [red.] Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1997: 124–149.
- [96]PORAT R, BOROCHOV A, HALEVY AH. Pollination-induced senescence in phalaenopsis petals. Relationship of ethylene sensitivity to the activity of GTP-binding proteins and protein phosphorylation. *Physiol Plant* 1994; **90**: 679–684.
- [97]POSAS F, WURGLER-MURPHY SM, MAEDA T, WITTEN EA, THAITC, SAITO H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 two-component osmosensor. *Cell* 1996; **86**: 865–875.
- [98]RAZ V, FLUHR R. Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 523–530.
- [99]ROMAN G, LUBARSKY B, KIEBER JJ, ROTHENBERG M., ECKER JR. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: Five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* 1995; **139**: 1393–1409.
- [100]SANDERS IO, HARPHAM NVJ, RASKIN I, SMITH AR, HALL MA. Ethylene binding in wild type and mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Annals Botany* 1991; **68**: 97–103.
- [101]SANDERS IO, ISHIZAWA K, SMITH AR, HALL MA. Ethylene binding and action in rice seedlings. *Plant Cell Physiol* 1990; **31**: 1091–1099.
- [102]SANDERS IO, SMITH AR, HALL MA. Ethylene binding in epicotyls of *Pisum sativum* L. cv. Alaska. *Planta* 1991; **183**: 209–217.
- [103]SASSE JM. Recent progress in brassinosteroid research. *Physiol Plant* 1997; **100**: 696–701.
- [104]SCHALLER GE, BLEECKER AB. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science* 1995; **270**: 1809–1811.
- [105]SCHALLER GE, LADD AN, LANAHAN MB, SPANBAUER JM, BLEECKER AB. The ethylene response mediator ETR1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *J Biol Chem* 1995; **270**: 12526–12530.
- [106]SCHMÜLLING T, SCHÄFER S, ROMANOV G. Cytokinins as regulators of gene expression. *Physiol Plant* 1997; **100**: 505–519.
- [107]SESSA G, RAZ V, SAVALDIS, FLUHR R. PK12, a plant dual-specificity protein kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene. *Plant Cell* 1996; **8**: 2223–2234.
- [108]SHIBAOKA H. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the crosslinking between microtubules and the plasma membrane. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1994; **44**: 527–544.
- [109]SISLER EC, SEREK M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol Plant* 1997; **100**: 577–582.
- [110]SISLER EC. Ethylene-binding component in plants [w] Mattoo AK, Suttle JC [red.] The Plant Hormone Ethylene. Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London: CRC Press 1991: 82–99.
- [111]SMALLE J, VAN DER STRAETEN D. Ethylene and vegetative development. *Physiol Plant* 1997; **100**: 593–605.
- [112]SOKÓŁ-MISIAK W. Receptory jądrowe. [w] Nowak JZ, Zawilska JB [red.] Receptory, struktura, charakterystyka, funkcja. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 335–356.
- [113]SU W, HOWELL SH. A single genetic locus, *Ckr1*, defines *Arabidopsis* mutants in which root growth is resistant to low concentrations of cytokinin. *Plant Physiol* 1992; **99**: 1569–1574.
- [114]TANIMOTO M., ROBERTS K, DOLAN L. Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1995; **8**: 943–948.
- [115]TORII KU, MITSUKAWA N, OOSUMI T, MATSUURA Y, YOKOYAMA R, WHITTIER RF, KOMEDA Y. The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 1996; **8**: 735–746.
- [116]TREISMAN R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 1996; **8**: 205–215.

- [117] TREWAVAS AJ, JONES AM. Consequences of hormone-binding studies for plant growth substances. *Whats New in Plant Physiol* 1981; **12**: 5–7.
- [118] TREWAVAS AJ, MALHOR. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* 1997; **9**: 1181–1195.
- [119] VERHEY SD, LOMAX TL. Signal transduction in vascular plants. *J Plant Growth Regul* 1993; **12**: 179–195.
- [120] WALKER JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1599–1609.
- [121] WANG TL. Cytokinins mutants. [w] Mok DWS, Mok MC [red]. Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. London, Tokyo: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor 1994: 255–268.
- [122] WHITE IR, WISE A, MILLNER PA. Evidence for G-protein-linked receptors in higher plants: stimulation of GTP--S binding to membrane fractions by the mastoparan analogue mas7. *Planta* 1993; **191**: 285–288.
- [123] WILKINSON JQ, LANAHAN MB, YEN H-C, GIOVANNONI JJ, KLEE HJ. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* 1995; **270**: 1807–1809.
- [124] WITTINGHOFFER A, NASSAR N. How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 488–491.
- [125] WURGLER-MURPHY SM, SAITO H. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 172–176.
- [126] YEN H-C, LEE S, TANKSLEY SD, LANAHAN MB, KLEE HJ, GIOVANNONI JJ. The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* gene. *Plant Physiol* 1995; **107**: 1343–1353.
- [127] YOKOTA T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 137–143.
- [128] ZAREMBINSKI TI, THEOLOGIS A. Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1579–1597.
- [129] ZHOU D, KALAITZIS P., MATTOO AK, TUCKER ML. The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol Biol* 1996; **30**: 1331–1338.
- [130] ZUREK DM, CLOUSE SD. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol* 1994; **104**: 161–170.
- [131] ZUREK DM, RAYLE DL, MCMORRIS TC, CLOUSE SD. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiol* 1994; **104**: 505–513.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska.

Otrzymano: 12.05.1998 r.

Przyjęto: 29.05.1998 r.

Adres autora: 87-100 Toruń, ul. Gagarina 9

## REGULACJA RUCHU RZĘSEK I WICI W KOMÓRKACH EUKARIOTYCZNYCH PRZEZ WAPŃ I CYKLICZNE NUKLEOTYDY\*

CALCIUM AND CYCLIC NUCLEOTIDES CONTROL OF CILIARY  
AND FLAGELLAR ACTIVITY IN EUKARYOTIC CELLS

Hanna FABCZAK, Mirosława WALERCZYK, Stanisław FABCZAK

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

*Streszczenie:* Regulacja aktywności ruchowej rzęsek i wici jest interesującym przykładem mechanizmu przekazywania sygnałów w komórkach eukariotycznych. Bodźce występujące w środowisku odbierane są przez błonowe receptory tych komórek i przetwarzane na sygnał wewnątrzkomórkowy, wpływają na kierunek i częstotliwość efektywnego uderzenia rzęski lub formę ruchu wici. Czynniki wewnątrzkomórkowymi pośredniczącymi pomiędzy błonowymi receptorami a aksonemą i regulującymi bezpośrednio aktywność ruchową rzęsek i wici są wtórne przekaźniki, jony wapnia i cykliczne nukleotydy. Zasadniczą rolę w kontrolowaniu mechanizmów regulujących parametry ruchu rzęsek i wici odgrywają zależne od jonów wapnia i kalmoduliny procesy fosforylacji i defosforylacji poszczególnych białek wchodzących w skład aksonemy. Jony wapnia są również odpowiedzialne za aktywność enzymów syntetyzujących w komórce cykliczne nukleotydy, cAMP i cGMP. Nukleotydy te z kolei przez zmianę stopnia aktywności odpowiednich kinaz i fosfataz białkowych zmieniają stopień ufosforylowania poszczególnych białek aksonemy. Ponadto zmiany poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia i cyklicznych nukleotydów mogą modulować jonowe przewodnictwo pobudliwej błony komórkowej wpływając na komórkowy potencjał błonowy.

*Słowa kluczowe:* aksonema, wić, rzęska,  $\text{Ca}^{2+}$ , cGMP, cAMP, kanały jonowe, kinazy białkowe, kalmodulina

*Summary:* The ciliary and flagellar locomotor systems are interesting examples of mechanisms which are controlled by signal transduction pathways in eukaryotic cells. Different environmental stimuli are translated across the cell membrane to generate intracellular signals that elicit changes in axoneme activity, direction and frequency of effective ciliary beating or pattern of flagellar motion. The axoneme and plasma membrane in these cells are tightly coupled and are communicating with each other by means

\*Praca finansowana z grantu KBN nr 6PO4C08612 oraz badań własnych.



of second messengers such as calcium ions or cyclic nucleotides. The primary role in these second messenger regulatory mechanisms of ciliary and flagellar movement is played by phosphorylation and dephosphorylation of axonemal proteins. Calcium ions may regulate also the level of cyclic AMP and GMP by controlling the activity of cyclases for cAMP and cGMP. In addition, Ca ions and cyclic nucleotides may regulate the ion channel conductances in the excitable cells, thus affecting the cell membrane potential.

*Key words:* axoneme, cilium, flagellum,  $\text{Ca}^{2+}$ , cGMP, cAMP, ion channels, protein kinases, calmodulin.

## WPROWADZENIE

W komórkach eukariotycznych obok systemu aktyno-miozynowego drugim odpowiedzialnym za generowanie siły umożliwiającej poruszanie się komórek jest system mikrotubularny. Mikrotubule wraz z wieloma białkami regulatorowymi tworzą aksonemę, szkielet rzęsek i wici. Za pomocą tych organelli poruszają się pierwotniaki, glony, plemniki, larwy niektórych bezkręgowców, a także transportowane są jaja wzdłuż jajowodów czy śluz w przewodach układu oddechowego.

Mikrotubule budujące aksonemę, ułożone według konserwatywnego schematu  $9 \times 2+2$  otacza błona, która jest kontynuacją błony komórkowej. Do dziewięciu zewnętrznych dubletów przyłączone jest zewnętrzne i wewnętrzne ramię dyneiny, białka motorycznego o właściwościach  $\text{Mg}^{2+}$  ATP-azy. Mikrotubule zewnętrzne łączą się między sobą wiązaniami neksynowymi, a z mikrotubulami pary centralnej połączone są za pomocą szczelbi promienistych [13, 14, 27, 28, 35].

U podstaw mechano-chemicznego mechanizmu ruchu rzęsek i wici leży generowany przez dyneinę, kosztem energii powstałej z hydrolizy ATP, ślizg mikrotubul względem siebie [17, 45]. Ślizg dubletów zewnętrznych względem siebie, ograniczony przez takie elementy strukturalne, jak wiązania neksynowe i szczelbe promieniste, zostaje przekształcony w ruchome zgięcie będące podstawą bicia wici i rzęsek [45]. Ruch wici można scharakteryzować jako oscylacyjny ruch w dwóch płaszczyznach. Bardziej złożony jest ruch rzęski, w którym można wyodrębnić szybkie uderzenie efektywne w jednej płaszczyźnie i wolną fazę powrotną trwającą 2–3 razy dłużej i odbywającą się w trzech płaszczyznach [13]. Takie parametry, jak: częstotliwość i kierunek efektywnego uderzenia rzęski lub zmiana kształtu fali wici (np. długość fali, asymetria, kąt zgięcia), ulegają zmianie, kiedy komórka reaguje na bodźce płynące ze środowiska. Tak więc rzęska i wić są ostatnim ogniwem w skomplikowanym procesie przekazywania sygnału ze środowiska do komórki.

## WAPŃ I KALMODULINA – CZYNNIKI REGULUJĄCE RUCH RZĘSKI I WICI

Bodźce odebrane przez receptory rozmieszczone w błonie komórkowej za pośrednictwem wtórnych przekaźników, jonów wapnia i cyklicznych nukleotydów, wpływają na charakter ruchu aksonemy. Wtórne przekaźniki pełnią zatem rolę regulatorów ruchu, modyfikując takie parametry, jak: kierunek i częstotliwość uderzeń rzęski lub kształt fali wici. Najbardziej zaawansowane badania w zakresie regulacji ruchu rzęsek i wici prowadzone są na komórkach orzęsków [4, 48, 49] i *Chlamydomonas* [19, 56, 62]. U organizmów wyższych najwięcej danych dostarczyły badania dotyczące mechanizmu regulacji ruchu wici w plemnikach [6, 7, 8, 31, 56], a ostatnio opublikowano wiele prac na temat ruchu rzęsek wyścielających drogi układu oddechowego [16, 42, 43].

U orzęsków od dawna znane jest zjawisko rewersji ruchu rzęskowego, polegające na krótkotrwałej zmianie kierunku efektywnego uderzenia rzęsek na przeciwny i zwiększeniu częstotliwości ich pracy, co w konsekwencji powoduje zmianę kierunku ruchu komórki [13, 14, 40]. W naturalnych warunkach zjawisko takie występuje, np. gdy orzęsek podczas pływnięcia do przodu natrafia na przeszkodę mechaniczną (stymulacja mechaniczna przedniej części komórki) i jest zmuszony ją ominąć zmieniając kierunek ruchu (reakcja ucieczki). Odwrócenie kierunku efektywnego uderzenia rzęsek w tych komórkach jest ściśle skorelowane z wystąpieniem potencjałów: receptorowego i czynnościowego, generowanego na skutek aktywacji zależnych od napięcia na błonie kanałów wapniowych zlokalizowanych w błonie rzęskowej i wpłynięciu do komórki jonów wapnia [11, 55]. Przywrócenie początkowej wartości potencjału błonowego (repolaryzacja) następuje przez aktywację kanałów potasowych znajdujących się na błonie somatycznej [4, 49]. Renormalizacja stężenia jonów wapnia w komórce następuje przy udziale ATP-azy wapniowej zlokalizowanej w błonach plazmatycznej i alweolarnej [53].

Wzrostowi stężenia jonów wapnia w obrębie aksonemy *in vivo* towarzyszy rewersja ruchu rzęskowego oraz zwiększenie częstotliwości efektywnego uderzenia rzęski. Nasuwa to przypuszczenie, że te dwa zjawiska są ze sobą sprzężone. Jednak badania na modelach komórkowych *Paramecium* (pozbawionych błony komórkowej po traktowaniu Tritonem X-100) zaprzeczają temu stwierdzeniu. Wykazały one bowiem, że  $Mg^{2+}$ -ATP są niezbędne do wprowadzenia odbłonionych modeli komórkowych w ruch. Natomiast jony wapnia i ATP mogą regulować kierunek efektywnego uderzenia rzęsek bez zmiany częstotliwości pracy rzęsek [34]. Wynika z tych obserwacji, że te dwa zjawiska regulowane są przez niezależne od siebie mechanizmy. Potwierdza to przypuszczenie seria doświadczeń na mutantach behawioralnych atalanta, u których nie obserwuje się rewersji ruchu rzęskowego. Przyczyną tego zjawiska jest zmiana struktury aksonemy. W tym przypadku wpły-

wający do rzęsek wapń powoduje jedynie przyspieszenie częstotliwości bicia rzęsek bez zmiany kierunku ich uderzenia [24]. Jony wapnia zatem mogą wpływać niezależnie na dwa parametry aktywności aksonemu u *Paramecium* zarówno na kierunek, jak i częstotliwość efektywnego uderzenia rzęski.

Mutacja atalanta, jaka wystąpiła u *Paramecium*, być może została utrwalona przez ewolucję w aksonemie rzęsek nabłonka migawkowego. Okazuje się bowiem, że rzęski pokrywające nabłonek wyścielający jajowody lub drogi układu oddechowego reagują na wzrost stężenia jonów wapnia w komórce wyłącznie zwiększeniem częstotliwości uderzenia efektywnego [46, 59, 61]. Zjawisko to można zaobserwować traktując komórki nabłonka orzęsionego roztworem zawierającym jony wapnia i jonofor A 23187. Natomiast odwrotny efekt, tj. obniżenie częstotliwości bicia rzęsek, obserwowano w obecności czynnika chelatującego jony wapnia, EGTA [18, 30, 44]. Podobnie jak ma to miejsce u orzęsków, w komórkach orzęsionego nabłonka dróg układu oddechowego stymulacja mechaniczna może spowodować wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie [44]. Obserwowano to zjawisko *in vivo* w komórkach uprzednio traktowanych fluorescencyjnym wskaźnikiem jonów wapnia – fura-2/AM [22]. Porównując trwającą ułamek sekundy odpowiedź na bodziec mechaniczny u orzęsków ze znacznie wolniejszą reakcją w przypadku komórek nabłonka należy przypuszczać, że jony wapnia, które bezspornie biorą udział w tym procesie, wpływają do komórki przez kanały wapniowe rozmieszczone na błonie komórkowej nie zaś rzęskowej [46]. Ponadto stwierdzono, że po stymulacji mechanicznej w komórkach nabłonka obserwuje się uwalnianie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych (siateczka endoplazmatyczna) [22].  $\text{Ca}^{2+}$  działa bezpośrednio na aksonemę zarówno w komórkach epitelialnych [60], jak i orzęsków [34], zatem droga, jaką muszą przebyć jony wapnia, w przypadku komórek nabłonka orzęsionego w pobliżu aksonemy jest znacznie dłuższa. Fizjologicznie stymulacja mechaniczna może być inicjowana przez przesuwającą się wydzielinę śluzową, a towarzyszące temu zjawisku zwiększenie częstotliwości bicia rzęsek prowadzi do efektywniejszego oczyszczania dróg oddechowych [46].

Wpływ stężenia jonów wapnia na aktywność ruchową wici plemników jeżowca i ssaków był również badany na komórkowych modelach ruchowych. Reaktywowanie ruchu wici następowało, podobnie jak u orzęsków, w obecności ATP i jonów magnezu, natomiast dodanie jonów wapnia powodowało zmianę kształtu fali wici bez wyraźnego wpływu na częstotliwości i długości fali [5, 31]. Podobne zmiany w ruchu wici plemnika obserwuje się *in vivo* po zadziałaniu speraktu, peptydowego chemoatraktanta, wydzielanego przez jaja jeżowca. Czynniki te, którego przypuszczalny mechanizm działania będzie omówiony później, powoduje w końcowym efekcie wzrost stężenia jonów wapnia w komórce [6, 7, 8].

Na podstawie dotychczasowych danych trudno jest precyzyjnie ustalić miejsce działania wapnia na aksonemie. Prawdopodobnie przyczyną tych zmian są zależne od wapnia procesy fosforylacji i defosforylacji białek wchodzących w skład akso-



nemy. Obecność u *Paramecium* dwóch, różniących się immunologicznie, zależnych od jonów wapnia, a niezależnych od kalmoduliny kinaz białkowych Ca-PK1 i Ca-PK2 potwierdza tę sugestię [4]. Jony wapnia mogą też kontrolować aktywność ruchową aksonemy pośrednio, przez białka wiążące wapń [63]. Jednym z nich jest kalmodulina, niskocząsteczkowe białko mające 4 miejsca wiązania jonów wapnia [58] i występujące we wszystkich komórkach eukariotycznych. Stwierdzono jej obecność, między innymi, na zewnętrznym dublecie mikrotubul rzęskowych *Paramecium* i *Tetrahymena* [32, 63], w rzęskach komórek epitelialnych dróg oddechowych, w wiciach plemników jeżowca i ssaków [37]. Taka lokalizacja kalmoduliny sugeruje jej udział w mechanizmie regulacji ruchu rzęski, a doświadczenia na komórkach i modelach komórkowych potwierdzają te sugestie [9, 29, 36, 60]. O kalmodulinie wiadomo, że nie tylko pełni ona rolę buforu wiążącego jony wapnia, ale jest białkiem regulatorowym, które po związaniu co najmniej 3 jonów wapnia zmienia swoją strukturę i łącząc się z innymi białkami, zmienia ich aktywność [58]. W przypadku *Paramecium* przynajmniej 9 polipeptydów wiąże się specyficznym z kalmoduliną. Wśród nich znajdują się zarówno białka ściśle związane z aksonemą, z błoną rzęskową, jak i białka rozpuszczone we frakcji cytozolowej [4, 12]. Przede wszystkim jednak kalmodulina reguluje stopień fosforylacji białek aksonemy aktywując kinazę białkową zależną od wapnia i kalmoduliny. Specyficznym substratem dla tego enzymu jest  $\beta$ -tubulina, a więc jedna z podjednostek dimerów budujących mikrotubule [63]. Kalmodulina jest odpowiedzialna również za defosforylację białek przez aktywację fosfatazy, kalcyneuryny, której obecność wykazano w rzęskach *Paramecium*, *Tetrahymena* [4] oraz w wiciach *Chlamydomonas* [37] i plemników jeżowca [37,57]. Enzym ten, jak pokazano w wiciach plemników, hamuje zależną od cAMP fosforylację lekkiego łańcucha dyneiny 21S [56, 57, 62].

Podane przykłady dowodzą wyraźnie, że kalmodulina może pełnić funkcje kompleksowego modulatora aktywności rzęsek i wici, regulując ich aktywność ruchową przez wiązanie się zarówno z aksonemalnymi, jak i błonowymi białkami bądź przez kontrolowanie stopnia ich ufosforylowania.

## MODULACJA AKTYWNOŚCI AKSONEMY PRZEZ CYKLICZNE NUKLEOTYDY

Badania ostatniej dekady dotyczące mechanizmu ruchu rzęsek i wici wykazują, że również cykliczne nukleotydy biorą udział w regulacji aktywności ruchowej aksonemy. W komórkach orzęsionego nabłonka tchawicy wykazano, że podwyższenie poziomu komórkowego cAMP w wyniku inkubacji tych komórek z 8-Br-cAMP, przepuszczalnym przez błony analogiem cAMP, powoduje wzrost częstotliwości pracy rzęsek [10, 54]. Podobny efekt uzyskuje się przez traktowanie tych komórek izoproterenolem, agonistą  $\beta$ -adrenergicznych receptorów, który akty-

wując określoną kaskadę enzymatyczną powoduje wzrost stężenia cAMP [30]. Również wzrost częstotliwości bicia rzęsek i związane z tym przyspieszenie ruchu do przodu obserwuje się w modelach komórkowych *Paramecium* w obecności ATP, jonów magnezu i cAMP [4]. *In vivo* zwiększenie tempa pracy rzęsek u tego orzęska obserwuje się podczas hiperpolaryzacji błony komórkowej, którą można wywołać przez mechaniczną stymulację tylnej części komórki. Hiperpolaryzacja błony komórkowej zachodzi w następstwie aktywacji kanałów potasowych zlokalizowanych w błonie somatycznej i zwiększonego wypływu jonów potasu z komórki [4, 50]. Konsekwencją tego zjawiska według Schultza i współpracowników jest wzrost poziomu cAMP w komórce w wyniku aktywacji cyklicznej adenylanowej, pełniącej w tym wypadku funkcję kanału potasowego [49–51]. Zatem, według tych badaczy aktywacja kanału jest bezpośrednim sygnałem do zwiększonej syntezy cAMP. Powyższe badania są jednak w pewnym stopniu negowane przez doświadczenia, w których stwierdzono, że wstrzyknięcie do komórki cAMP powoduje hiperpolaryzację błony komórkowej [3, 23, 39]. Tak więc aktywacja kanału potasowego i związana z tym hiperpolaryzacja błony komórkowej byłaby zjawiskiem wtórnym, występującym w odpowiedzi na wzrost poziomu cAMP. Pytanie, który z tych procesów jest pierwotny, pozostaje bez odpowiedzi. Jedno wydaje się pewne, że hiperpolaryzacji błony komórkowej towarzyszy wzrost stężenia cAMP w komórce orzęska.

W jaki sposób cAMP może regulować pracę aksonemy? Częściowo na to pytanie odpowiedziały badania stopnia ufosforylowania polipeptydów, wchodzących w skład dyneiny w rzęskach komórek *Paramecium*. Podczas stymulacji cyklicznymi nukleotydami endogennymi kinaz białkowych, wśród wielu polipeptydów fosforylowanych przez kinazę zależną od cAMP, bardzo ważnym wydaje się białko sedymentujące z dyneiną 22S, o masie cząsteczkowej 29 kD [2, 21, 62]. Białko to wiąże się z aksonemą tylko w obecności ATP, a stopień jego fosforylacji zależy nie tylko od cAMP, ale również od poziomu jonów wapnia. Białko to ulega fosforylacji przy stężeniu  $10^{-7}$  M jonów wapnia, natomiast już mikromolarne stężenie tego jonu powoduje zahamowanie fosforylacji. Nazwano je regulatorem dyneiny i uważa się, że stan jego ufosforylowania reguluje tempo pracy rzęsek podczas hiperpolaryzacji błony komórkowej u *Paramecium*.

Wzoruując się na badaniach regulacji ruchu rzęsek u pierwotniaków, rozpoczęto poszukiwania białek kontrolujących aktywność ruchową aksonemy u organizmów wyższych. Okazało się, że w rzęskach komórek orzęsionego nabłonka tchawicy białko aksonemalne o masie cząsteczkowej 26 kD podlega fosforylacji w obecności cAMP. Fosforylacja ta jednakże, inaczej niż w przypadku orzęsków, nie ulega zahamowaniu nawet w obecności wysokiego stężenia jonów wapnia. Czynnikiem, który w znacznym stopniu hamuje proces fosforylacji białek aksonemy w komórkach nabłonka orzęsionego, jest KT-5720 – inhibitor kinazy białkowej zależnej od cAMP [43]. Wydawać by się mogło, że w tym wypadku występuje brak zależności stopnia fosforylacji od poziomu jonów wapnia w komórce, co można tłumaczyć odmiennym

efektem podwyższonego stężenia jonów wapnia na aktywność aksonemy w rzęskach tych komórek. Wzrost stężenia wapnia w obrębie aksonemy powoduje tutaj jedynie zwiększenie częstotliwości bicia rzęsek, a więc efekt taki sam jak przy wzroście poziomu cAMP. Jednak późniejsze badania na komórkach nabłonka orzęsionego wykazały, że mechanizm regulacji częstotliwości bicia rzęsek przez fosforylację zależną od cAMP i jonów wapnia jest bardziej złożony niż wydawało się to początkowo. Smith i współpracownicy [52] na podstawie doświadczeń *in vitro* wyróżnili dwa poziomy częstotliwości bicia rzęsek. Częstotliwość uderzenia rzęsek w komórkach nabłonka nie poddanych działaniu stymulacji zewnętrznej określono jako wewnętrzną (*intrinsic ciliary beat frequency*), zaś po stymulacji zewnętrznej, w wyniku której nastąpiło pobudzenie receptora, nazwano częstotliwością stymulowaną (*stimulated ciliary beat frequency*). Według autorów te dwa poziomy częstotliwości uderzenia rzęsek określane są przez różne szlaki fosforylacji; szlak fosforylacji zależny od kalmoduliny i jonów wapnia jest czynnikiem odpowiedzialnym za wewnętrzną częstotliwość uderzenia rzęsek, natomiast fosforylacja zależna od cAMP i kinazy białkowej A reguluje drugi poziom aktywności aksonemy. Ponadto cAMP może hamować fosforylację zależną od kalmoduliny, ale nie obserwowano zjawiska odwrotnego.

W przypadku wici plemników aktywność ruchowa aksonemy jest także regulowana przez zależną od cAMP fosforylację białek. Ruch wici w modelach tritonowych plemników może być hamowany przez inhibitor kinazy białkowej zależnej od cAMP i cGMP, H-8 oraz przez PKI, specyficzny inhibitor kinazy zależnej od cAMP, co sugeruje, że aktywność tych kinaz białkowych jest niezbędna dla ruchu plemników [25, 62]. Głównym substratem kinazy białkowej A jest białko o masie cząsteczkowej 56 kD, regulatorowa podjednostka tej kinazy, nazwane również akso-kininą [38, 62]. Z pewnością również w przypadku wici mechanizm regulujący ruch związany jest z procesami fosforylacji samej cząsteczki dyneiny podobnie jak ma to miejsce w aksonemie rzęski. Potwierdzają to badania wici plemników jeżowca, które wskazują, że oprócz niezbędnej, ale niewystarczającej do wystąpienia ruchu autofosforylacji kinazy białkowej A, dyneina jest kolejnym kompleksem białek fosforylowanych w obecności cAMP. Fosforylacja *in vitro* frakcji 21S dyneiny wyraźnie podwyższa aktywność ATP-azową dyneiny, jak również powoduje wzrost szybkości ślizgu mikrotubul względem siebie [57, 62]. W *Chlamydomonas* zaś stwierdzono, że ślizg mikrotubul w obrębie aksonemy szczepu dzikiego jest regulowany przez szczeble promieniste, a mechanizm regulujący włącza związaną z aksonemą zależną od cAMP kinazę oraz fosfatazę typu I [19]. W późniejszych badaniach [20] wykazano dodatkowo, że zależna od cAMP fosforylacja lub defosforylacja polipeptydu o masie cząsteczkowej 138 kDa, wchodzącego w skład łańcucha pośredniego wewnętrznego ramienia dyneiny może odpowiednio hamować lub przywracać zdolność do wykonania ślizgu mikrotubul w obrębie aksonemy.



Udział cAMP w regulacji ruchu wici plemników jeżowca wydaje się być ściśle związany z obecnością drugiego cyklicznego nukleotydu, a mianowicie cGMP. Stwierdzono, że aktywacja receptorów błonowych przez chemoatraktant, sperakt, stymuluje związaną z receptorem cyklazę guanylanową, powodując podwyższenie stężenia cGMP w cytoplazmie komórki. Cykliczny GMP zaś, aktywując pośrednio cyklazę adenylanową powoduje wzrost poziomu cAMP i oprócz omówionej powyżej, zależnej od cAMP fosforylacji białek, regulacji poddane zostają również jonowe kanały wapniowe. Zatem aktywacja cyklazy guanylanowej powodowałaby pośrednio wzrost poziomu jonów wapnia w komórce plemnika, a w konsekwencji zmianę parametrów ruchu wici [6, 7, 8].

W orzęsionych komórkach epitelialnych wyścielających drogi układu oddechowego wykazano obecność dwóch cyklaz guanylanowych, których aktywność wzrasta po zadziałaniu takich czynników, jak: sodopędny peptyd typu C (CNP) i nitroprusydek sodu (SNP) [15]. Działaniu czynników powodujących wzrost poziomu cGMP towarzyszy również wzrost częstotliwości uderzenia rzęsek [16, 26]. Jak ostatnio wykazali Sakai i współpracownicy [41], stosując fura-2/AM, działaniu czynników powodujących wzrost poziomu cGMP w komórkach nabłonka orzęsionego towarzyszy wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie.

U *Paramecium* natomiast jony wapnia wraz z kalmoduliną są regulatorami aktywności cyklazy guanylanowej, stymulującej syntezę cGMP [47, 49, 51]. Udowadniają to wyniki badań przeprowadzonych na orzęskach ze szczepu dzikiego oraz na mutancie typu pawn, u którego nie obserwuje się rewersji ruchu rzęskowego z powodu wadliwie funkcjonujących kanałów wapniowych zależnych od napięcia. W komórkach szczepu dzikiego po zadziałaniu bodźca wywołującego depolaryzację błony komórkowej, na skutek otwarcia zależnych od napięcia na błonie kanałów wapniowych, można zarejestrować napływ  $\text{Ca}^{2+}$  do komórki i wystąpienie rewersji ruchu rzęskowego, a także przejściowy, gwałtowny wzrost poziomu cGMP [47, 51]. Taka sama stymulacja w komórkach zmutowanych pawn nie powoduje ani rewersji ruchu rzęskowego, ani zmian poziomu cGMP. Natomiast w obecności alkaloidu veratrydyny otwierającego napięciowo-zależne kanały wapniowe można rejestrować behawioralne i biochemiczne konsekwencje tego zjawiska, którego odzwierciedleniem jest rewersja ruchu rzęskowego oraz wzrost aktywności cyklazy guanylanowej [47, 51].

Analogicznie do cAMP, również cGMP może być odpowiedzialny za stopień fosforylacji białek aksonemy przez aktywowanie odpowiednich kinaz białkowych [2, 4, 33, 62]. Z badań wynika, że w obecności cGMP fosforylacji ulegają te same polipeptydy aksonemalne u *Paramecium* jak w przypadku cAMP, z tą różnicą, że stężenie cGMP musi być dużo wyższe [62]. Pewne rozbieżności występują w stopniu ufosforylowania białek aksonemy, w obecności cGMP, z komórek szczepu dzikiego i mutanta typu atalanta. W mutancie tym istnieją funkcjonalne kanały wapniowe, a więc synteza cGMP może przebiegać normalnie, ale mutacja struktury

aksonemy nie pozwala na rewersję ruchu rzęskowego. We wszystkich szczepach atalanta w obecności kinazy białkowej zależnej od cGMP w znacznie wyższym stopniu ulega fosforylacji białko p48 [1]. Za wcześnie jest jednak na jednoznaczne stwierdzenie, że ten właśnie polipeptyd może odgrywać kluczową rolę w regulacji aktywności aksonemy podczas zmiany kierunku efektywnego uderzenia rzęski u orzęsków.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANN K-S, NELSON D. Protein substrates for cGMP-dependent protein phosphorylation in cilia of wild type and Atalanta mutants of *Paramecium*. *Cell Motil Cytoskel* 1995; **30**: 252–260.
- [2] BONINI NM, NELSON DL. Phosphoproteins associated with cyclic nucleotide stimulation of ciliary motility in *Paramecium*. *J Cell Sci* 1990; **95**: 219–230.
- [3] BONINI NM, GUSTIN MC, NELSON DL. Regulation of ciliary motility by membrane potential in *Paramecium*: a role for cyclic AMP. *Cell Motil Cytoskel* 1986; **6**: 256–272.
- [4] BONINI NM, EVANS TC, MIGLIETTA LAP, NELSON DL. The regulation of ciliary motility in *Paramecium* by  $Ca^{2+}$  and cyclic nucleotides. [w] Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res., P. Greengard i G.A. Robinson [red.] Ravell Press, Ltd., New York., 1991; **23**: 227–272.
- [5] BROKAW CJ. Regulation of sperm flagellar motility by calcium and cAMP-dependent phosphorylation. *J Cell Biochem* 1987; **35**: 175–184.
- [6] COOK SP, BABCOCK DF. Selective modulation by cGMP of the  $K^+$  channel activated by speract. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22402–22407.
- [7] COOK SP, BABCOCK DF. Activation of  $Ca^{2+}$  permeability by cAMP is coordinated through the pH; increase induced by speract. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22408–22413.
- [8] COOK SP, BROKAW CJ, MULLER CH, BABCOCK DF. Sperm chemotaxis: egg peptides control cytosolic calcium to regulate flagellar responses. *Develop Biol* 1994; **165**: 10–19.
- [9] DI BENEDETTO G, MAGNUS CJ, GRAY PTA, MEHTA A. Calcium regulation of ciliary beat frequency in human respiratory epithelium *in vitro*. *J Physiol* 1991; **439**: 103–113.
- [10] DI BENEDETTO G, MANARA-SHEDIAC FS, MEHTA A. Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium. *Eur Resp J* 1991; **4**: 789–795.
- [11] DUNLAP K. Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*. *J Physiol* 1977; **271**: 119–133.
- [12] EVANS TC, NELSON DL. The cilia of *Paramecium* contain both  $Ca^{2+}$ -dependent and  $Ca^{2+}$ -inhibitable calmodulin-binding proteins. *Biochem J* 1989; **259**: 385–396.
- [13] FABCZAK H, FABCZAK S. Rzęski i wici. *Biologia w Szkole* 1994; **237**: 5–12.
- [14] FABCZAK H, WALERCZYK M, FABCZAK S. Rola wapnia i cyklicznych nukleotydów w regulacji ruchu orzęsków. *Kosmos* 1996; **45**: 11–24.
- [15] GEARY CA, GOY MF, BOUCHER RC. Synthesis and vectorial export of cGMP in airway epithelium: expression of soluble and CNP-specific guanylate cyclases. *Am J Physiol* 1993; **265**: L598–L605.
- [16] GEARY CA, DAVIS CW, PARADISO AM, BOUCHER RC. Role CNP in human airways: cGMP-mediated stimulation of ciliary beat frequency. *Am J Physiol* 1995; **268**: L1021–L1028.
- [17] GIBBONS IR. The Dynein ATP-ases. [w] Cell Movement. [red.] Warner FD, Satir P, Gibbons IR. 1989; 3–22.
- [18] GIRARD PR, KENNEDY JR. Calcium regulation of ciliary activity in rabbit tracheal epithelial explants and outgrowth. *Eur J Cell Biol* 1986; **40**: 203–209.

- [19] HABERMACHER G, SALE WS. Regulation of dynein-driven microtubule sliding by axonemal kinase and phosphatase in *Chlamydomonas* flagella. *Cell Motil Cytoskel* 1995; **32**: 106–109.
- [20] HABERMACHER G, SALE WS. Regulation of flagellar dynein by phosphorylation of a 138-kD inner arm dynein intermediate chain. *J Cell Biol* 1997; **136**: 167–176.
- [21] HAMASAKI T, BARKALOW K, RICHMOND J, SATIR P. cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7918–7922.
- [22] HANSEN M, BOITTANO S, DIRKSEN ER, SANDERSON MJ. A role for phospholipase C activity but not ryanodine receptors in the initiation and propagation of intercellular calcium waves. *J Cell Sci* 1995; **108**: 2583–2590.
- [23] HENNESSEY T, MACHEMER H, NELSON DL. Injected cyclic AMP increases ciliary beat frequency in conjunction with membrane hyperpolarization. *Eur J Cell Biol* 1985; **36**: 153–156.
- [24] HINRICHSEN RD, KUNG C. Genetic analysis of axonemal mutants in *Paramecium tetraurelia* defective in their response to calcium. *Genet Res* 1984; **43**: 11–20.
- [25] ISHIGURO K, MUROFUSHI H, SAKAI H. Evidence that cAMP-dependent protein kinase and protein factor are involved in reactivation of Triton-X100 models of sea urchin and starfish spermatozoa. *J Cell Biol* 1982; **92**: 777–782.
- [26] JAIN B, RUBINSTEIN I, ROBBINS RA, LEISE KL, SISSON JH. Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; **191**: 83–88.
- [27] KAWIAK J. Składniki cytoszkieletu. [w] J. Kawiak, J. Mirecka, M. Olszewska, J. Warchoń [red.] Podstawy cytofizjologii. Wyd. Nauk. PWN 1995, 294–304.
- [28] KOROHODA W. Cytoszkielet. [w] M. Bryszewska i W. Leyko [red.], Biofizyka dla Biologów Wyd. Nauk. PWN 1997, 349–376.
- [29] KREIMER DI, KHOTIMCHENKO YUS. Cytoplasm calcium-binding proteins of germ cells and embryos of the sea urchin. *Comp Biochem Physiol* 1995; **110A**: 95–105.
- [30] LANSLEY AB, SANDERSON MJ, DIRKSEN ER. Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by  $Ca^{2+}$  and cAMP. *Am J Physiol* 1992; **263**: L232–242.
- [31] LINDEMANN CB, GOLTZ JS. Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in Triton X-100 extracted rat sperm. *Cell Motil Cytoskel* 1988; **10**: 420–431.
- [32] MAIHLE NJ, DEDMAN JR, MEANS AR, CHAFOULEAS JG, SATIR BH. Presence and indirect immunofluorescent localization of calmodulin in *Paramecium tetraurelia*. *J Cell Biol* 1981; **89**: 695–699.
- [33] MIGLIETTA LAP, NELSON DL. A novel cGMP-dependent protein kinase from *Paramecium*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 16096–16105.
- [34] NAITOH Y, KANEKO H. Reactivated Triton-extracted models of *Paramecium*: modification of ciliary movement by calcium ions. *Science* 1972; **176**: 523–524.
- [35] OMOTO CK. Structural and functional hierarchy of eukaryotic cilia and flagella. *Eur J Histochem* 1995; **39**: 85–90.
- [36] OTTER T, SATIR BH, SATIR P. Trifluoperazine-induced changes in swimming behavior of *Paramecium*: evidence for two sites of drug action. *Cell Motil* 1984; **4**: 249–267.
- [37] OTTER T. Calmodulin and the control of flagellar movement. [w] Cell Movement, FD. Warner, P. Satir, IR. Gibbons [red.] Alan R Liss, Inc. New York, 1989: **1**: 289–298.
- [38] PAUPARD M-C, MACLEOD J, WASCO W, ORR GA. Major 56,000-dalton, soluble phosphoprotein present in bovine sperms is the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase. *J Cell Biochem* 1988; **37**: 161–175.
- [39] PECH LL. Regulation of ciliary motility in *Paramecium* by cAMP and cGMP. *Comp Biochem Physiol* 1995; **111A**: 31–37.



- [40] PRESTON RR, SAIMI Y. Calcium ions and the regulation of motility in *Paramecium*. [w] R. A. Bloodgood [red.] Ciliary and Flagellar Membranes. Plenum Publishing Corporation 1990; 173–200.
- [41] SAKAI A, KONDO M, TAMAOKI J, KONNO K. Nitric oxide modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  responses in cow tracheal epithelium. *Eur J Pharmacol* 1995; **291**: 375–379.
- [42] SALATHE M, BOOKMAN RJ. Coupling of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and ciliary beating in cultured tracheal epithelial cells. *J Cell Sci* 1995; **108**: 431–440.
- [43] SALATHE M, PRATT M, WANNER A. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of a 26 kD axonemal protein in ovine cilia isolated from small tissue pieces. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; **9**: 306–314.
- [44] SANDERSON MJ, DIRKSEN ER. Mechanosensitive and beta-adrenergic control of the ciliary beat frequencies of mammalian respiratory tract cells in culture. *Am Rev Respir Dis* 1989; **139**: 432–440.
- [45] SATIR P. Switching mechanisms in the control of ciliary motility. [w] Modern Cell Biology [red.] A.R. Liss, Inc 1985; **4**: 1–46.
- [46] SATIR P, SLEIGH M. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Ann Rev Physiol* 1990; **52**: 137–155.
- [47] SCHULTZ JE, SCHWADE U. Veratridine induces a  $\text{Ca}^{2+}$  influx, cyclic GMP formation and backward swimming in *Paramecium tetraurelia* wild type cells and  $\text{Ca}^{2+}$  current-deficient Pawn mutant cells. *J Membr Biol* 1989; **109**: 251–258.
- [48] SCHULTZ JE, KLUMPP S. Cyclic nucleotides and calcium signalling in *Paramecium*. [w] S. Shenolikar, A. C. Nairn. Raven [red.] Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Res. Press, Ltd., New York 1993; **27**: 25–46.
- [49] SCHULTZ JE, KLUMPP S, HINRICHSEN RD. Calcium and membrane excitation in *Paramecium*. [w] D.H. O'Day, [red.] Calcium as an Intracellular Messenger in Eucaryotic Microbes. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1990; 124–150.
- [50] SCHULTZ JE, KLUMPP S, BENZ R, SCHURHOFF-GOETERS WJCh, SCHMID A. Regulation of adenyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. *Science* 1992; **255**: 600–602.
- [51] SCHULTZ JE, GUO Y-L, KLEEFELD H, VOLKEL H. Hyperpolarization- and depolarization-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents in *Paramecium* trigger behavioral changes and cGMP formation independently. *J Membr Biol* 1997; **156**: 251–259.
- [52] SMITH RP, SHELLARD R, DHILLON DP, WINTER J, MEHTA A. Asymmetric interactions between phosphorylation pathways regulating ciliary beat frequency in human nasal respiratory epithelium *in vitro*. *J Physiol* 1996; **496**: 883–889.
- [53] STELLY N, MAUGER JP, KERYER G, CLARET M, ADOUTTE A. Cortical alveoli of *Paramecium*: vast submembranous calcium storage compartment. *J Cell Biol* 1991; **109**: 251–258.
- [54] TAMAOKI J, KONDO M, TAKIZAWA T. Effect of cyclic AMP on ciliary function in rabbit tracheal epithelial cells. *J Appl Physiol* 1989; **66**: 1035–1039.
- [55] TAMM S.  $\text{Ca}^{2+}$  channels and signalling in cilia and flagella. *Trends Cell Biol* 1994; **4**: 305–310.
- [56] TASH JS. Protein phosphorylation: The second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskel* 1989; **14**: 332–339.
- [57] TASH JS, MEANS AR. cAMP- and  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin (CaM)-dependent phosphorylation/dephosphorylation pathways regulate dynein. *J Cell Biol* 1988; **107**: 247a.
- [58] TRETYN A. Wapń w komórkach eukariotycznych. [red.] Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1994; 174–189.
- [59] VERDUGO P.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent hormonal stimulation of ciliary activity. *Nature* 1980; **283**: 764–765.
- [60] VERDUGO P, RAESS BV, VILLALON M. The role of calmodulin in regulation of ciliary movement in mammalian epithelial cilia. *J Submicrosc Cytol* 1983; **15**: 95–96.

- [61] VILLALON M, HINDS TR, VERDUGO P. Stimulus-response coupling in mammalian ciliated cells. Demonstration of two mechanisms of control for cytosolic  $[Ca^{2+}]$ . *Biophys J* 1989; **56**: 1255–1258.
- [62] WALCZAK CE, NELSON DL. Regulation of dynein-driven motility in cilia and flagella. *Cell Motil Cytoskel* 1994; **27**: 101–107.
- [63] WATANABE Y, HIRANO-OHNISHI J, TAKEMASA T. Calcium-binding proteins and ciliary movement regulation in *Tetrahymena*. [w] D.H. O'Day, [red.] Calcium as an Intracellular Messenger in Eucaryotic Microbes. American Society for Microbiology, Washington, DC 1990; 124–150.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 29.03.1998 r.*

*Przyjęto: 03.08. 1998 r.*

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

# JAK POWSTAJE PRZEDZIAŁOWOŚĆ NEURONU, CZYLI O TRANSPORCIE WEWNĄTRZKOMÓRKOWYM

## BASIS OF NEURONAL COMPARTMENTATION. INTRACELLULAR TRANSPORT

Barbara MAJEWSKA

Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa

*Streszczenie:* Ultrastruktura komórki nerwowej charakteryzuje się przedziałowością, czyli nierównomiernym rozmieszczeniem elementów komórkowych (organelli, białek cytoszkieletu, mRNA) w obszarach neuronu wyznaczonych przez perikarion i dendryty (przedział somatodendrytyczny) oraz akson (przedział aksonalny). Uważa się, że ten charakterystyczny rozkład elementów komórkowych jest efektem transportu odbywającego się dzięki systemowi mikrotubul, których orientacja w poszczególnych przedziałach neuronu jest różna. Wszystkie mikrotubule aksonalne są skierowane końcem plus odkomórkowo, podczas gdy w dendrytach część mikrotubul jest skierowana odkomórkowo, a część doko-mórkowo. Elementy komórkowe są transportowane po mikrotubulach przez białka motoryczne należące do dwóch nadrodziny; nadrodziny kinezyn i nadrodziny dynein, które wykazują odmienną preferencję kierunku ruchu po mikrotubuli. Kinezyiny wędrują na ogół w kierunku końca plus mikrotubuli, a dyneina w kierunku końca minus. Ponieważ poszczególne elementy komórkowe są związane w sposób specyficzny przez odpowiednie białka motoryczne, powstaje możliwość ich selektywnego kierowania do poszczególnych przedziałów neuronu, co prowadzi do wykształcenia tzw. przedziałowości komórki nerwowej.

*Słowa kluczowe:* komórka nerwowa, przedziałowość, cytoszkielet, transport, białka motoryczne

*Summary:* Ultrastructure of the nerve cell is characterized by compartmentation which means that cellular components (organelles, cytoskeletal proteins, mRNAs) are non-uniformly distributed within compartments defined by the cell body and dendrites (somatodendritic compartment) and the axon (axonal compartment). It is believed that the compartmentation is a result of intracellular transport going on the basis of microtubule array which exhibits differential orientation in neuronal compartments. Axonal microtubules are oriented with their plus end toward the axonal terminal, whereas in dendrites some microtubules show axon-like orientation and some are directed with their plus end toward the soma. Cellular components are transported along microtubules by molecular motors which belong to two protein superfamilies: kinesins and dyneins. Kinesins preferentially move toward the plus end of microtubule and dyneins translocate toward the minus end. Given that a certain cargo is specifically bound by a certain



molecular motor the possibility arises for a selective distribution of cellular components within cellular compartments and hence the compartmentation of the neuron develops.

*Key words:* nerve cell, compartmentation, cytoskeleton, transport, molecular motors

## POLARYZACJA MORFOLOGII I PRZEDZIAŁOWOŚĆ ULTRASTRUKTURY NEURONU

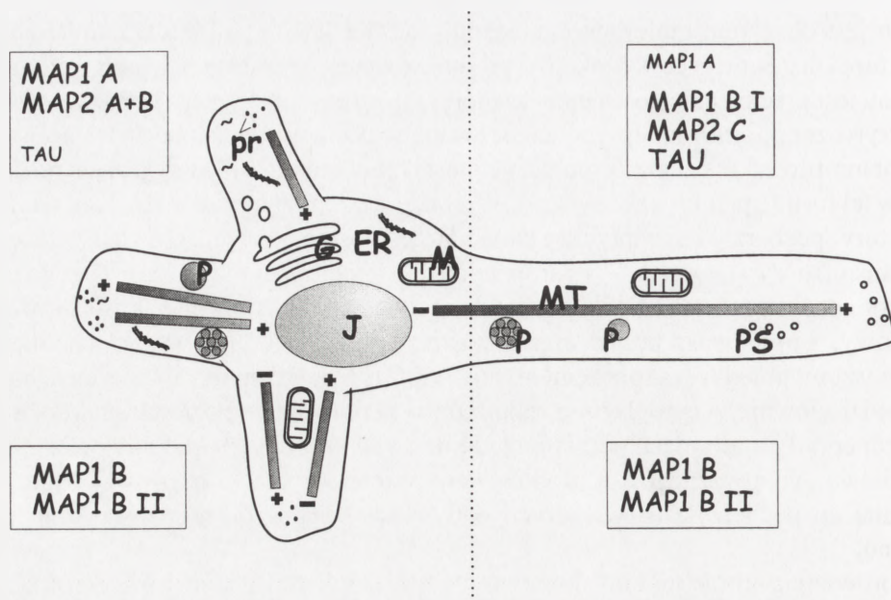
Cechą komórki nerwowej jest morfologiczna polaryzacja wynikająca z obecności na przeciwnych biegunach wypustek dwóch rodzajów: krótszych i licznych, na ogół, dendrytów oraz najczęściej pojedynczego, długiego aksonu. Okazuje się, że również ultrastruktura neuronu ma charakter biegunowy, co oznacza, że rozmieszczenie organelli komórkowych, poszczególnych białek, a także mRNA nie jest jednorodne i odpowiada przedziałom komórki wyznaczonym przez dwa typy wypustek. Mówimy zatem o istnieniu dwóch przedziałów (kompartamentów) w obrębie neuronu, z których każdy jest wyposażony w odrębny zestaw elementów komórkowych (rys. 1). Jeden z nich, obejmujący ciało neuronu (perikarion) i dendryty, jest określany jako przedział somatodendrytyczny, drugi natomiast to przedział aksonalny.

W przedziale somatodendrytycznym są zlokalizowane m.in. struktury komórkowe tworzące aparat syntezy białek: polirybosomy, siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego oraz mRNA [3]. Obecność mRNA i polirybosomów w końcowych odcinkach dendrytów, zwłaszcza w pobliżu synaps [25], stwarza możliwość lokalnej syntezy białek w odpowiedzi na docierający sygnał, a zatem pozwala na modyfikację siły oraz wzorca połączeń w procesach plastyczności neuronalnej m.in. w powstawaniu śladu pamięciowego (wiemy dziś, że powstawanie pamięci długotrwałej wiąże się z syntezą białek, a zahamowanie tej syntezy zaburza powstawanie śladu pamięciowego – patrz [6]). Spośród zidentyfikowanych dotąd rodzajów dendrytycznego mRNA wymienić należy mRNA dla MAP-2 (ang. *microtubule-associated protein-2*) [11],  $\alpha$ CaM KII (podjednostka  $\alpha$  kinazy II zależnej od wapnia/kalmoduliny) [5], [22],  $\alpha$ -spektryny z mózgu [12], czynników transkrypcyjnych, w tym CREB (ang. *cAMP response element binding protein*) i zif268 [7]. Specyficznym dla tkanki mózgowej mRNA, które po raz pierwszy zidentyfikowano u szczura, a którego odpowiednik znaleziono także w ludzkiej tkance, jest tak zwane BC (ang. *brain cytoplasmic*) mRNA, oznaczane jako BC1 (szczurze) i BC200 (ludzkie). BC1 i BC200 mRNA występują w dendrytach neuronów mózgowych, gdzie prawdopodobnie pełnią funkcję pomocniczą w procesie syntezy białek, jako że same nie kodują białka [25]. Nie stwierdza się zachodzenia syntezy białek w aksonach (z wyjątkiem syntezy mitochondrialnej, która jednak odbywa się za pomocą odrębnej maszynerii syntezy białek na matrycy mitochondrialnego DNA), co wskazuje, że

akson jest obszarem mniej autonomicznym od dendrytów, a białka budujące jego strukturę i uczestniczące w funkcji są produkowane na terenie perikarionu. Zadaniem aksonu jest przekazanie do kolejnej komórki informacji odebranej z obszaru somato-dendrytycznego. Informacja jest zakodowana w postaci impulsu nerwowego, który po dotarciu do zakończenia aksonalnego musi zostać zamieniony w sygnał chemiczny, aby w tej formie przekroczyć synapsę. Akson jest zatem wyposażony w odpowiednie struktury, pęcherzyki synaptyczne zawierające substancje chemiczne uczestniczące w transmisji synaptycznej – neuroprzekaźniki i neuropeptydy. Neuroprzekaźniki to drobnocząsteczkowe związki (acetylocholina, aminy biogenne, kwas  $\gamma$ -aminomasłowy, aminokwasy pobudzające), które stanowią właściwy sygnał chemiczny przenoszony między zakończeniem pre- i postsynaptycznym, a których synteza zachodzi głównie w cytoplazmie zakończenia nerwowego z prostych prekursorów. Neuropeptydy natomiast pełnią przede wszystkim funkcję modulatorów przekaźnictwa synaptycznego, są produkowane w ciele komórki nerwowej i tam pakowane do pęcherzyków, w których odbywają swoją wędrówkę do zakończenia aksonu.

Porównując ultrastrukturę dendrytów i aksonów nie można zapominać o odmiennym składzie białkowym ich błony komórkowej. Występowanie białek receptorów dla neuroprzekaźników w błonie wypustki neuronu jest uwarunkowane funkcją wypustki. Postsynaptyczna błona dendrytów oraz często błona perikarionu i rzadziej błona aksonalna jest przystosowana do odbioru sygnału chemicznego i jest ściśle związana ze strukturą o charakterystycznym składzie białkowym, zwaną zagęszczeniem postsynaptycznym – patrz [17]. W błonę postsynaptyczną są wbudowane receptory dla neuroprzekaźników wydzielanych przez komórkę presynaptyczną, a zakotwiczenie w niej znajdują liczne enzymy. W presynaptycznej błonie aksonu znajdują się m.in. takie struktury białkowe, jak transportery błonowe pełniące funkcję w zrotnym wychwycie neuroprzekaźnika ze szczeliny synaptycznej, po zakończeniu jego oddziaływania z błoną postsynaptyczną oraz receptory, w tym autoreceptory. Autoreceptory zlokalizowane na danym neuronie reagują na działanie neuroprzekaźnika wydzielanego przez ten neuron i np. ich obecność w błonie zakończenia aksonalnego pozwala na regulowanie ilości wydzielanego neuroprzekaźnika. Na powierzchni całej komórki nerwowej rozsiane są kanały jonowe (dzięki którym możliwe jest utrzymanie stałej różnicy potencjału między zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony oraz propagacja impulsu nerwowego w postaci prądu jonowego), których rozmieszczenie w błonie dendrytów jest odmienne niż w błonie aksonu.

Ze względu na swoją rolę w dostarczaniu energii niezbędnej dla funkcjonowania neuronu mitochondria są obecne w obu przedziałach komórki, przy czym szczególnie licznie występują w zakończeniu aksonu, gdzie duże zapotrzebowanie na energię jest związane z syntezą, gromadzeniem, uwalnianiem i zrotnym wychwytem neuroprzekaźników. Struktury pęcherzykowe, w tym endosomy, lizosomy i ciała



RYСУNEK 1. Schemat ultrastrukturalnej przedziałowości neuronu ER – siateczka śródplazmatyczna, G – aparat Golgiego, J – jądro komórkowe, M – mitochondrium, MT – mikrotubula, P – struktury pęcherzykowe, PS – pęcherzyki synaptyczne, pr – polirybosomy; na rysunku zaznaczono białka MAP ze wskazaniem na ich komórkową lokalizację, mniejsza czcionka oznacza, że białko jest w danym przedziale komórki słabiej reprezentowane

wielopęcherzykowe, zaangażowane m.in. w przenoszenie substancji z odległych miejsc w wypustkach nerwowych do perikarionu oraz w procesy degradacji, również nie wykazują preferencji do żadnego z przedziałów neuronalnych i można obserwować ich obecność zarówno w obszarze somatodendrytycznym, jak i aksonalnym [3].

Spośród białek o biegunowym rozmieszczeniu na uwagę zasługują białka wchodzące w skład cytoszkieletu neuronalnego, należące do rodziny białek związanych z mikrotubulami (MAPs – ang. *microtubule-associated proteins*) – patrz [19]. Wyłącznie w obszarze somatodendrytycznym występują wysokocząsteczkowe izoformy MAP-2 (rys. 1). Za specyficzny aksonalnie i charakterystyczny dla rosnących aksonów uznawany jest tzw. I typ ufosforylowania białka MAP-1B. Pozostałe białka MAP występują we wszystkich obszarach neuronu równomiernie (nieufosforylowana forma i typ II ufosforylowania MAP-1B), bądź są reprezentowane w obu przedziałach komórki, przy czym wykazują preferencję do jednego z nich. Są to: białko MAP-1A, które przeważa w dendrytach i białko Tau występujące głównie w aksonach. Dość długo uznawano białko Tau za specyficzne aksonalnie, obecnie jednak wiadomo, że dendrytyczne białko Tau jest w charakterystyczny sposób ufosforylowane, co utrudniało jego identyfikację metodami immunocytochemicznymi



[1]. Różnice w ufosforylowaniu białek w poszczególnych przedziałach neuronu mogą być wyrazem ograniczonego występowania kinaz w określonym przedziale neuronu lub różnic w ich lokalnej aktywności.

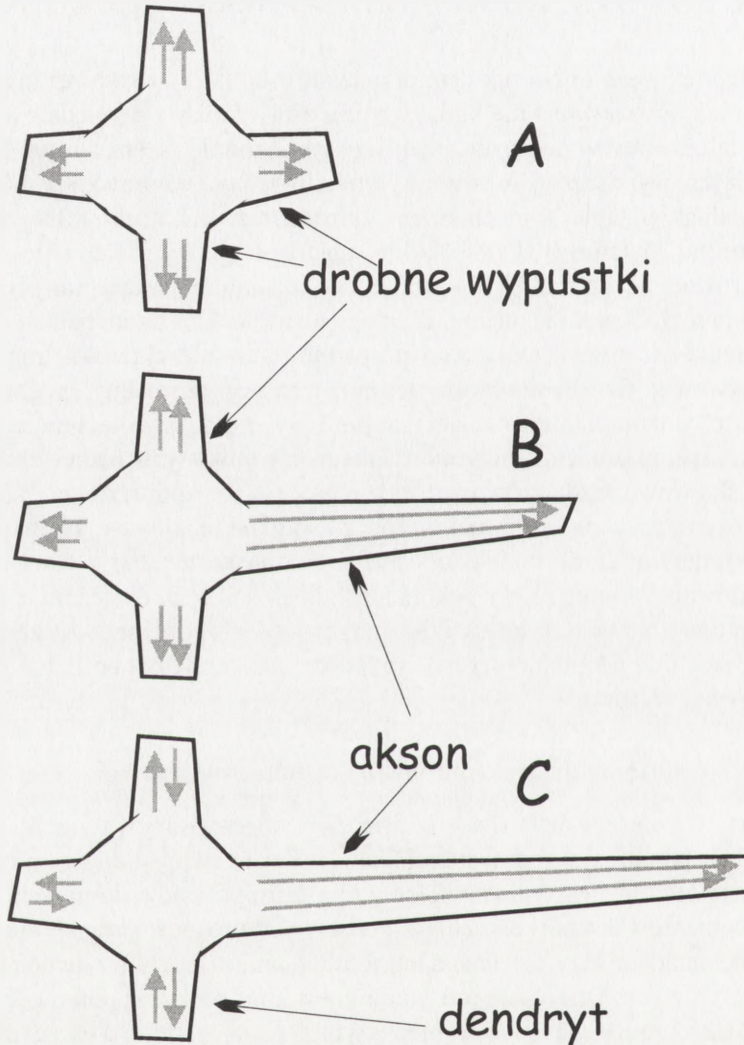
## JAK POWSTAJE PRZEDZIAŁOWOŚĆ NEURONU?

Jak widać, różnice w ultrastrukturze przedziałów komórki nerwowej są znaczące, a przyczyna ich powstawania nie budzi wątpliwości – każdy z przedziałów neuronu jest wyspecjalizowany w pełnieniu innej funkcji. Zgodnie zatem ze swoją funkcją każdy z nich jest wyposażony w struktury umożliwiające mu prawidłowe działanie. Rodzi się jednak pytanie o mechanizm wytwarzania ultrastrukturalnej przedziałowości neuronu, pytanie o sygnał, który „nakazuje” jednym elementom komórkowym kierować się do dendrytów, innym do aksonu, a jeszcze innym pozwala równomiernie rozlokować się na terenie całego neuronu. Obszarem badań, w którym zaczęto poszukiwać rozwiązania tego problemu, stały się zjawiska transportu w komórce nerwowej. Często stosowany termin „transport aksonalny” pochodzi stąd, że pionierskie badania nad tym zagadnieniem były, z przyczyn technicznych, prowadzone na tzw. aksonach olbrzymich. Obecnie wyniki tych badań ekstrapoluje się na zjawiska wewnątrzdendrytyczne, gdzie procesy transportu również zachodzą, choć być może odgrywają tam mniejszą rolę z uwagi na możliwość lokalnej syntezy białek (przynajmniej część białek nie musi być transportowana z ciała komórki) oraz zdecydowanie mniejsze do pokonania odległości w porównaniu z aksonem (aksony motoneuronów dużych ssaków mogą mieć długość przekraczającą 3 m, podczas gdy ich drzewka dendrytyczne rozpościerają się wokół perikarionu w promieniu najwyżej 3 mm).

### Orientacja mikrotubul w komórce nerwowej

Transport w komórce nerwowej w znacznej mierze odbywa się po szlakach wyznaczonych przebiegiem mikrotubul. Jak łatwo się domyślić, jego przebieg w każdym z przedziałów neuronu jest nieco inny, skoro prowadzi do niejednakowego rozdziału elementów komórkowych. U podstaw odmienności transportu dendrytycznego i aksonalnego leży orientacja mikrotubul, inna w każdym z dwóch rodzajów wypustek nerwowych. Orientacja mikrotubuli jest konsekwencją polarności samego polimeru. Mikrotubula ma swój koniec szybko rosnący, tzw. koniec plus, oraz wolno rosnący, tzw. koniec minus. W aksonie wszystkie mikrotubule są zorientowane końcem plus w kierunku zakończenia aksonalnego; odkomórkowo, natomiast w dendrytach mikrotubule wykazują mieszaną orientację, tzn. część z nich kieruje się końcem plus do ciała neuronu (dokomórkowo), a część odkomórkowo (jak

w aksonie) [2]. Odmienna orientacja mikrotubul w dendrytach i aksonie jest nabywana w procesie różnicowania neuronu (rys. 2). Różnicujący się neuron początkowo wypuszcza krótkie wypustki o jednakowej morfologii, w których wszystkie mikrotubule są skierowane końcem plus odkomórkowo. W pewnym stadium różnicowania jedna z wypustek zaczyna rosnąć szybciej niż pozostałe (z niej powstanie



RYSUNEK 2. Schemat różnicowania się komórki nerwowej: A – pojawiające się wypustki nie różnią się między sobą morfologią ani orientacją mikrotubul, B – jedna z wypustek zaczyna rosnąć szybciej od pozostałych, orientacja mikrotubul jest nadal jednakowa we wszystkich wypustkach, C – wyróżniony neuron ma dendryty zawierające mikrotubule o mieszanej orientacji oraz akson, w którym wszystkie mikrotubule są zorientowane odkomórkowo; strzałki symbolizują mikrotubule, a ich zwrot wskazuje na koniec plus mikrotubuli

akson), ale orientacja mikrotubul pozostaje nadal taka sama we wszystkich wypustkach. Następnie w wyróżnionym neuronie pojawiają się dendryty wyposażone w mikrotubule o mieszanej orientacji [26]. Przypuszcza się, że w procesie nabywania mieszanej orientacji przez mikrotubule dendrytyczne bierze udział białko motoryczne należące do nadrodziny kinezyn, tak zwane białko CHO1. Zostało ono opisane w różnych typach komórek dzielących się (np. w komórkach jajnikowych CHO chomika chińskiego, w owadach komórkach Sf9), gdzie w strefie środkowej wrzeczona podziałowego prawdopodobnie odpowiada za ruch ślizgowy względem siebie mikrotubul o przeciwnej orientacji. W hodowanych mysich komórkach obserwowano neuroblastomy (neuroblastoma to nowotwór złośliwy wywodzący się z pierwotnych komórek zwojowych), które w interfazie rozwijają dendryto- i aksonopodobne wypustki, białko to jest obecne w przedziale somatodendrytycznym, ale nie w aksonalnym, a zahamowanie jego ekspresji przy użyciu antysensowych oligonukleotydów hamuje wytwarzanie dendrytopodobnych, ale nie aksonopodobnych wypustek [24]. Dokładny mechanizm działania białka CHO1 w procesie ustalania mieszanej orientacji mikrotubul dendrytycznych nie jest jasny, można sobie jednak wyobrazić, że białko to rezydując u wejścia do dendrytów oraz na ich obszarze, transportuje mikrotubule skierowane końcem plus dokomórkowo wzdłuż mikrotubul o orientacji przeciwnej. Nadal bez odpowiedzi pozostaje pytanie, skąd bierze się „upodobanie” białka CHO1 do przedziału somatodendrytycznego.

### Transport wewnątrzkomórkowy

Każdy przedział neuronu jest wyposażony w zestaw mikrotubul o innej orientacji (jednorodnej w aksonie i mieszanej w dendrytach), wzdłuż których transportowane są elementy komórkowe, takie jak: obłonione organella komórkowe (mitochondria, siateczka śródplazmatyczna, elementy aparatu Golgiego oraz pęcherzyki o różnej zawartości i różnym składzie białkowym błony), kompleksy białkowe stanowiące surowiec do budowy cytoszkieletu oraz mRNA. Wędrując drogami wytyczonymi w komórce poszczególne elementy komórkowe odnajdują właściwe sobie miejsce. Transport wewnątrzkomórkowy w neuronie odbywa się w różnym tempie i w różnych kierunkach. Elementy cytoszkieletu przemieszczają się dzięki transportowi wolnemu, czyli w tempie 0,1–3,0 mm dziennie [15]. Wiadomo, że w ten sposób do miejsc swego przeznaczenia trafiają neurofilamenty i mikrotubule, choć ciągle przedmiotem kontrowersji jest forma, w jakiej składniki cytoszkieletu są transportowane. Wyniki pewnych badań sugerują transport w postaci polimeru, co oznacza, że neurofilamenty i mikrotubule są polimeryzowane na terenie perikarionu i jako gotowe struktury wędrują do wypustek neuronu [18]. Nowsze badania wskazują jednak, że zarówno mikrotubule, jak i neurofilamenty są w wypustkach nerwowych strukturami dynamicznymi, podlegającymi ciągłym procesom polimeryzacji i depolimeryzacji oraz że transportowi podlegają nie gotowe polimery, a ich elementy składowe: mono-

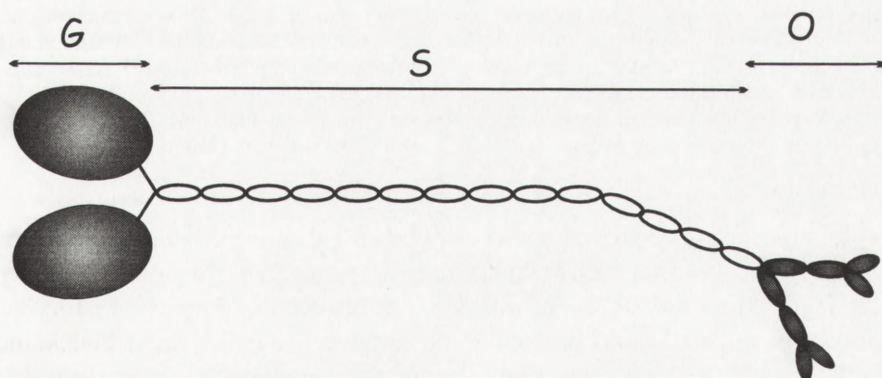


lub oligomery [20, 21]. Obecnie wielu autorów skłania się ku hipotezie łączącej obie teorie, według której dynamiczne fragmenty polimerów przemieszczają się wzdłuż wypustek nerwowych ulegając stale polimeryzacji i depolimeryzacji, skutkiem czego, zależnie od rodzaju i czułości zastosowanej metody eksperymentalnej, można obserwować bądź transport polimeru, bądź budujących go mono- lub oligomerów [28]. Próby identyfikacji białek motorycznych uczestniczących w transporcie wolnym nie przyniosły dotąd jednoznacznego rozwiązania, choć pewne doniesienia świadczą o możliwym udziale dyneiny cytoplazmatycznej [10].

Większość organelli komórkowych przemieszcza się w wypustkach neuronalnych w tempie 250–400 mm dziennie, tak zwanym szybkim transportem, który odbywa się dwukierunkowo: odkomórkowo (transport zstępujący), czyli w kierunku od ciała neuronu do zakończenia wypustki nerwowej, oraz dokomórkowo (transport wstępujący), czyli wstecznie, w kierunku do perikarionu [8]. Choć transport w obu kierunkach jest objęty terminem transportu szybkiego, to istnieją różnice w prędkości przemieszczania się organelli w zależności od kierunku ruchu; transport wstępujący zachodzi wolniej od transportu zstępującego i osiąga maksymalną wartość około 300 mm dziennie. Szybki transport zstępujący to ruch organelli obłonionych, w tym mitochondriów i pęcherzyków zawierających białka integralne błony, białka funkcjonalne (enzymy, neuropeptydy), fosfolipidy błonowe, cholesterol i gangliozyny. Szybki transport wstępujący przenosi pęcherzyki zawierające materiał egzogeny pobrany drogą endocytozy (np. czynniki troficzne) oraz takie, w których zawarty jest zużyty materiał komórkowy przeznaczony do degradacji lub powtórnego wykorzystania. Szybkość transportu poszczególnych organelli komórkowych jest różna i zależy od tego, jakie białko motoryczne bierze udział w transporcie (patrz tab. 1). Najszybciej przemieszczają się pęcherzyki synaptyczne i ich prekursorzy (1,5 m/s), również dużą prędkość osiąga transport mitochondriów (0,66  $\mu\text{m/s}$ ), natomiast wolniej poruszają się np. pęcherzyki związane z procesami degradacji, w tym lizosomy i ciała wielopęcherzykowe (0,2–0,5  $\mu\text{m/s}$ ). Dwukierunkowość szybkiego transportu jest możliwa dzięki istnieniu białek motorycznych należących do dwóch nadrodzin, z których każda obejmuje białka o odmiennej preferencji kierunku ruchu po mikrotubuli [4]. Białka motoryczne są ATP-azami, które przemieszczają się wzdłuż polimeru aktywującego (np. mikrotubuli), a siła potrzebna do generacji ich ruchu pochodzi z hydrolizy ATP – patrz [9] (istnieją również białka motoryczne o aktywności GTP-azowej, tzw. dynaminy, które odgrywają rolę w procesach endocytozy [27]). Białka należące do nadrodziny kinezyn obejmują kinezynę konwencjonalną oraz liczne białka pokrewne i wykazują w większości przypadków zdolność do poruszania się po mikrotubuli w kierunku jej końca plus. Wyjątek stanowi specyficzne dla tkanki nerwowej białko KIFC2, którego somatodendrytyczna lokalizacja oraz sekwencja aminokwasów wskazują, że po mikrotubuli porusza się ono w kierunku końca minus [24]. Aby jednak z całą pewnością stwierdzić, że kierunek ruchu KIFC2 jest przeciwny do kierunku ruchu większości kinezyn, ko-

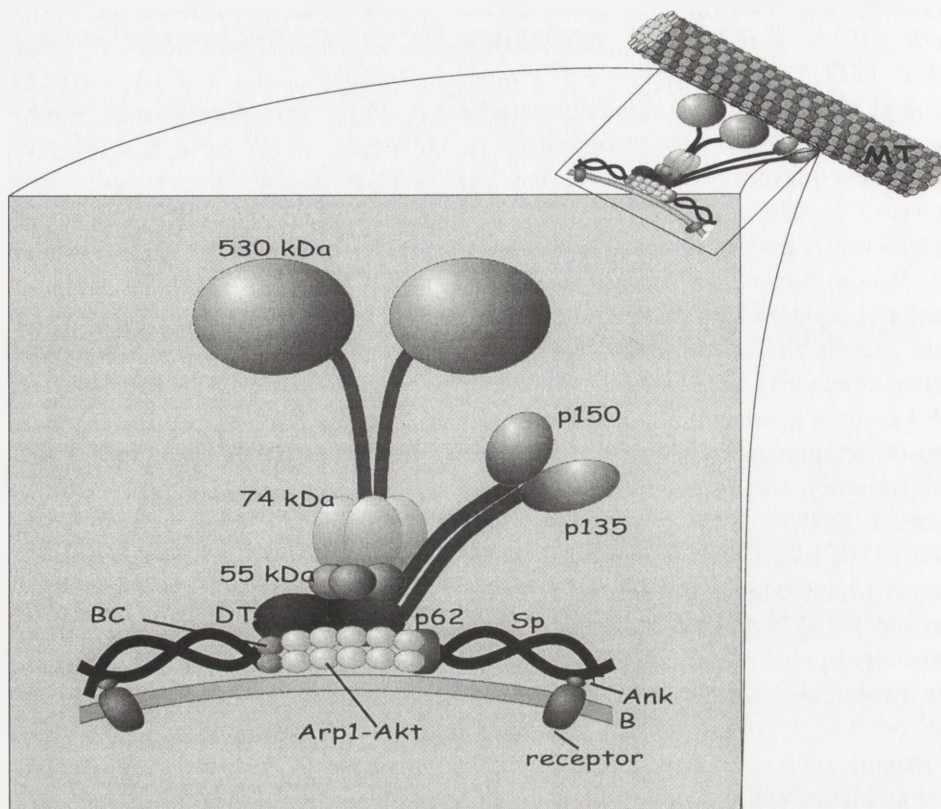
nieczne jest przeprowadzenie testu ruchliwości. Wśród białek z nadrodziny kinezyn, których występowanie stwierdzono w ośrodkowym układzie nerwowym, wymienić należy KIF1A, KIF1B, KIF2, KIF3A/B, KIF4, KIF5A, KIF5B, KIF5C, KIFC1, KIFC2, KIFC3 (patrz tabela 1). W cząsteczce każdego z tych białek wyróżnić można główkę stanowiącą domenę motoryczną, która przemieszcza się po mikrotubuli, fragment środkowy utworzony przez superhelisę oraz ogonek służący do przyłączenia transportowanego materiału (rys. 3). Sekwencja aminokwasów domeny motorycznej zachowuje duży stopień homologii pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami nadrodziny kinezyn, natomiast sekwencja ogonka wykazuje dużą zmienność. Panuje pogląd, że istnieje związek między określoną sekwencją ogonka a rodzajem przyłączanego materiału, a zatem że zmienność sekwencji warunkuje istnienie specyficzności wiązania określonego materiału przez określone białko z nadrodziny kinezyn [15, 16].

W kierunku minus po mikrotubuli porusza się dyneina cytoplazmatyczna, będąca przedstawicielem nadrodziny dynein. Dyneina cytoplazmatyczna do spełnienia swej funkcji motorycznej prawdopodobnie wymaga obecności dużego kompleksu białkowego o nazwie dynaktyna (rys. 4). W skład kompleksu dynaktyny wchodzi; białka p150, p135, p62, dynamityna, krótki filament zbudowany z 9 cząsteczek białka Arp1 i z jednego monomeru aktyny oraz białko czapeczki. Dynaktyna może uczestniczyć w tworzeniu połączenia między dyneiną cytoplazmatyczną a transportowanym przez nią organellum komórkowym. O ile dyneina cytoplazmatyczna może swobodnie przemieszczać się w obu kierunkach w obszarze dendrytycznym, gdzie orientacja mikrotubul ma charakter mieszany, o tyle w aksonie możliwy jest jedynie ruch wsteczny dyneiny cytoplazmatycznej. Zatem w aksonie białko to bierze udział w transporcie wstecznym i aby spełniać swoją funkcję musi samo zostać przetransportowane do zakończenia aksonalnego przez jakieś inne białko motoryczne wędrujące do końca plus mikrotubuli [15, 16].



RYSUNEK 3. Schemat budowy cząsteczki kinezyny: główka (G) i środkowy fragment cząsteczki o strukturze superhelisy (S) są zbudowane z ciężkich łańcuchów o masie cząsteczkowej 120 kDa, ogonek (O) jest zbudowany z lekkich łańcuchów o masie cząsteczkowej 64 kDa





RYSUNEK 4. Schemat wiązania między błoną organelum komórkowego a kompleksem białkowym utworzonym przez dyneinę cytoplazmatyczną i dynaktynę. Dyneina cytoplazmatyczna jest zbudowana z dwóch łańcuchów ciężkich (530 kDa), trzech łańcuchów pośrednich (74 kDa) i czterech łańcuchów lekkich (55 kDa). W skład kompleksu dynaktyny wchodzi białko p150, p135, p62, dynamityna (DT), krótki filament utworzony przez 9 cząsteczek białka Arp1 i jeden monomer aktyny (Arp1-Akt) oraz białko czapeczki (BC). Kompleks dyneiny cytoplazmatycznej i dynaktyny wiąże się z mikrotubulą (MT) przez domenę motoryczną utworzoną z ciężkich łańcuchów dyneiny i przez białko p150, a z receptorem w błonie (B) transportowanego organelum za pośrednictwem spektryny (Sp) i ankiryny (Ank)

Procesy transportu wewnątrzkomórkowego są regulowane przez różnorakie czynniki. Stan ufosforylowania cząsteczki białka motorycznego może niewątpliwie wpływać na jego skłonność do związania się z mikrotubulą. Procesy fosforylacji i defosforylacji mogą ponadto prowadzić do aktywacji i inaktywacji białek motorycznych. Innym mechanizmem regulującym aktywność białek motorycznych są oddziaływania z małymi białkami G. Wreszcie nie małą rolę w regulacji przebiegu transportu odgrywa współzawodnictwo białek MAP z białkami motorycznymi o



TABELA 1. Białka z nadrodziny kinezyn zidentyfikowane w ośrodkowym układzie nerwowym gryzoni

Nazwa	Masa cząsteczkowa	Kierunek i prędkość ruchu	Ekspresja	Transportowana struktura
KIF1A	192 kDa	MT+ 1,5 $\mu\text{m/s}$	specyficzne neuronalnie	prekursory pęcherzyków synaptycznych
KIF1B	130 kDa	MT+ 0,66 $\mu\text{m/s}$	obecne powszechnie	mitochondria
KIF2	81 kDa	MT+ 0,47 $\mu\text{m/s}$	obecne powszechnie, obficie w tkance młodocianych zwierząt, zanika u dorosłych	pęcherzyki inne od prekursorów pęcherzyków synaptycznych
KIF3A/3B	80/85 kDa	MT+ 0,3 $\mu\text{m/s}$	obficie występuje w neuronach, ale obecne powszechnie	pęcherzyki (90–160 nm) inne od prekursorów pęcherzyków synaptycznych
KIF4	140 kDa	MT+ 0,2 $\mu\text{m/s}$	obecne powszechnie, obficie w neuronach młodocianych zwierząt, zanika u dorosłych	pęcherzyki
KIFC2	86 kDa	MT (-)*	specyficzne neuronalnie	ciałka wielopęcherzykowe

\*KIFC2 porusza się prawdopodobnie w kierunku końca minus mikrotubuli, jednak ta hipoteza musi pozostać potwierdzona testem ruchliwości.

miejsce wiązania na mikrotubuli. Stwierdzono, że białka MAP-2 lub Tau mogą wypierać białka motoryczne z mikrotubul. W przeprowadzonych doświadczeniach pokazano, że przemieszczanie się mikrotubul względem siebie indukowane obecnością kinezyiny lub dyneiny cytoplazmatycznej ulega zahamowaniu, gdy białka te zostaną wyparte ze swych miejsc wiązania na mikrotubuli przez MAP-2 lub Tau [13].

## UWAGI KOŃCOWE

Istnienie przedziałowości neuronu na poziomie ultrastruktury komórki jest wynikiem zachodzących w nim procesów transportu, dzięki którym elementy komórkowe docierają do właściwych sobie miejsc w komórce nerwowej [3]. Dwukierunkowy transport wzdłuż mikrotubul jest zapewniony przez białka motoryczne o określonej preferencji kierunku ruchu: kinezyiny poruszające się na ogół w kierunku końca plus mikrotubuli i dyneinę cytoplazmatyczną poruszającą się w kierunku końca minus. Łatwo zauważyć, że procesy transportu muszą zachodzić nieco odmiennie w aksonach wyposażonych w mikrotubule o jednorodnej orientacji niż w dendrytach mających zestaw mikrotubul o orientacji mieszanej. Mechanizmy transportu są skomplikowane, a ich regulacja nie ogranicza się do istnienia dwóch typów białek motorycznych. O ile bowiem można sobie wyobrazić, że do aksonów nie będą miały wstępu elementy komórkowe transportowane po mikrotubuli w kierunku jej końca minus (np. aparat Golgiego), o tyle trudniej wyjaśnić nieobecność pewnych struktur, np. pęcherzyków synaptycznych, w dendrytach, gdzie przecież obecne są mikrotubule o każdej z dwóch możliwych orientacji. Być może istotną rolę odgrywają tutaj niezidentyfikowane jeszcze mechanizmy zakotwiczania organelli w docelowych miejscach komórki. Organella komórkowe wchodziłyby zatem do wszystkich wypustek drogą transportu skierowanego do końca plus mikrotubul. W aksonach ich wędrówka kończyłaby się wraz z dotarciem do zakończenia aksonalnego, brak tam bowiem mikrotubul o przeciwnej orientacji, po których mogłaby odbywać się droga powrotna. W dendrytach natomiast organella transportowane w kierunku końca plus, po osiągnięciu końcowego odcinka wypustki, kontynuowałyby wędrówkę w kierunku ciała neuronu po mikrotubulach skierowanych końcem plus dokomórkowo. Takie elementy komórkowe byłyby w efekcie eliminowane z dendrytów. Pewne organella byłyby natomiast w dendrytach zatrzymywane za pośrednictwem białek kotwiczających. W tym kontekście należy również zwrócić uwagę na konieczność istnienia specyficzności wiązania struktur komórkowych przez białka motoryczne o określonym kierunku ruchu. Wydaje się, że istotnie taka specyficzność wiązania zachodzi, przynajmniej w przypadku kinezyn, i jest konsekwencją dużej zmienności sekwencji domeny wiążącej organellum komórkowe.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] AVILA J, DOMINGUEZ J, DIAZ-NIDO J. Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 1994; **38**: 13–25.
- [2] BAAS PW, DEITCH JS, BLACK MM, BANKER GA. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neuron: Uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8335–8339.
- [3] BLACK MM, BAAS PW. The basis of polarity in neurons. *Trends Neurosci* 1989; **12**: 211–214.
- [4] BRADY ST, SPERRY AO. Biochemical and functional diversity of microtubule motors in the nervous system. *Curr Op Neurobiol* 1995; **5**: 551–558.
- [5] BURGIN KE, WAXHAM MN, RICKLING S, WESTGATE SA, MOBLEY WC, KELL PT. *In situ* hybridization histochemistry of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci* 1990; **10**: 1788–1798.
- [6] CAREW TJ. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 1996; **16**: 5–8.
- [7] CRINO P, KHODAKHAH K, BECKER K, GINSBERG S, HEMBY S, EBERWINE J. Presence and phosphorylation of transcription factors in developing dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2313–2318.
- [8] COY DL, HOWARD J. Organelle transport and sorting in axons. *Curr Op Neurobiol* 1994; **4**: 662–667.
- [9] DABROWSKA R. Cytoplazmatyczne białka motoryczne. *Post Biochem* 1994; **40**: 96–105.
- [10] DILLMAN JF, DABNEY LP, PFISTER KK. Cytoplasmic dynein is associated with slow axonal transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 141–144.
- [11] GARNER CC, TUCKER RP, MATUS A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal MAP-2 in dendrites. *Nature* 1988; **336**: 674–679.
- [12] GELOT A, MOREAU J, BEN ARI Y, POLLARD H. Alpha-brain spectrin mRNA belongs to the population of intradendritically transported mRNAs. *Neuroreport* 1996; **8**: 113–116.
- [13] HAGIWARA H, YORIFUJI H, SATO-YOSHITAKE R, HIROKAWA N. Competition between motor molecules (kinesin and cytoplasmic dynein) and fibrous microtubule-associated proteins in binding to microtubules. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3581–3589.
- [14] HASSON T, MOOSEKER MS. The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Curr Op Neurobiol* 1997; **7**: 615–623.
- [15] HIROKAWA N. The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Curr Op Neurobiol* 1997; **7**: 605–614.
- [16] HIROKAWA N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 1998; **279**: 519–526.
- [17] KENNEDY MB. The postsynaptic density. *Curr Opin Neurobiol* 1993; **3**: 732–737.
- [18] LASEK RJ. Polymer sliding in axons. *J Cell Biol* 1986; **5** (suppl): 161–179.
- [19] MAJEWSKA B. Białko MAP-2 w ośrodkowym układzie nerwowym. *Post Biochem* 1995; **41**: 175–182.
- [20] OKABE S, HIROKAWA N. Turnover of fluorescently labeled tubulin and actin in the axon. *Nature* 1990; **343**: 479–482.
- [21] OKABE S, HIROKAWA N. Dynamics of the neuronal intermediate filaments. *J Cell Biol* 1993; **121**: 375–396.
- [22] PRAKASH N, FEHR S, MOHR E, RICHTER D. Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. *Eur J Neurosci* 1997; **9**: 523–532.



- [23] SAITO N, YASUSHIO O, YASUKON, YOSHIHIRO K, SATORU K, HIROKAWA N. KIFC2 is a novel neuro-specific C-terminal type kinesin superfamily motor for dendritic transport of multivesicular body-like organelles. *Neuron* 1997; **18**: 425–438.
- [24] SHARP DJ, YU W, FERHAT L, KURIYAMA R, RUEGER DC, BAAS PW. Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* 1997; **138**: 833–843.
- [25] STEWARD O, BANKER GA. Getting message from the gene to the synapse: sorting and intracellular transport of RNA in neurons. *Trends Neurosci* 1992; **15**: 180–186.
- [26] SCHOENEFELD TA, OBAR RA. Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 1994; **151**: 67–139.
- [27] URRITA R, HENLEY JR, COOK T, McNIVEN MA. The dynamics: Redundant or distinct function for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 377–384.
- [28] YU W, SCHWEI MJ, BAAS PW. Microtubule transport and assembly during axon growth. *J Cell Biol* 1996; **133**: 151–157.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 17.06. 1998 r.*

*Przyjęto: 31.08. 1998 r.*

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

## PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU FAGOCYTARNEGO: OD AGREGACJI RECEPTORÓW DO PRZEBUDOWY CYTOSZKIELETU

### SIGNAL TRANSDUCTION DURING PHAGOCYTOSIS: FROM RECEPTOR CLUSTERING TO CYTOSKELETON REORGANIZATION

Katarzyna KWIATKOWSKA, Andrzej SOBOTA

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

*Streszczenie:* Fagocytoza jest zapoczątkowana przez oddziaływanie wyspecjalizowanych receptorów błonowych fagocytu z odpowiednimi ligandami na powierzchni pobieranej cząstki. Aktywacja receptorów skorelowana jest z ich agregacją – wstępnym etapem generacji sygnału fagocytarnego, który prowadzi ostatecznie do przebudowy podbłonowego układu filamentów aktynowych i internalizacji cząstki. Agregacji receptorów towarzyszy ich fosforylacja, po której następuje kaskada fosforylacji kolejnych białek. Współwystępuje z nią aktywacja enzymów modyfikujących lipidy błonowe, takich jak: fosfolipaza C, D i A<sub>2</sub> oraz PI 3-kinaza. W trakcie fagocytozy aktywowane są także monomeryczne GTPazy z rodziny Rho i ARF, które lokalnie modulują organizację cytoszkieletu aktynowego.

*Słowa kluczowe:* fagocytoza, receptory Fc, receptor C3, agregacja receptorów, kinaza tyrozynowa, kinaza białkowa C, PI 3-kinaza, monomeryczne GTPazy.

*Summary:* Phagocytosis is initiated by interaction of specific plasma membrane receptors with ligands on the surface of particles. Activation of the receptors is correlated with their clustering, a primary event in generation of a signal that eventually leads to reorganization of peripheral actin-based cytoskeleton and uptake of bound particles. Clustering of the receptors is accompanied by their phosphorylation that is followed by a cascade of phosphorylation of other proteins. Concomitantly, lipid modifying enzymes, phospholipase C, D, A<sub>2</sub> and PI 3-kinase, are activated. During phagocytosis activated are also monomeric GTPases of Rho and ARF families, which locally modulate organization of the actin-based cytoskeleton.

\*Praca finansowana w ramach projektu badawczego KBN, PB 0082/P2/94/07 i działalności statutowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego.

**Key words:** phagocytosis, Fc receptors, receptor C3, aggregation of receptors, tyrosine kinase, protein kinase C, PI 3-kinase, monomeric GTPase.

**Wykaz stosowanych skrótów:** **BCR** (*B-cell antigen-receptor*) – antygenowy receptor limfocytów B; **[Ca<sup>2+</sup>]**<sub>i</sub> – wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia; **CR** – receptor dla dopełniacza; **domena SH2** (*Src homology region 2*) – domena homologiczna z regionem 2 kinazy Src; **domena SH3** (*Src homology region 3*) – domena homologiczna z regionem 3 kinazy Src; **DAG** (*diacylglycerol*) – dwuacyloglicerol; **FcγR** – receptor Fcγ; **IgG** – immunoglobulina G; **ITAM** (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*); **IP<sub>3</sub>** (*inositol 1,4,5-trisphosphate*) – trójfosforan inozytolu; **PIP<sub>2</sub>** (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) – fosfatydyloinozytolo 4,5-dwufosforan; **PIP<sub>3</sub>** (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) – fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforan; **PIP 5-kinaza** (*phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase*) – fosfatydyloinozytolo-5-kinaza; **PI 3-kinaza** (*phosphatidylinositol 3-kinase*) – fosfatydyloinozytolo 3-kinaza; **PLC** (*phospholipase C*) – fosfolipaza C; **PKC** (*protein kinase C*) – kinaza białkowa C; **PTK** (*protein tyrosine kinase*) – białkowa kinaza tyrozynowa; **TCR** (*T-cell antigen-receptor*) – antygenowy receptor limfocytów T.

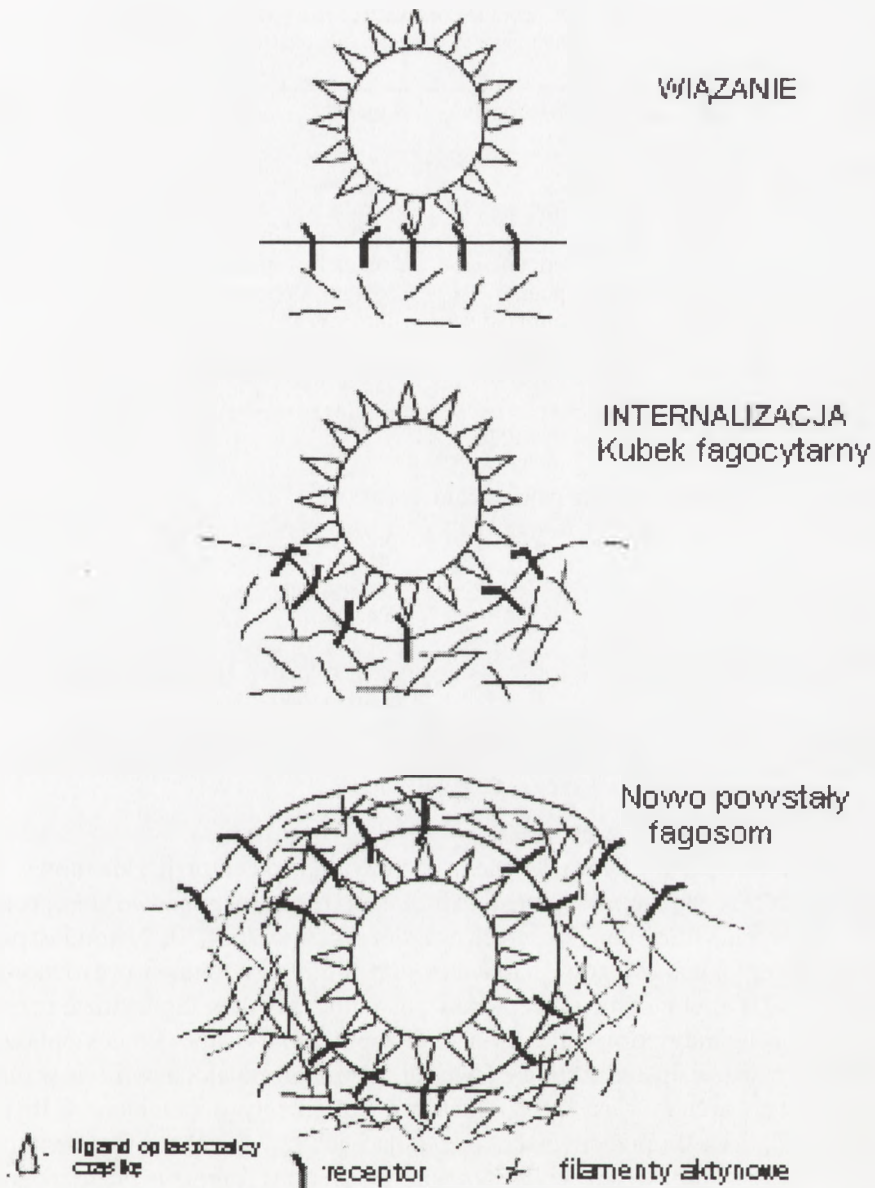
Fagocytoza to zjawisko pobierania cząstek o średnicy powyżej 0,5 μm przez komórki. Zapoczątkowana jest przez oddziaływanie określonych molekuł, ligandów, zlokalizowanych na powierzchni wiązanej cząstki z receptorami błonowymi komórki fagocytydującej. Interakcja ligand-receptor indukuje uruchomienie szlaków sygnałowych, które prowadzą do lokalnej przebudowy sieci filamentów aktynowych – układu motorycznego odpowiedzialnego za internalizację cząstki (rys. 1). Fagocytoza jest jednym z szeregu procesów internalizacji egzogennych substancji przez komórki. Zaangażowanie cytoszkieletu aktynowego odróżnia ją od pinocytozy, w której biorą udział pęcherzyki opłaszczane przez klatrynę, pęcherzyki nieopłaszczane lub kawiole, a udział receptorów w wiązaniu cząstki różni fagocytozę od makropinocytozy.

U organizmów niższych, takich jak pierwotniaki i śluzowce, fagocytoza jest sposobem pobierania pokarmu. W wyższych *Eukaryota* komórki zdolne do fagocytozy usuwają mikroorganizmy, obumarłe komórki i zanieczyszczenia, stanowiąc istotny element systemu obronnego organizmu. Funkcje te spełniają makrofagi, monocyty i neutrofile, określane często jako fagocyty profesjonalne [69]. Komórki, takie jak: fibroblasty i komórki nabłonkowe, które w ograniczonym stopniu zdolne są do pobierania cząstek, tworzą grupę fagocytów nieprofesjonalnych. Zdolność pobierania różnorodnych cząstek przez fagocyty „profesjonalne” uwarunkowana jest udziałem wyspecjalizowanych receptorów inicjujących fagocytozę. W „nieprofesjonalnych” fagocytach ich rolę przejąć mogą receptory odpowiedzialne za inne funkcje komórki.

## RECEPTORY BIORĄCE UDZIAŁ W FAGOCYTOZIE I ICH AGREGACJA W TRAKCIE WIĄZANIA CZĄSTKI

W tabeli 1 zebrano najlepiej dotąd scharakteryzowane receptory zaangażowane w pobieranie cząstek przez ludzkie neutrofile, makrofagi i monocyty. Niektóre z tych receptorów wiążą ligandy, które są integralną częścią składową powierzchni





RYSUNEK 1. Schemat przebiegu fagocytozy obrazujący dwa zasadnicze etapy procesu – wiązanie cząstki i jej internalizację. Cząstka wiązana jest z powierzchnią fagocyty przez oddziaływanie specyficznych ligandów zlokalizowanych na jej powierzchni z błonowymi receptorami komórki. Prowadzi to do generacji sygnału fagocytnego, warunkującego lokalną polimeryzację i przebudowę układu filamentów aktynowych. W następstwie dochodzi do internalizacji cząstki, najpierw w obrębie kubka fagocytnego, który następnie zamyka się tworząc fagosom. W przypadku fagocytozy zależnej od receptorów Fcy kubek fagocytny tworzą wypustki błony komórkowej, które stopniowo otaczają cząstkę. Natomiast w czasie fagocytozy zależnej od receptora C3 dla dopełniacza kubek tworzy się przez zagłębienie powierzchni komórki

TABELA 1. Wybrane receptory ludzkich „fagocytów profesjonalnych” zaangażowane w pobieranie cząstek

Receptor	Inna nazwa	Nadrodzina	Ligand	Literatura
<b>Wiążące opsoniny</b>				
FcγRI	CD64	immunoglobuliny	monomeryczne IgG	[25,73]
FcγRII	CD32	buliny	kompleksy immunologiczne IgG	[25,73]
FcγRIII	CD16	immunoglobuliny	kompleksy immunologiczne IgG	[25,73]
CR3 <sup>(a)</sup>	CD11b/CD18	buliny	składnik dopełniacza iC3b	[14]
	Mac-1, α <sub>M</sub> β <sub>2</sub>	immunoglobuliny	fibrynogen	
α <sub>5</sub> β <sub>1</sub>	VLA-5	buliny	fibronektyna	[11]
α <sub>v</sub> β <sub>3</sub>		integryny	witronektyna/fibronektyna	[11,82]
		integryny		
		integryny		
<b>Wiążące integralne składniki powierzchni cząstki</b>				
Mannozowy		lektyny	reszty cukrowe: mannozy, fukozowy i N-acetyl-D-glukozaminy	[30]
β-glukanowy			β-glukan	[24]
<i>Scavenger</i> receptor makrofagowy klasa A (typ I i II)			polianiony (np. niektóre lipidy ścian bakterii i starzejących się erytrocytów)	[76]

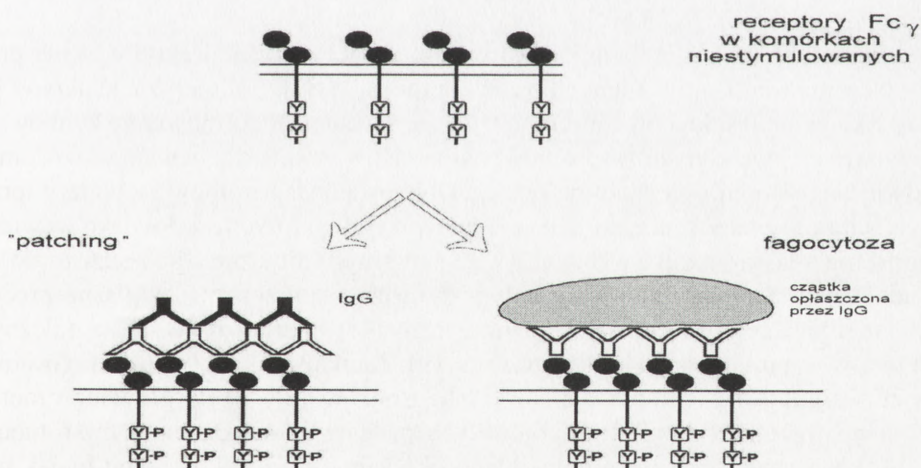
<sup>(a)</sup> wśród innych ligandów receptora C3 jest β-glukan.

pobieranych cząstek. Należą do nich, na przykład, receptor β-glukanowy i mannozowy, które rozpoznają odpowiednio β-glukan i reszty mannozowe glikoproteidów, składników ścian i błon komórkowych mikroorganizmów [24,30]. Natomiast poznany ostatnio receptor makrofagowy *scavenger* wiąże domeny polianionowe różnorodnych cząstek [76]. Odrębna grupa receptorów pośredniczących w fagocytozie rozpoznaje specyficzne ligandy, którymi cząstki są wstępnie pokrywane. Proces opłaszczania cząstek nazywa się opsonizacją, a głównymi opsoninami znajdującymi się w surowicy krwi są przeciwciała klasy IgG i IgM oraz fragmenty dopełniacza C3b i iC3b. Opłaszczając cząstki przeciwciała oddziałują z ich powierzchnią fragmentami Fab, eksponując do środowiska wolną domenę Fc. Wolny fragment Fc rozpoznawany jest przez specyficzne receptory, spośród których w kontekście fagocytozy najintensywniej badane są receptory Fcγ, rozpoznające Fc fragment przeciwciał klasy IgG. Wyodrębniono trzy klasy receptorów Fcγ, które należą do nadrodziny immunoglobulin, różnią się jednak między sobą budową, powinowactwem do IgG i występowaniem w komórkach hematopoetycznych [73]. Wśród receptorów dla dopełniacza, zaangażowanych w fagocytozę, największą uwagę skupiał dotąd re-

ceptor C3 dla fragmentu iC3b dopełniacza, który w odróżnieniu od receptorów Fc $\gamma$  jest integryną [14]. Do nadrodziny integryn należą także receptory dla fibronektyny i witronektyny [11,82].

Wydaje się, że niezależnie od natury receptora pierwszym zjawiskiem indukowanym podczas wiązania odpowiedniego ligandu jest agregacja tego receptora. W odniesieniu do receptorów Fc $\gamma$  sugestię taką potwierdzają obserwacje, że szereg procesów wewnątrzkomórkowych, towarzyszących fagocytozie cząstek opłaszczonych przez IgG można wywołać w warunkach doświadczalnych bez obecności cząstek sieciując receptory Fc $\gamma$  przez swoiste przeciwciała (rys. 2). Wywołana tą drogą agregacja receptorów określana jest angielskim terminem *patching* (ang. *patch* – łatka) i opisana była wcześniej jako wstępny etap *cappingu* (ang. *cap* – czapka), czyli biegunowej akumulacji usieciowanych receptorów [91]. W czasie agregacji receptorów Fc $\gamma$ , wywołanej ich usieciowaniem, dochodzi między innymi do wzmożonej fosforylacji reszt tyrozynowych szeregu białek, w tym samych receptorów, aktywacji fosfolipazy C (PLC) $\gamma$  i wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia [52,60,72]. Procesy te są również elementami sygnału fagocytarnego i omówione są szczegółowo poniżej.

Fagocytozie cząstek opłaszczonych przez iC3b także towarzyszy agregacja dopełniaczowego receptora C3 wokół powstającego fagosomu, a proces ten związany może być z fosforylacją reszt serynowych receptora [3,16,29].



RYSUNEK 2. Agregacja receptorów w czasie *patchingu* i fagocytozy. Receptory, na przykład Fc $\gamma$ , rozmieszczone równomiernie w błonie komórek niestymulowanych ulegają agregacji w trakcie wiązania wielowartościowych ligandów, w tym przeciwciał – *patching* bądź podczas wiązania i internalizacji cząstki – fagocytoza. W obu przypadkach generowane są podobne sygnały wewnątrzkomórkowe, między innymi zachodzi fosforylacja reszt tyrozynowych receptorów



Stwierdzono, że również w przypadku chemicznych komórek nabłonkowych linii hodowlanej CHO, reprezentujących fagocyty „nieprofesjonalne”, efektywność internalizacji cząstek zymosanu zwiększa wstępne opłaszczenie tych cząstek czterowartościową konkanawaliną A, która sieciuje powierzchniowe glikoproteidy komórek CHO [94]. Te obserwacje ponownie wskazują na konieczność agregacji receptorów dla zapoczątkowania fagocytozy.

## UDZIAŁ AKTYNY I BIAŁEK JĄ WIĄŻĄCYCH W FAGOCYTOZIE

Zakłada się, że agregacja receptorów jest zjawiskiem indukującym powstanie sygnału fagocytarnego, który wywołuje lokalną przebudowę podbłonowego cytoszkieletu aktynowego prowadzącą do pobrania cząstki. Zachodząca przy udziale aktyny internalizacja wymaga przypuszczalnie postępującej akumulacji receptorów w rejonie wiązanej cząstki. Nowo nagromadzone receptory działają na zasadzie „zamka błyskawicznego” [42] i wiążą kolejne molekuly ligandu na powierzchni cząstki wzmacniając jej interakcję z komórką (rys. 1).

Dwa klasyczne argumenty dowodzące udziału filamentów aktynowych w fagocytozie to:

- (1) lokalna akumulacja mikrofilamentów wokół pobieranej cząstki;
- (2) hamowanie fagocytozy przez cytochalazynę B, czynnik wywołujący depolimeryzację aktyny [6,38,99].

Akumulacja mikrofilamentów jest wynikiem polimeryzacji aktyny, a nie przemieszczenia filamentów z innych partii komórki [38,83]. Polimeryzacja aktyny jest zjawiskiem przejściowym, obserwuje się ją na etapach formowania kubków fagocytarnych i wczesnych fagosomów, natomiast w trakcie dojrzewania fagosomów aktyna ulega stopniowej depolimeryzacji. Dojrzewanie fagosomów zachodzi poprzez serię ich fuzji z endosomami i lizosomami, w wyniku których środowisko wewnątrz fagosomu zakwasza się i wzbogaca w enzymy hydrolityczne. Prowadzi to do degradacji pobranej cząstki w powstałym tą drogą fagolizosomie. Opisane procesy fuzji regulowane są przy udziale monomerycznych i trimerycznych GTPaz, zależnych od jonów wapnia aneksyn i fosfolipazy A<sub>2</sub> [9]. Zanik otoczki aktynowej fagosomów może warunkować ich sprawną fuzję z lizosomami [8], a rolę głównego motoru w wewnątrzkomórkowym transporcie tych pęcherzyków przejmują mikrotubule.

Wokół wczesnych fagosomów zidentyfikowano dotąd kilkadziesiąt białek wiążących aktynę, które mogą decydować o stopniu polimeryzacji aktyny, jej przestrzennej organizacji i interakcji z receptorami błonowymi. Niektóre z tych białek przedstawiono w tabeli 2. Uwagę zwraca obecność taliny, paksyliny, winkuliny i  $\alpha$ -aktyniny, wchodzących też w skład kompleksu białek wiążących filamenty

TABELA 2. Wybrane białka wiążące aktynę zlokalizowane wokół fagosomów

Białko	Receptor	Komórki	Literatura
Talina	Fc $\gamma$ , CR, mannozowy i $\beta$ -glukanowy	makrofagi mysie, mysie komórki makrofagopodobne linii J774	[2,3,37]
Paksylina	Fc $\gamma$ , CR	makrofagi mysie	[3,40]
Winkulina	Fc $\gamma$ , CR	makrofagi mysie	[3]
$\alpha$ -aktylina <sup>(a)</sup>	Fc $\gamma$ , CR	makrofagi mysie	[3]
Filamina	mannozowy i $\beta$ -glukanowy	makrofagi królicze	[85]
Spektryna	mannozowy(?)	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	[57]
Koronina	niezidentyfikowany	<i>Dictyostelium discoideum</i>	[62]
ABP-120	niezidentyfikowany	<i>Dictyostelium discoideum</i>	[21]
Białko 30 kDa <sup>(b)</sup>	niezidentyfikowany	<i>Dictyostelium discoideum</i>	[36]
Aneksyny I–V	Fc $\gamma$ , niezidentyfikowany	mysie komórki makrofagopodobne linii J774	[31]
MARCKS	Fc $\gamma$ , CR, mannozowy i $\beta$ -glukanowy	makrofagi mysie	[2,3]
Miozyna I	mannozowy i $\beta$ -glukanowy niezidentyfikowany	makrofagi mysie <i>Dictyostelium discoideum</i>	[2] [35]
Miozyna IB	mannozowy(?)	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	[7]

<sup>(a)</sup> Furukawa i Fechtmeier [36] stwierdzają obecność  $\alpha$ -aktyliny wokół uformowanych fagosomów, ale nie kubków fagocytarnych, a Maniak et al. [62] brak akumulacji tego białka wokół internalizowanych cząstek.

<sup>(b)</sup> białko organizujące filamenty aktynowe w wiązki.

aktynowe z integrzynami w miejscach kontaktu komórki z podłożem [18]. Jednakże w przypadku fagocytozy obecność tych białek nie ogranicza się do fagosomów formowanych przy udziale integrzynowego receptora dla dopełniacza. Innemu białku – miozynie I – przypisuje się rolę motoru napędzającego ruch mikrofilamentów w pseudopodiach, które formują kubek fagocytarny [7,35].

Aktywny udział niektórych z białek wiążących aktynę w fagocytozie potwierdziły prace na otrzymanych drogą inżynierii genetycznej mutantach *Dictyostelium discoideum*. Upośledzenie lub zanik zdolności fagocytarnych stwierdzono w komórkach mutantów pozbawionych taliny, koroniny i ABP-120, białka sieciującego mikrofilamenty oraz w podwójnym mutancie pozbawionym białka ABP-120 i  $\alpha$ -aktyliny [21,62,68,79]. Natomiast w komórkach mutantu pozbawionego klasycznej miozyny II nie obserwowano zaburzeń w fagocytozie [28,34]. Wyniki te pozostają w zgodzie z obserwacjami mikroskopowymi o braku akumulacji miozyny II w miejscach fagocytozy [35] i zdają się wykluczać udział tego białka w internalizacji cząstek.

## SZLAKI PRZEKAZYWANIA SYGNAŁU FAGOCYTARNEGO

Przebudowa cytoszkieletu aktywnego i internalizacja cząstki jest ostateczną wypadkową szeregu reakcji wewnątrzkomórkowych uruchamianych w czasie oddziaływania cząstki z receptorami. Stymulacja receptorów zaangażowanych w fagocytozę wywołuje aktywację kinaz tyrozynowych oraz aktywację enzymów modyfikujących lipidy błonowe, takich jak: fosfolipaza C, D, A<sub>2</sub> i fosfatydyloinozytolo-3-kinaza (PI 3-kinaza). Uwalniane przy ich udziale przekazniki drugiego rzędu: trójfosforan inozytoli (IP<sub>3</sub>), dwuacyloglicerol (DAG), jony wapnia, kwas arachidonowy, fosfatydyloinozytolo 3,4,5,-trójfosforan (PIP<sub>3</sub>) modyfikują kolejne enzymy, wśród nich serynowo/treoninową kinazę C (PKC). Udział lipidów błony komórkowej i enzymów je modyfikujących zapewnia lokalny charakter odpowiedzi komórki prowadzącej do miejscowej przebudowy cytoszkieletu aktywnego. Istotną rolę w reorganizacji podbłonowego układu filamentów aktywnych odgrywają monomeryczne GTPazy z rodziny Rho i ARF.

Wiedza na temat szlaków przekazywania sygnału fagocytarnego jest obszerna, niewiele natomiast wiadomo o wzajemnych relacjach tych szlaków. Prace nad tym problemem utrudnia współwystępowanie i współdziałanie różnorodnych receptorów w komórkach, a także wielość uruchamianych sygnałów, z których część indukuje procesy towarzyszące fagocytozie, takie jak: aktywacja oksydazy NADPH i produkcja nadtlenu ułatwiających degradację wchłoniętych mikroorganizmów oraz synteza cytokin. Problemy te są omówione bliżej w kilku pracach przeglądowych [25,84]. Przedstawiona poniżej charakterystyka głównych elementów sygnału fagocytarnego wskazuje na swoistość mechanizmów regulujących fagocytozę zależnych od typu zaangażowanego w nią receptora.

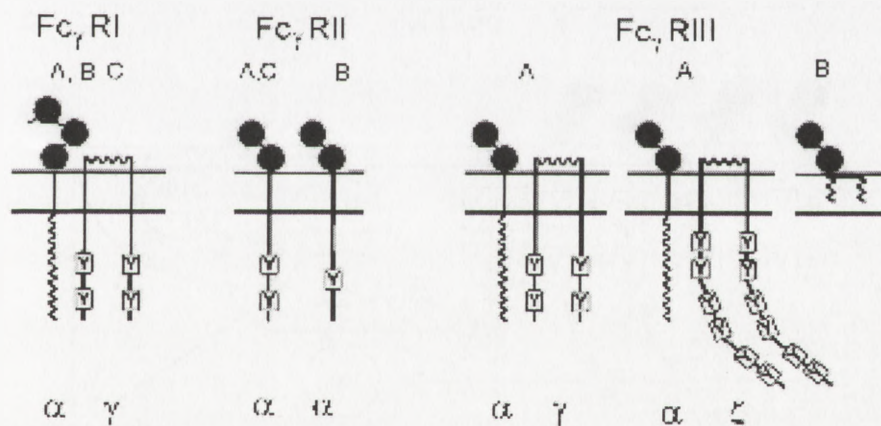
### Rola kinaz tyrozynowych i fosforylacji reszt tyrozynowych białek

Fosforylacja reszt tyrozynowych białek ma kluczowe znaczenie dla fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ. Ufosforylowane białka skupiają się przejściowo wraz z filamentami aktywnymi wokół miejsc fagocytozy [39,40,88], a proces ten jest hamowany przez inhibitory kinaz tyrozynowych [39]. Ustalono, że zdolność receptorów Fcγ do pośredniczenia w fagocytozie jest uwarunkowana obecnością w ich cytoplazmatycznej domenie krótkiej sekwencji aminokwasowej określanej skrótowo ITAM (od ang. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) [81]. Sekwencja ITAM zawiera dwie reszty tyrozynowe sparowane z dwoma resztami leucyny i oddzielone 7 lub 12 innymi aminokwasami: YxxL(x)<sub>7/12</sub>YxxL. Jest ona obecna także w receptorach pokrewnych receptorom Fcγ, np. w receptorach Fcε i antygenowych receptorach limfocytów B i T (BCR i TCR). W przypadku receptora FcγII, będącego monomerem, ITAM zlokalizowany jest w łańcuchu α receptora, który w części zewnątrzkomórkowej wiąże IgG opłaszczające pobierane cząstki.



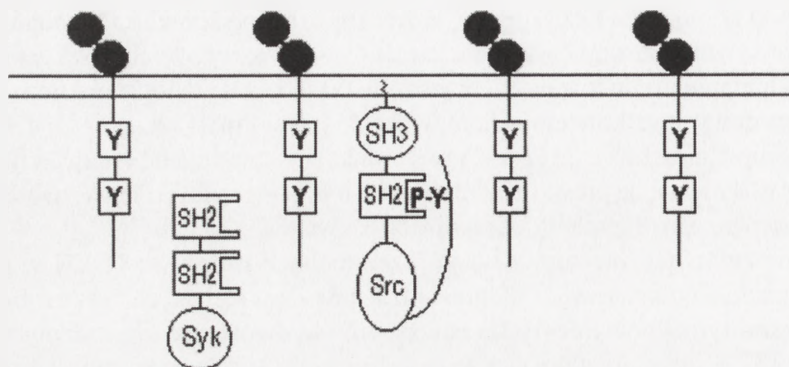
W receptorach Fc $\gamma$ I i Fc $\gamma$ IIIA funkcje te są rozdzielone; łańcuch  $\alpha$  wiąże IgG, natomiast sekwencje ITAM znajdują się w łańcuchach  $\gamma/\zeta$  (rys. 3). Kluczowe znaczenie ITAM dla fagocytarnych własności receptorów Fc $\gamma$  potwierdziła seria doświadczeń prowadzonych na małych komórkach fibroblastopodobnych linii COS transfekowanych rekombinowanym cDNA, kodującym te receptory. Ekspresja receptora Fc $\gamma$ IIA w komórkach COS sprawiała, że nabierały one zdolności fagocytozy cząstek opłaszczonych przez IgG. Zamiana jednej z reszt tyrozynowych w sekwencji ITAM na fenyloalaninę redukowała fagocytozę w 50–60%, a analogiczna mutacja obu reszt tyrozynowych całkowicie ją hamowała [65]. Natomiast receptor Fc $\gamma$ IIB2, który ma niekompletną sekwencję ITAM i w warunkach naturalnych hamuje aktywność limfocytów B nie mając przy tym zdolności do inicjowania fagocytozy, nabierał takich własności po „uzupełnieniu” brakującej sekwencji YxxL [47].

Jak wyjaśnić centralną rolę sprawowaną przez reszty tyrozynowe ITAM w generowaniu sygnału fagocytarnego? Odpowiedzią jest interakcja tych reszt z białkowymi kinazami tyrozynowymi (PTK) należącymi do dwóch rodzin: rodziny Src i Syk/Zap-70 [87 i literatura tam cytowana]. Rysunek 4 ilustruje proponowany ciąg wydarzeń uruchamiany przez związanie cząstki opłaszczonej przez IgG i wiodący ostatecznie do jej internalizacji. Zakłada on następujące po sobie działanie kinaz z rodziny Src i Syk, opisane już wcześniej dla limfocytarnych receptorów BCR i TCR [48,56]. Jako pierwsze uaktywniane są przypuszczalnie kinazy rodziny

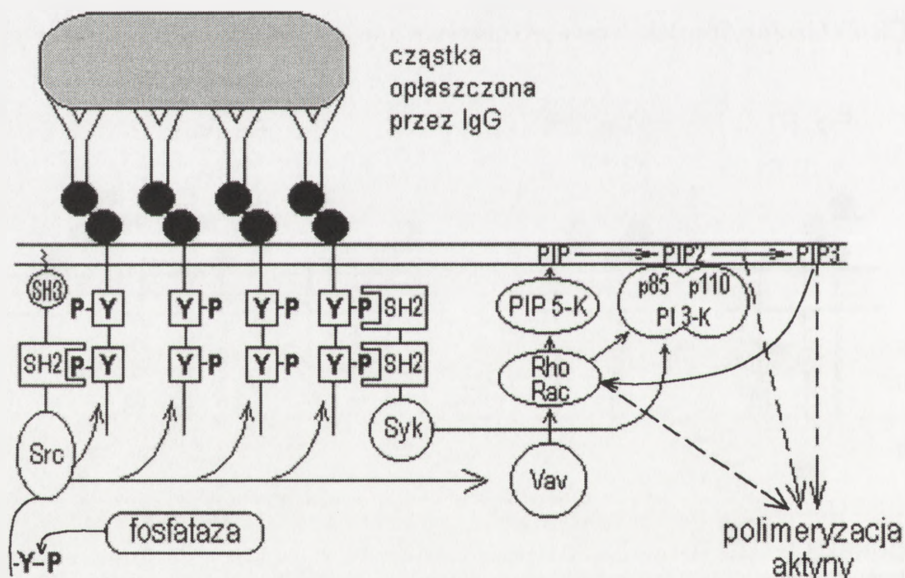


RYSUNEK 3. Schemat budowy trzech klas receptorów Fc $\gamma$ : Fc $\gamma$ RI–Fc $\gamma$ RIII. Każda klasa obejmuje różne izoformy receptorów, A–C, które są produktami różnych genów. Fc $\gamma$ RI i Fc $\gamma$ RIIIA są heterooligomerami składającymi się z łańcucha  $\alpha$  i homodimeru tworzącego podjednostkę  $\gamma$  bądź  $\zeta$ . Receptory klasy II zbudowane są z jednego łańcucha  $\alpha$ . Część zewnątrzkomórkowa łańcuchów  $\alpha$  zawiera 2 lub 3 wysoce homologiczne domeny immunoglobulinowe (\*). W części cytoplazmatycznej łańcuchów  $\gamma$  i  $\zeta$  bądź  $\alpha$  receptora Fc $\gamma$ II znajdują się sparowane reszty tyrozynowe (Y) tworzące sekwencje ITAM. Receptor Fc $\gamma$ IIB jest wyjątkiem – jego część zewnątrzkomórkowa zakotwiczona jest w błonie przez domenę fosfatydyloinozytolową. Schemat opracowano wg [73] z modyfikacjami

### A. Komórki niestymulowane



### B. Fagocytoza



RYSUNEK 4. Schemat aktywacji komórki w trakcie fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ. A – w komórkach niestymulowanych receptory rozmieszczone są równomiernie w błonie komórkowej, a kinazy tyrozynowe są nieaktywne; B – po związaniu cząstki, kinazy Src ulegają aktywacji fosforylując sekwencje ITAM receptorów Fcγ, które stają się miejscem zakotwiczenia kinaz Src i Syk; aktywacji ulegają monomeryczne GTPazy (na przykład Rho i Rac) i kinazy modyfikujące lipidy błonowe (PI 3-kinaza i PIP 5-kinaza), a ich współdziałanie prowadzi do polimeryzacji aktyny

Src, których pięć (Src, Fyn, Fgr, Hck i Lyn) zostało zidentyfikowanych w „profesjonalnych” fagocytach. Kinazy te są zakotwiczone w błonie komórkowej dzięki myrystylowanemu i palmitylowanemu końcowi N. W komórkach niestymulowanych centrum katalityczne tych kinaz może być nieaktywne z uwagi na „zamkniętą” konformację kinazy. Konformację tę wywołuje interakcja ufosforylowanej reszty tyrozynowej kinazy, zlokalizowanej blisko jej końca C, z własną domeną SH2 białka (rys. 4A). Za fosforylację kinaz z rodziny Src wydaje się odpowiadać kinaza Csk. Z kolei aktywacja receptorów Fc $\gamma$  i ich agregacja w miejscu wiązania cząstki opłaszczanej przez IgG związana jest z defosforylacją C-końcowej tyrozyny w kinazach Src (być może przy udziale fosfatazy CD45), co prowadzi do „odsłonięcia” centrum katalitycznego tych kinaz. Pierwszym celem kinaz Src są przypuszczalnie reszty tyrozynowe ITAM-u receptorów Fc $\gamma$  (rys. 4B). Ufosforylowane ITAM stają się następnie miejscem zakotwiczenia dla samych kinaz Src, a także kinazy Syk, która mając 2 domeny SH2 wiąże się z receptorem szczególnie efektywnie. Warto dodać, że fosforylacji ulegają także reszty tyrozynowe aktywowanych kinaz.

Istnieje wiele danych doświadczalnych potwierdzających proponowany przebieg transdukcji sygnału fagocytarnego generowanego przez receptory Fc $\gamma$ . Fagocytoza cząstek opłaszczonych przez IgG jest upośledzona w komórkach pozbawionych kinazy Src [46]. Natomiast wykluczenie ekspresji kinazy Syk w fagocytach całkowicie hamowało pobieranie takich cząstek – fagocytoza zależna od receptorów Fc $\gamma$  nie zachodziła w makrofagach pochodzących z myszy transgenicznych pozbawionych kinazy Syk, a także w monocytach, w których wyłączono ekspresję tej kinazy stosując antysensowne oligonukleotydy hybrydujące z mRNA Syk [23,63]. Zgodnie z tymi danymi, stosując technikę immunoprecypitacji wykazano asocjację kinaz z rodziny Src, a także kinazy Syk z receptorami Fc $\gamma$  i aktywację tych kinaz towarzyszącą aktywacji receptorów Fc $\gamma$  [87 i literatura tam cytowana].

Obserwacje immunocytochemiczne wykazały akumulację kinazy Syk wokół formujących się fagosomów [88]. Na szczególną uwagę zasługują doświadczenia grupy Greenberga polegające na nadekspresji różnorodnych chimer białkowych w komórkach fagocytarnie niekompetentnych [19,41]. W wyniku tych prac okazało się, że transbłonowa chimera „złożona” z zewnątrzkomórkowej domeny receptora Fc $\gamma$ III i cytoplazmatycznej domeny katalitycznej kinazy Syk jest wystarczająca do przeprowadzenia efektywnego wiązania i internalizacji cząstek opłaszczonych przez IgG w komórkach linii COS [41]. Droga od aktywacji kinaz Src i Syk do przebudowy cytoszkieletu aktynowego jest dotąd niezbadana, choć przypuszczać można, że jej elementem jest fosforylacja reszt tyrozynowych kolejnych białek, wśród nich PLC $\gamma$ , Vav – białka regulatorowego dla monomerycznej GTPazy Rac, a także paksyliny [26,40,60].

Fosforylacja reszt tyrozynowych białek towarzyszy także wiązaniu i inwazji szeregu patogennych bakterii, na przykład *Shigella flexneri* i *Yersinia enterocolitica*, do ludzkich fagocytów „nieprofesjonalnych” [10,27]. Podobnie, niezależna od op-



sonizacji fagocytoza *Neisseria gonorrhoeae* przez ludzkie „profesjonalne” fagocyty kontrolowana jest przez kinazy tyrozynowe [44]. Określono, że w pobieraniu *Neisseria gonorrhoeae* i *Shigella flexneri* zaangażowane są kinazy Src [27,44]. Zaskakujące okazało się odkrycie, że fagocytoza cząstek lateksu i zymosanu w komórkach odległego filogenetycznie pierwotniaka *Acanthamoeba castellanii* także skorelowana jest z fosforylacją reszt tyrozynowych białek. Ufosforylowane białka zbierały się wokół internalizowanych cząstek, a cały proces hamowany był przez inhibitor kinaz tyrozynowych [55].

Fosforylacja reszt tyrozynowych białek nie jest jednak dominującym mechanizmem przekazywania sygnału fagocytarnego. Fagocytoza pośredniczona przez receptor C3 dla dopełniacza w makrofagach zachodzi w obecności inhibitorów kinaz tyrozynowych, jednakże jej tempo ulega spowolnieniu [3]. Fosforylacja reszt tyrozynowych samego receptora C3 jest znikoma [16], a zatem głównymi substratami kinaz tyrozynowych są w tym przypadku białka zbierające się wokół aktywowanych receptorów C3. Interakcja ufosforylowanych reszt tyrozynowych z domeną SH2 innych białek może być istotna w organizowaniu się tych białek w kompleksy, które lokalnie modulują przebudowę cytoszkieletu aktynowego.

## Rola kinazy białkowej C i fosforylacji reszt serynowo/treoninowych białek

Kinazy białkowe C tworzą rodzinę enzymów katalizujących fosforylację reszt serynowo/treoninowych białek, stymulowanych przez DAG i fosfatydyloserynę, a także, w przypadku niektórych izoenzymów PKC, przez jony wapnia [66]. Aktywacja PKC może być jednym ze wspólnych elementów sygnału fagocytarnego generowanego przez receptory Fcy, receptor C3 i receptor mannozowy. Założenie takie opiera się na następujących danych:

1. PKC zbiera się wokół fagosomów w trakcie fagocytozy zależnej od receptorów Fcy, receptora C3 i receptora mannozowego w makrofagach [2,3]. Wyizolowana frakcja błon fagosomalnych monocytów wzbogacona była w ten enzym [95].

2. PKC jest aktywowana w trakcie fagocytozy, czego przejawem jest wzmożona fosforylacja białka MARCKS [2]. Zarówno MARCKS, jak i pokrewny substrat PKC – MacMARCKS – zbierają się wokół fagosomów w makrofagach, a nadekspresja MacMARCKS, pozbawionego miejsc fosforylacji, w makrofagopodobnych komórkach linii J774 blokowała w nich fagocytozę [2,3,98]. MARCKS jest białkiem sieciującym filamenty aktynowe oddziałującym jednocześnie z błoną komórkową, co sugeruje, że może on pośredniczyć w interakcji mikrofilamentów z błoną w trakcie fagocytozy. Sugestia taka jest jednak kwestionowana z uwagi na fakt, że oddziaływanie białka MARCKS zarówno z błoną, jak i aktywną jest regulowane negatywnie przez jego fosforylację [1]. Alternatywną możliwością jest udział MARCKS i PKC w dojrzewaniu fagosomów, ponieważ oba te białka pozostają skupione wokół fagosomów po depolimeryzacji otoczki aktynowej [2].

Substratem PKC, poza białkiem MARCKS, może być także podjednostka  $\beta_2$  receptora C3 [16]. Fosforylacja tej podjednostki stymuluje agregację receptora C3 [29], która przypuszczalnie uruchamia formowanie kompleksu receptora z białkami cytoszkieletu zaangażowanymi w internalizację cząstek [3].

3. Zahamowanie aktywności PKC blokuje fagocytozę zależną od receptorów Fc $\gamma$ , C3 i receptora mannozowego makrofagach, co skorelowane jest z brakiem fosforylacji białka MARCKS i reorganizacji cytoszkieletu aktynowego [2,3]. Warto wspomnieć o sprzecznych w tej mierze badaniach grupy Greenberga wykazujących niewrażliwość fagocytozy zależnej od receptorów Fc $\gamma$  na inhibitory PKC [39]. Badania te sugerują możliwość zróżnicowania sygnałów fagocytarnych generowanych przez receptory Fc $\gamma$  i receptor C3 dla dopełniacza, które zależą od fosforylacji, odpowiednio reszt tyrozynowych i serynowych tych receptorów (tab. 3).

Czy jony wapnia uczestniczą w przekazywaniu sygnału fagocytarnego?

Fagocytozie, zarówno tej zależnej od receptorów Fc $\gamma$ , dopełniaczowego receptora C3, jak i receptora mannozowego, towarzyszy przejściowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia ( $[Ca^{2+}]_i$ ) [8,38,49,54,59]. Obserwacje mikroskopowe neutrofilów wykazały, że wzrost ten następuje w sąsiedztwie powstających fagosomów [8].

Próby wykazania regulatorowej funkcji jonów wapnia w fagocytozie przyniosły jednak sprzeczne dane. Wykazują one, że rozpatrując problem udziału wapnia w fagocytozie uwzględniać należy nie tylko rodzaj badanego receptora, ale także typ fagocytu (tab. 3). W makrofagach, w przypadku fagocytozy zależnej od receptorów Fc $\gamma$ , nie udało się dotąd sprecyzować procesu, dla którego wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  byłby niezbędny. Obniżenie  $[Ca^{2+}]_i$  w komórkach z około 100 nM, typowego dla komórek niestymulowanych, do 3 nM, przy użyciu takich chelatorów jonów wapnia, jak: quin2, fura-2 i EGTA (przy jednoczesnym braku jonów wapnia w środowisku zewnętrznym), nie hamowało ani wiązania, ani internalizacji cząstek opłaszczonych przez IgG. Fagocytoza zachodziła przy niezakończonym cyklu polimeryzacji/depolimeryzacji aktyny [32,38]. Stosując analogiczną technikę wykazano, że jony wapnia nie są także konieczne do sprawnej fuzji fagosomów z lizosomami w tych komórkach [100].

W neutrofilach sytuacja jest odmienna. Związanie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia przy użyciu chelatorów nie zaburza wprawdzie w tych komórkach fagocytozy zależnej od receptora C3 dla dopełniacza i receptorów mannozowych; wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  jest jednak w tym przypadku niezbędny do dojrzewania fagosomów. Wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  wydaje się warunkować depolimeryzację otoczki aktynowej fagosomów, a to z kolei umożliwia ich fuzję z lizosomami [8,49,59].

Obniżenie  $[Ca^{2+}]_i$  hamowało także w neutrofilach zależną od receptorów Fc $\gamma$  fagocytozę kompleksów immunologicznych IgG. Wykazano, że dla efektywnej fa-

TABELA 3. Porównanie fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ i receptora C3 dla dopełniacza

Właściwość	Receptory Fcγ	Receptor C3	Literatura
morfologia powstających fagosomów	wypustki błony plazmatycznej obejmujące cząstki w kubku fagocytarnym	„zapadanie się” cząstki w cytoplazmie	[3]
wrażliwość na inhibitory PTK	+	-(a)	[3,39]
wrażliwość na inhibitory PKC	γ <sup>(b)</sup>	+	[3,39]
zależność od wzrostu $[Ca^{2+}]_i$	+ (w neutrofilach) - (w makrofagach)	-(c)	[38,49] [54,59]
udział mikrofilamentów	+	+	[84]
akumulacja taliny, winkuliny, α-aktyniny, MARCKS i PKC	+	+	[2,3,37]
zależność od mikrotubul	-	+	[3]

(a) tempo fagocytozy zależnej od receptora C3 ulega spowolnieniu [3];

(b) Grennberg at al. [39] donoszą o braku wpływu inhibitorów PKC na fagocytozę zależną od receptorów Fc a Allen i Aderem [3] uzyskali wyniki przeciwstawne;

(c) wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  nie jest wymagany przy internalizacji cząstki, ale warunkuje fuzję fagosomów z lizosomami [49,59]

gocytozy tych kompleksów konieczne jest zarówno uwolnienie jonów wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych, jak i ich napływ ze środowiska zewnętrznego komórki, przy czym ten drugi proces jest regulowany przez fosforylację reszt tyrozynowych białek. Sprzeczne wyniki dotyczące roli jonów wapnia w fagocytozie zależnej od receptorów Fcγ w makrofagach i neutrofilach mogą odzwierciedlać subtelne różnice w regulacji tego procesu, w zależności od klasy receptorów Fcγ zaangażowanych w fagocytozę [54].

Aktywacja receptorów Fcγ w monocytach związana jest z aktywacją PLCγ [52,60]. Zakładać więc można, że w trakcie fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ wapń uwalniany jest z zasobów retikulum endoplazmatycznego przez  $IP_3$ , produkt hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-dwufosforanu ( $PIP_2$ ) katalizowanej przez PLCγ. Jednakże, w neutrofilach jony wapnia mogą być uwalniane w sposób niezależny od  $IP_3$ . W procesie tym zaangażowane są natomiast filamenty aktynowe oraz l-plastyna (białko organizujące mikrofilamenty w wiązki), ponieważ zarówno wymuszona depolimeryzacja aktyny, jak i dezaktywacja l-plastyny hamują wzrost  $[Ca^{2+}]_i$  w tych komórkach [80].



## Udział fosfatydyloinozytolo-3-kinazy w fagocytozie

Fosfatydyloinozytolo-3-kinaza fosforyluje fosfatydyloinozytol w pozycji 3 pierścienia inozytoloowego i w czasie stymulacji komórki fosforyluje  $PIP_2$  do  $PIP_3$ . Kinaza PI 3 jest dimerem, składającym się z regulatorowej podjednostki p85 i katalitycznej podjednostki p110. Podjednostka regulatorowa p85 ma złożoną budowę: wyróżnia się w niej jedną domenę SH3, dwie domeny SH2, dwie sekwencje bogate w prolinę oraz domenę Bcr [51]. Domeny te umożliwiają interakcję p85 z różnorodnymi białkami, które w trakcie fagocytozy skupiają się wokół aktywowanych receptorów.

Najwięcej danych wskazujących na udział PI 3-kinazy w pobieraniu cząstek dotyczy fagocytozy zależnej od receptorów Fcγ. Wskazano na co najmniej dwie możliwości interakcji PI 3-kinazy ze „składowymi” szlaku sygnałowego uruchamianego przez te receptory. Pierwsza polega na oddziaływaniu domen SH2 PI 3-kinazy z ufosforylowanymi resztami tyrozynowymi kinazy Syk [15], jak to ilustruje rysunek 4B. Druga możliwość zakłada udział białka c-Cbl. Podczas aktywacji receptorów Fcγ reszty tyrozynowe tego białka ulegają fosforylacji i wiążą się z domenami SH2 PI 3-kinazy. Jednocześnie, fragmenty c-Cbl bogate w prolinę wiążą domenę SH3 kinaz z rodziny Src [33,64,67,89].

Wbrew oczekiwaniom, obserwacje immunocytochemiczne nie wykazały akumulacji PI 3-kinazy wokół fagosomów podczas zależnej od receptorów Fcγ fagocytozy w makrofagach [88]. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być doniesienie Rameh et al. [71] o interakcji domeny SH2 PI 3-kinazy z produktem własnej aktywności enzymatycznej, to jest z  $PIP_3$ . Takie oddziaływanie mogłoby rozprzegać wiązanie domen SH2 PI 3-kinazy z kotwiczącymi je resztami fosfotyrozyny innych białek, uniemożliwiając nagromadzenie kinazy pod błoną komórkową.

Aktywacja PI 3-kinazy towarzyszy aktywacji receptorów FcγI i FcγII w monocytach, FcγIIA w płytkach krwi i FcγIIIA w komórkach NK [15,50,67]. Stosując inhibitory PI 3-kinazy potwierdzono, że aktywność tego enzymu jest konieczna dla fagocytozy zależnej of Fcγ receptorów w monocytach i makrofagach [5,67]. Praca Araki i współaut. [6] sprecyzowała, że udział PI 3-kinazy jest niezbędny na etapie internalizacji cząstki, to jest w trakcie postępującej ekspansji pseudopodiów otaczających cząstkę i zamykania się ich błon w fagosom. Makrofagi poddane działaniu inhibitorów PI 3-kinazy zdolne były bowiem do wiązania opłaszczonych przez IgG erytrocytów i ich uchwycenia w obrębie kubków fagocytarnych, ale związanych cząstek nie internalizowały. Przypuszczalnie brak  $PIP_3$  uniemożliwia reorganizację filamentów aktynowych wymaganą do internalizacji cząstki. W sposób analogiczny do  $PIP_2$ ,  $PIP_3$  może modulować aktywność profiliny i żelzoliny, białek kontrolujących polimeryzację aktyny [93]. Ponadto, PI 3-kinaza może brać udział w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego współdziałając z Rho i Rac, monomerycznymi GTPazami (rys. 4B). Jak omówiono poniżej, aktywność PI 3-kinazy jest

stymulowana przez te białka. Z drugiej strony aktywność PI 3-kinazy kontroluje szlaki sygnałowe wiodące przez Rho i Rac do przebudowy filamentów aktynowych [74].

### Udział monomerycznych GTPaz

Białka z rodzin Rho/Rac/CDC42 i ARF, dwu z pięciu rodzin monomerycznych GTPaz tworzących nadrodzinę Ras, pełnią regulatorową funkcję w przebudowie cytoszkieletu aktynowego wywołaną stymulacją receptorów błonowych w komórkach, w tym w makrofagach [4,70,77,78]. Dopiero jednak w roku 1997 wykazano, że Rho, Rac1, Cdc42 i ARF6 mogą być rozpatrywane jako potencjalne składowe sygnały fagocytarnego. Inaktywacja Rho przy użyciu transferazy C3, katalizującej ADP-rybozylację Rho, hamowała zarówno wiązanie, jak i internalizację cząstek opłaszczonych przez IgG w komórkach linii J774 i komórkach linii COS transfekowanych receptorem FcγIIA. Zjawisko to wiązało się z ogólną depolimeryzacją filamentów aktynowych w komórce [43]. Nadekspresja dominujących negatywnych mutantów Rac1, Cdc42 i ARF6 również hamowała fagocytozę zależną od receptorów Fcγ w mysich komórkach makrofagopodobnych linii RAW 264.7 [20,97].

Wśród enzymów efektorowych, których aktywność może być stymulowana przez Rho, znajdują się: serynowo/treoninowa kinaza ROCK, której substratem jest fosfataza lekkich łańcuchów miozyny, fosfolipaza D, fosfatydyloinozytolo-5-kinaza (PIP 5-kinaza) i PI 3-kinaza [17,53,61,75,96]. Funkcja tych przypuszczalnych interakcji w przebiegu fagocytozy nie jest zbadana, a ich potencjalne znaczenie w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego stało się przedmiotem odrębnych prac przeglądowych [m.in. 90].

Na uwagę zasługuje fakt, że stymulacja PIP 5-kinazy przez białko Rho stawia ponownie w centrum zainteresowania produkt aktywności katalitycznej tej kinazy, jakim jest  $PIP_2$ .  $PIP_2$  jest bowiem nie tylko źródłem takich przekaźników drugiego rzędu, jak:  $IP_3$ , DAG i  $PIP_3$ ; jest ono także istotnym błonowym miejscem kotwiczącym dla białek mających domenę plekstrynową i szeregu białek wiążących aktynę, takich jak: profilina, żelzolina i Gcap. Modyfikując interakcję tych białek z aktyną,  $PIP_2$  może bezpośrednio wpływać na polimeryzację/depolimeryzację filamentów aktynowych [86]. W innych układach doświadczalnych kinaza ROCK, PIP 5-kinaza, a także PI 3-kinaza, stymulowane były przez Rac, drugie białko z rodziny Rho [12,45,58,92], pozostawiając otwartym problem ewentualnego współudziału tych białek w regulacji cytoszkieletu aktynowego w trakcie fagocytozy (rys. 4B). Aktywacja receptorów Fcγ może prowadzić do aktywacji Rac1 przy udziale białka adaptorowego Vav (rys. 4B). Vav jest substratem kinaz Src, a ufosforylowany działa jako aktywator Rac1, stymulując wymianę związanego z nim GDP na GTP [22].

Białka Rac1 lub Rac2 regulują także aktywność NADPH oksydazy, stymulowanej w trakcie internalizacji cząstki w profesjonalnych fagocytach. Modułacja aktywności białek Rac może zatem stanowić element koordynujący przebudowę cytoszkieletu aktynowego z produkcją nadtlenu w trakcie fagocytozy. Aktywacja oksydazy NADPH niesprężona z pobieraniem cząstki może prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu fagocytów i stanów zapalnych otaczającej tkanki [13].

## PODSUMOWANIE

Aktywacja receptorów w czasie wiązania cząstki jest skorelowana z ich agregacją, przypominając mechanizm aktywacji innych receptorów błonowych, na przykład integrzyn pośredniczących w oddziaływaniu komórki z podłożem [18]. Agregacja receptorów stabilizuje wiązanie fagocytowanych cząstek i jednocześnie indukuje powstanie sygnału fagocytarnego. Jednym z pierwszych elementów tego sygnału, analogicznym do sygnałów generowanych przez inne receptory błonowe, jest fosforylacja receptorów – reszt tyrozynowych receptorów Fc $\gamma$ , katalizowana przypuszczalnie przez kinazy Src, i fosforylacja reszt serynowych dopełniaczowego receptora C3 przez PKC. Dalsze etapy przekazywania sygnału prowadzące ostatecznie do przebudowy cytoszkieletu aktynowego i internalizacji cząstki są najpełniej scharakteryzowane w przypadku fagocytozy zależnej od receptorów Fc $\gamma$ . Ustalono, że zaangażowane są tu kinazy tyrozynowe z rodziny Src i Syk, lipidowa kinaza PI 3, a także monomeryczne GTPazy.

Wyłaniający się obraz wzajemnych relacji tych białek ilustruje schematycznie rysunek 4B. Schemat ten nie uwzględnia udziału PLC i jonów wapnia w fagocytozie, który w chwili obecnej wymyka się uogólnieniom. Oczekiwać można, że najbliższa przyszłość przyniesie próby wyjaśnienia roli PI 3-kinazy i monomerycznych GTPaz w fagocytozie zależnej od receptora C3 dla dopełniacza. Białka te, jak wykazują wyniki najnowszych badań, wydają się bowiem kontrolować przebudowę cytoszkieletu aktynowego komórki wywołaną przez aktywację różnorodnych receptorów błonowych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADEREM A. The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* 1992, **71**: 713–716.
- [2] ALLEN L-AH, ADEREM A. A role for MARCKS, the isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J Exp Med* 1995; **182**: 829–840.



- [3] ALLEN L-AH, ADEREM A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 1996; **184**: 627–637.
- [4] ALLEN WE, JONES GE, POLLARD JW, RIDLEY AJ. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* 1997; **110**: 707–720.
- [5] ARAKI N, JOHNSON MT, SWANSON JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1249–1260.
- [6] AXLINE SG, REAVEN EP. Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophages by cytochalasin B. *J Cell Biol* 1974; **62**: 647–659.
- [7] BAINES IC, BRZESKA H, KORN ED. Differential localization of *Acanthamoeba* myosin I isoforms. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1193–1203.
- [8] BENGTTSSON T, JACONI MEE, GUSTAFSON M, MAGNUSSON K-E, THELER J-M, LEW DP, STENDHAL O. Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium. *Eur J Cell Biol* 1993; **62**: 49–58.
- [9] BERON W, ALVAREZ-DOMINGUEZ C, MAYORGA L, STAHL PD. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 100–104.
- [10] BLISKA JB, GALAN JE, FALKOW S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993; **73**: 903–920.
- [11] BLYSTONE SD, LINDBERG FP, LAFLAMME SE, BROWN EJ. Integrin  $\beta_3$  cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of  $\alpha_5\beta_1$  phagocytosis by  $\alpha_v\beta_3$  and integrin-associated protein. *J Cell Biol* 1995; **130**: 745–754.
- [12] BOKOCH GM, VLAHOS CJ, WANG Y, KNAUS UG, TRAYNOR-KAPLAN A. Rac GTPase interacts specifically with phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem J* 1996; **315**: 775–779.
- [13] BOKOCH GM. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 109–113.
- [14] BROWN EJ. Complement receptor and phagocytosis. *Curr Biol* 1991; **3**: 76–82.
- [15] CHACKO GW, BRANDT JT, COGGESHALL KM, ANDERSON CL. Phosphoinositide 3-kinase and p72<sup>Syk</sup> noncovalently associate with the low affinity Fc $\gamma$  receptor on human platelets through an immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10775–10781.
- [16] CHATILA TA, GEHA RS, ARNAOUT MA. Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11b/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J Cell Biol* 1989; **109**: 3435–3444.
- [17] CHONG LD, TRAYNOR-KAPLAN A, BOKOCH GM, SCHWARTZ MA. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 1994; **79**: 507–513.
- [18] CLARK E EA, BRUGGE JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; **268**: 233–239.
- [19] COX D, CHANG P, KUROSAKI T, GREENBERG S. Syk tyrosine kinase is required for immunoreceptor tyrosine activation motif-dependent actin assembly. *J Biol Chem* 1996; **271**: 16597–16602.
- [20] COX D, CHANG P, ZHANG Q, REDDY PG, BOKOCH GM, GREENBERG S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* 1997; **186**: 1487–1494.
- [21] COX D, WESSEL D, SOLL DR, HARTWIG J, CONDEELIS J. Re-expression of ABP-120 rescues cytoskeletal, motility, and phagocytic defects of ABP-120 *Dictyostelium* mutants. *Molec Biol Cell* 1996; **7**: 803–823.
- [22] CRESPO P, SCHUEBEL KE, OSTROM AA, GUTKIN JS, BUSTELO XS. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the *vav* proto-oncogene product. *Nature* 1997; **385**: 169–172.

- [23] CROWLEY MT, COSTELLO PS, FITZER-AITAS CJ, TURNER M, MENG F, LOWELL C, TYBULEWICZ SLJ, DEFRANCO AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc $\gamma$  receptors on macrophages. *J Exp Med* 1997; **186**: 1027–1039.
- [24] CZOP JK, KAY J. Isolation and characterization of  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1991; **173**: 1511–529.
- [25] DAERON M. Fc receptor biology. *Ann Rev Immunol* 1997; **15**: 203–234.
- [26] DARBY C, GEAHLEN RL, SCHREIBER AD. Stimulation of macrophage Fc $\gamma$ RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95<sup>av</sup> and p62/GAP-associated protein. *J Immunol* 1994; **152**: 5429–5437.
- [27] DEHIO C, PREVOST M-C, SANSONETTI PJ. Invasion of epithelial cells by *Shigella flexnerii* induces tyrosine phosphorylation of cortactin by a pp60<sup>c-src</sup>-mediated signalling pathway. *EMBO J* 1995; **14**: 2471–2482.
- [28] DE LOZANNE A, SPUDICH JA. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* 1987; **236**: 1081–1086.
- [29] DETMERS PA, WRIGHT SD, OLSEN E, KIMBAL B, COHN ZA. Aggregation of complement receptor on human neutrophils in the absence of ligand. *J Cell Biol* 1987; **105**: 1137–1145.
- [30] EZEKOWITZ RAB, SASTRY K, BAILLY P, WARNER A. Molecular characterization of the human mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990; **172**: 1785–1795.
- [31] DIAKONOVAM, GERKE V, ERNST J, LIAUTARD J-P, VANDER VUSSE G, GRIFFITHS G. Localization of five annexins in J774 macrophages and on isolated phagosomes. *J Cell Sci* 1997; **110**: 1199–1231.
- [32] DI VIRGILIO F, MEYER BC, GREENBERG S, SILVERSTEIN SC. Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low Ca<sup>2+</sup> levels. *J Cell Biol* 1988; **106**: 657–666.
- [33] DOMBROSKY-FERLAN PM, COREY SJ. Yeast two-hybrid *in vivo* association of the Src kinase Lyn with the proto-oncogene product Cbl but not with the p85 subunit of PI 3-kinase. *Oncogene* 1997; **14**: 2019–2024.
- [34] FUKUI Y, DE LOZANNE A, SPUDICH JA. Structure and function of the cytoskeleton of a *Dictyostelium* myosin-defective mutant. *J Cell Biol* 1990; **110**: 367–378.
- [35] FUKUI Y, LYNCH TJ, BRZESKA H, KORN ED. Myosin I is located at the leading edges of locomoting *Dictyostelium* amoebae. *Nature* 1989; **341**: 328–331.
- [36] FURUKAWA R, FECHHEIMER M. Differential localization of  $\alpha$ -actin and the 30 kD actin-bundling protein in the cleavage furrow, phagocytic cup, and contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994; **29**: 46–56.
- [37] GREENBERG S, BURRIDGE K, SILVERSTEIN SC. Colocalization of F-actin and talin during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* 1990; **172**: 1853–1856.
- [38] GREENBERG S, EL KHOURY J, DI VIRGILIO F, KAPLAN EM, SILVERSTEIN SC. Ca<sup>2+</sup>-independent F-actin assembly and disassembly during Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Cell Biol* 1991; **113**: 757–767.
- [39] GREENBERG S, CHANG P, SILVERSTEIN SC. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med* 1993; **177**: 529–534.
- [40] GREENBERG S, CHANG P, SILVERSTEIN SC. Tyrosine phosphorylation of the  $\gamma$  subunit of Fc $\gamma$  receptors, p72<sup>Syk</sup>, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem* 1994; **269**: 3897–3902.
- [41] GREENBERG S, CHANG P, WANG D-C, XAVIER R, SEED B. Clustered Syk kinase domains trigger phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 1103–1107.
- [42] GRIFFIN FM, GRIFFIN JA, LEIDER JE, SILVERSTEIN SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirement for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 1975; **142**: 1263–1282.

- [43] HACKMAN DJ, ROTSTEIN OD, SCHREIBER A, ZHANG W-J, GRINSTEIN S. Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc $\gamma$  receptors in macrophages. *J Exp Med* 1997; **86**: 955–966.
- [44] HAUCK CR, MEYER TF, LANG F, GULBINS E. CD66-mediated phagocytosis of Opa52 *Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase-and Rac1-dependent signalling pathway. *EMBO J* 1998; **17**:443–454.
- [45] HARTWIG JH, BOKOCH GM, CARPENTER CL, JANMEY PA, TAYLOR LA, TOKER A, STOSSEL TP. Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 1995; **82**: 643–653.
- [46] HUNTER S, HUANG M-M, INDIK ZK, SCHREIBER AD. Fc $\gamma$ RIIA-mediated phagocytosis and receptor phosphorylation in cells deficient in the protein tyrosine kinase Src. *Exp Hematol* 1993; **21**: 1492–1497.
- [47] INDIK ZK, PAN XQ, HUANG M-M, MCKENZIE SE, LEVINSON AI, SCHREIBER AD. Insertion of cytoplasmic tyrosine sequences into the nonphagocytic receptor Fc $\gamma$ IIB establishes phagocytic functions. *Blood* 1994; **83**: 2072–2780.
- [48] IWASHIMA M, IRVING BA, VAN OERS NSC, CHAN AC, WEISS A. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 1994; **263**: 1136–1139.
- [49] JACONI MEE, LEW DP, CARPENTIER J-L, MAGNUSSON KE, SJOGREN M, STENDHAL O. Cytosolic free calcium elevation mediates the phagosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1555–1564.
- [50] KANAKARAJ P, DUCKWORTH B, AZZONI L, KAMOUN M, CANTLEY LC, PERUSSIA B. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc $\gamma$ RIIA-ligand interaction. *J Exp Med* 1994; **179**: 551–558.
- [51] KAPELLER R, CANTLEY LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *BioEssays* 1994; **16**: 565–576.
- [52] KIENER PA, RANKIN BM, BURKHARDT AL, SCHIEVEN GL, GILLILAND LK, ROWLEY RB, BOLEN JB, LEDBETTER JA. Cross-linking of Fc $\gamma$  receptor I (Fc $\gamma$ RI) and receptor II (Fc $\gamma$ RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24442–24448.
- [53] KIMURA K, ITO M, AMANO M, CHIHARA K, FUKATA Y, NAKAFUKU M, YAMAMORI B, FENG J, NAKANO T, OKAWA K, IWAMATSU A, KAIBUCHI K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996; **273**: 245–248.
- [54] KOBAYASHI K, TAKAHASHI K, NAGASAWA S. The role of tyrosine phosphorylation and Ca<sup>2+</sup> accumulation in Fc $\gamma$ -receptor-mediated phagocytosis of human neutrophils. *J Biochem* 1995; **117**: 1156–1161.
- [55] KRAWCZYŃSKA W, SOBOTA A. Participation of 125 kDa tyrosine-phosphorylated protein in phagocytosis of *Acanthamoeba* cells. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; **34**: 11–12.
- [56] KUROSAKI T, TAKATA M, YAMANASHI Y, INAZU T, TANIGUCHI T, YAMAMOTO T, YAMAMURA H. Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J Exp Med* 1994; **179**: 1725–1729.
- [57] KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Local accumulation of  $\alpha$ -spectrin-related protein under plasma membrane during capping and phagocytosis in *Acanthamoeba*. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; **38**: 253–265.
- [58] LAMARCHE N, TAPON N, STOWERS L, BURBELO PD, ASPENSTROM P, BRIDGES T, CHANT J, HALL A. Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65<sup>PAK</sup> and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1996; **87**:519–529.
- [59] LEW DP, ANDERSSON T, HED J, DI VIRGILIO F, POZZAN T, STEHDHAL O. Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent phagocytosis in human neutrophils. *Nature* 1985; **315**: 509–511.



- [60] LIAO F, SHIN HS, RHEE SG. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1 induced by cross-linking of the high-affinity or low-affinity Fc receptor for IgG in U937 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3659–3663.
- [61] MALCOLM KC, ROSS AH, QIU R-G, SYMON M, EXTON JH. Activation of rat liver phospholipase D by small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 1994; **269**: 25951–25954.
- [62] MANIAK M, RAUCHNEBERGER R, ALBRECHT R, MURPHY J, GERISCH G. Coronin involved in phagocytosis: dynamic of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein tag. *Cell* 1995; **83**: 915–924.
- [63] MATSUDA M, PARK J-G, WANG D-C, HUNTER S, CHIEN P, SCHREIBER AD. Abrogation of the Fc receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides. *Mol Biol Cell* 1996; **7**: 1095–1106.
- [64] MATSUO T, HAZEKI K, HAZEKI O, KATADA T, UI M. Specific association of phosphatidylinositol 3-kinase with the protooncogene product Cbl in Fc $\gamma$  receptor signaling. *FEBS Lett* 1996; **382**: 11–14.
- [65] MITCHELL MA, HUANG M-M, CHIEN P, INDIK ZK, PAN XQ, SCHREIBER AD. Substitution and deletion in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc $\gamma$ IIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood* 1994; **84**: 1753–1759.
- [66] MOCHLY-ROSEN D, GORDON AS. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J* 1998; **12**: 35-45.
- [67] NINOMIYA N, HAZEKI K, FUKUI Y, SEYA T, OKADA T, HAZEKI O, UI M. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in Fc $\gamma$  receptor signaling. *J Biol Chem* 1994; **269**: 22732–22737.
- [68] NIEWOHNER J, WEBER I, MANIAK M, MULLER-TAUBENBERGER A, GERISCH G. Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol* 1997; **138**: 349–361.
- [69] RABINOVITCH M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 1995; **5**: 85-87.
- [70] RADHAKRISHNA H, KLAUSNER RD, DONALDSON JG. Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *J Cell Biol* 1996; **134**: 935–947.
- [71] RAMEH LE, CHEN C-S, CANTLEY LC. Phosphatidylinositol (3,4,5)P $_3$  interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 1995; **83**: 821-830.
- [72] RANKIN BM, YOCUM SA, MITTLER RS, KIENER PA. Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc $\gamma$ receptor cross-linking. *J Immunol* 1993; **150**: 605–616.
- [73] RAVETCH JV. Fc receptors: rubor redux. *Cell* 1994; **78**: 553–560.
- [74] REIF K, NOBES CD, THOMAS G, HALL A, CANTRELL DA. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol* 1996; **6**: 1445–1455.
- [75] REN X-D, BOKOCH GM, TRAYNOR-KAPLAN A, JENKINS GH, ANDERSON RA, SCHWARTZ MA. Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. *Molec Biol Cell* 1996; **7**: 435–442.
- [76] RESNICK D, CHATTERTON JE, SCHWARTZ K, SLAYTER H, KRIEGER. Structure of class A macrophage scavenger receptor. *J Biol Chem* 1996; **271**: 26924–26930.
- [77] RIDLEY AJ, HALL A. The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; **70**: 389–399.
- [78] RIDLEY AJ, PATTERSON HF, JOHNTSON CL, DIEKMAN D, HALL A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; **70**: 401–410.
- [79] RIVERO F, KOPPEL B, PERACINO B, BOZZARO S, SIEGERT F, WEIJER CJ, SCHLEICHER M, ALBRECHT R, NOEGEL AA. The role of the cortical cytoskeleton: F-actin

- cross-linking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci* 1996; **109**: 2679–2691.
- [80] ROSALES C, JONES SL, MCCOURT D, BROWN EJ. Bromophenacyl bromide binding to the actin-bundling protein I-plastin inhibits inositol trisphosphate-independent increase in  $Ca^{2+}$  in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 3534–3538.
- [81] SAMELSON LE, KLAUSNER RD. Tyrosine kinases and tyrosine-based activation motifs. *J Biol Chem* 1992; **267**: 24913–24916.
- [82] SAVIL J, DRANSFIELD I, HOGG N, HASLETT C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; **343**: 170–173.
- [83] SHETERLINE P, RICKARD JE, RICHARDS RC. Fc receptor-mediated phagocytic stimuli induce transient actin assembly at an early stage of phagocytosis in neutrophil leukocytes. *Eur J Cell Biol* 1984; **34**: 80–87.
- [84] SILVERSTEIN SC, GRENNBERG S, DI VIRGILIO F, STEINBERG TH. Phagocytosis. in *Fundamental Immunology (2 wydanie) (Paul WE, ed.)* 1993, 703-720, Raven Press Ltd., New York.
- [85] STENDHAL OI, HARTWIG JH, BROTSCHI EA, STOSSEL TP. Distribution of actin-binding protein and myosin in macrophages during spreading and phagocytosis. *J Cell Biol* 1980; **84**: 215–224.
- [86] STOSSEL TP. On the crawling of animal cells. *Science* 1993; **260**: 1086–1094.
- [87] STRZELECKA A, KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett* 1997; **400**: 11–14.
- [88] STRZELECKA A, PYRZYŃSKA B, KWIATKOWSKA K, SOBOTA A. Syk kinase, tyrosine-phosphorylated proteins and actin filaments accumulate at forming phagosomes during Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997; **38**: 287–296.
- [89] TANAKA S, NEFF L, BARON R, LEVY AB. Tyrosine phosphorylation and translocation of the c-Cbl protein after activation of tyrosine kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 1995; **270**: 14347–14351.
- [90] TAPON N, HALL A. Rho, Rac and CDC42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 86–92.
- [91] TAYLOR RB, DUFFUS WPH, RAFF MC, DE PETRIS S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature* 1971; **233**: 225–229.
- [92] TOLIAS KF, CANTLEY LC, CARPENTER CL. Rho family GTPases bind to phosphoinositide kinases. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17656–17659.
- [93] TOKER A, CANTLEY LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 1997; **387**: 673–676.
- [94] VERAS PST, DE CHASTELLIER C, MOREAU M-F, VILLIERS V, THIBON M, MATTEI D, RABINOVITCH M. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cell. *J Cell Sci* 1994; **107**: 3065–3076.
- [95] ZELEZNYAK A, BROWN EJ. Immunoglobulin-mediated phagocytosis by human monocytes requires protein kinase C activation. *J Biol Chem* 1992; **267**: 12042–12048.
- [96] ZHANG J, KING WG, DILLON S, HALL A, FEIG L, RITTENHOUSE SE. Activation of platelet phosphatidylinositol 3-kinase requires the small GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 1993; **268**: 22251–22254.
- [97] ZHANG Q, COX D, TSENG C-C, DONALDSON JG, GREENBERG S. GTP hydrolysis by ARF6 is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Molec Biol Cell* 1997; **8**, suppl.: 454a
- [98] ZHU Z, BAO Z, LI J. MacMARCKS mutation blocks macrophage phagocytosis of zymosan. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17652–17655.

- [99] ZIGMOND SH, HIRSCH JG. Effects cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp Cell Res* 1972; **73**: 383–393.
- [100] ZIMMERLI S, MAJEED M, GUSTAVSSON M, STENDHAL O, SANAN DA, ERNST JD. Phagosome-lysosome fusion is a calcium-independent event in macrophages. *J Cell Biol* 1996; **132**: 49–61.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 05.06.1998 r.*

*Przyjęto: 14.09. 1998 r.*

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





# MECHANIZMY DETERMINACJI PŁCI U ROŚLIN\*

## MECHANISMS OF SEX DETERMINATION IN PLANTS

Agnieszka KUNACHOWICZ, Tomasz SAKOWICZ

Katedra Cytologii i Cytochemii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

**Streszczenie:** Większość roślin okrytozalążkowych wytwarza kwiaty obupłciowe. U niewielkiej liczby gatunków jednopiennych istnieje przestrzenne rozdzielanie organów płciowych polegające na istnieniu organów męskich i żeńskich w oddzielnych kwiatach tej samej rośliny. U roślin dwupiennych kwiaty męskie i żeńskie tworzą się na odrębnych osobnikach. W tym artykule omówiony jest aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów genetycznych i molekularnych, które są podstawą jedno- i dwupienności. W mechanizmach tych u roślin jednopiennych uczestniczą regulatory wzrostu, zaś u roślin dwupiennych – również chromosomy płci (X i Y). Przedstawione są ostatnie osiągnięcia w dziedzinie poszukiwania sekwencji DNA specyficznych dla płci.

**Słowa kluczowe:** rośliny okrytozalążkowe, jednopiennność, dwupiennność, determinacja płci.

**Summary:** The majority of angiosperm plants produce flowers that are hermaphrodite. In a small number of monoecious plant species, there is spatial separation of the sexual organs; the male and female organs are carried on separate flowers on the same plant. In dioecious plants male and female flowers are carried on separate individuals. This review focuses on the underlying genetic and molecular mechanisms of monoecy and dioecy. In both monoecious and dioecious plants these mechanisms involve growth substances while in the latter also sex chromosomes (X and Y) play an important role. The article reviews current data on the discoveries of sex-specific DNA sequences.

**Key words:** angiosperm plants, monoecy, dioecy, sex determination.

**Wykaz skrótów:** Amplifikacja **DOP-PCR** (ang. *degenerate oligonucleotide primed – PCR*) – wariant konwencjonalnej reakcji PCR, w której używa się zdegenerowanych primerów, aby zamplifikować reprezentatywną część genomu (wliczając tu sekwencje repetytywne i unikalne); **BSA** (*bulked segregant analysis*) – masowa analiza segregacji DNA, która oparta jest na identyfikacji markerów sprzężonych z badaną cechą; **RAPD** (ang. *random amplified polymorphic DNA*) – powielanie DNA z zastosowaniem starterów o dowolnej sekwencji; **RDA** (ang. *representational difference analysis*) – amplifikacja za pomocą PCR polimorficznych sekwencji DNA w obrębie porównywanych genomów.

\*Praca dofinansowana z grantu KBN Nr 6PO4C 04415.

## WSTĘP

W świecie zwierząt gatunki w większości są jedнопłciowe – gamety męskie i żeńskie powstają w drodze mejozy u oddzielnych osobników. Większość roślin wytwarza kwiaty hermafrodytyczne, które są uważane za doskonałe. Mają one organy płci zarówno męskiej, jak i żeńskiej. W pręcikach w wyniku mejozy powstają mikrospory, z których rozwija się gametofit męski wytwarzający plemniki, zaś w zalążkach – makrospory, dające początek gametofitowi żeńskiemu, w obrębie którego powstaje komórka jajowa.

Obecność pręcików i słupków na jednym kwiecie pozwala na samopylność (autogamia). Zgodnie z zasadami ewolucji faworyzowane są gatunki, które na skutek zmian w materiale genetycznym zyskują większą zdolność przetrwania. W myśl tej idei korzystniejsze dla wzrostu różnorodności genetycznej jest krzyżowanie między osobnikami pochodzącymi z różnych kwiatów (allogamia). Można wymienić trzy podstawowe mechanizmy zapobiegające samopylności:

1) różny czas dojrzewania męskich i żeńskich organów płciowych w obrębie kwiatów doskonałych (dichogamia),

2) samoniezgodność,

3) przestrzenne rozdzielenie męskich i żeńskich organów rozmnażania, czyli:

— jednopienność – organy męskie i żeńskie zlokalizowane są w odrębnych kwiatach na tej samej roślinie,

— dwupienność – poszczególne osobniki danego gatunku są męskie lub żeńskie w zależności od tego, jaki typ kwiatów wykształciły.

Istnieje również szereg typów pośrednich. Zestawiono je w tabeli 1.

Chociaż kwiatowa jednopienność wśród roślin wyższych występuje rzadziej niż hermafrodytyzm, liczne gatunki mające duże znaczenie dla rolnictwa są jedno- lub dwupienne. Wśród gatunków jednopiennych znajdują się: ogórek (*Cucumis sativus*), melon (*Cucumis melo*), leszczyna (*Corylus* spp.), figowiec (*Ficus carica*), rącznik (*Ricinus communis*), orzech włoski (*Juglans regia*), kukurydza (*Zea mays*). Dwupiennymi gatunkami są: szparag (*Asparagus officinalis*), daktylowiec (*Phoenix dactylifera*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), konopie (*Cannabis sativa*), chmiel (*Humulus lupulus*), pistacja (*Pistacia vera*), topola (*Populus* spp.), wierzba (*Salix* spp.), szpinak (*Spinacia oleracea*).

Większości kwiatów jedнопłciowych nie można odróżnić we wczesnych etapach rozwoju od kwiatów hermafrodytycznych, ponieważ wykształcają się w nich zaczątki zarówno pręcików, jak i słupków. Usunięcie lub zahamowanie rozwoju słupka w kwiatach męskich i pręcików w kwiatach żeńskich zachodzi później; jest to cecha charakterystyczna dla gatunku.

Niektóre gatunki, m.in. szpinak, konopie i szczyr roczny (*Mercurialis annua*) wydają się „omijać” etap hermafrodytyczny, w ich kwiatach rozwijają się zaczątki



TABELA 1. Pośrednie typy jedno- i dwupienności

Typ główny	Typ pośredni	Fenotyp*	Przykładowy gatunek
Jednopiennosc	Męskojednopiennosc	m m+z	<i>Cucumis melo</i> ( <i>Cucurbitaceae</i> )
	Zeńskojednopiennosc	z m+z	<i>Poa</i> ( <i>Poaceae</i> )
	Trójjednopiennosc	m z, m+z	<i>Dimorphoteca pluvialis</i> ( <i>Asteraceae</i> )
Dwupiennosc	Męskodwupiennosc	m, m+z	<i>Datisca glomerata</i> ( <i>Datisceae</i> )
	Zeńskodwupiennosc	z, m+z	<i>Plantago coronopus</i> ( <i>Plantaginaceae</i> )
	Trójdwupiennosc	z, m, m+z	<i>Pachycereus pringlei</i> ( <i>Cactaceae</i> )

\*m – męski, z – żeński, m+z – obupłciowy

organów tylko jednej płci: pręcików lub słupków [1]. Wśród roślin okrytonasiennych 4% stanowią gatunki dwupienne, a 7% – jednopienne [22].

Modele ewolucyjne zakładają wyłonienie się dwupiennosci z hermafrodytyzmu na skutek dwu oddzielnych mutacji w sprzężonych genach męskiej sterility i żeńskiej sterility [4].

Prawdopodobnie ewolucja wiodła przez żeńsko- lub męskodwupiennosc. Alternatywna koncepcja zakłada powstanie gatunków dwupiennych z jednopiennych. Mniej zbadana jest ewolucja jednopiennosci, jednak i w tym przypadku za formę wyjściową przyjmuje się rośliny obupłciowe, a za stadia przejściowe organizmy żeńsko- i męskojednopienne [1].

Determinacja płci u roślin kwiatowych, zarówno w aspekcie genetycznym jak i fizjologicznym, była popularnym tematem badań już od początków tego wieku. Jednak dopiero ostatnia dekada przyniosła efekty w dziedzinie analiz molekularnych. Możliwe stało się uzyskanie genetycznych markerów DNA specyficznych dla określonej płci, co stworzyło nowe perspektywy dla udzielenia odpowiedzi na kluczowe pytanie: w jaki sposób rośliny uzyskują płęć męską lub żeńską? Celem tej pracy jest przedstawienie współczesnej wiedzy na temat mechanizmów determinujących płęć u jedno- i dwupiennych gatunków roślin okrytozalążkowych.

## KONTROLA DETERMINACJI PŁCI

Istnieje wiele różnych szlaków prowadzących do wykształcenia się kwiatów jednopłciowych. Wydaje się, że w przypadku roślin dwupiennych istnieją genetyczne podstawy określające daną płęć – osobniki męskie i żeńskie różnią się pod względem genetycznym. Trudniejszy do zanalizowania pod kątem determinowania płci kwiatów jest przypadek roślin jednopiennych, ponieważ są one genetycznie jednolite.

Wyłaniają się zatem podstawowe pytania: które geny związane są z determinacją, jak determinowana jest płęć u roślin dwupiennych nie mających chromosomów płci i jak determinowana jest płęć poszczególnych kwiatów u roślin jednopiennych.

Rośliny wykorzystują rozmaite mechanizmy, aby uzyskać jedno- lub dwupienność. Prawdopodobnie takie podstawowe mechanizmy molekularne są zupełnie odmienne u różnych gatunków. Wydaje się zatem, że trudno zaproponować prosty lub ogólny model molekularny dla determinacji płci u roślin, co wynika m.in. ze stosunkowo nielicznych badań prowadzonych do tej pory metodami biologii molekularnej. Poniżej zostaną przedstawione mechanizmy kontrolowania płci u tych gatunków, u których systemy te zostały najlepiej poznane.

## DETERMINACJA PŁCI U ROŚLIN JEDNOPIENNYCH

Najintensywniej badana jest determinacja płci u dwóch gatunków roślin: ogórka (*Cucumis sativus*) i kukurydzy (*Zea mays*). Wspólne cechy determinacji płci w tych przypadkach to: wpływ regulatorów wzrostu na ten proces i występowanie stadium biseksualnego w kwiatach męskich i żeńskich.

### Kukurydza (*Zea mays*)

Te same osobniki wytwarzają oddzielne kwiatostany żeńskie – kolby i męskie – wiechy. Jednopłciowe kwiatostany są szczególną cechą kukurydzy; właściwość ta umożliwia produkcję hybrydowych nasion i eksperymenty genetyczne. Jednopłciowość osiągana jest w niedojrzałych obupłciowych merysystemach kwiatowych na drodze selektywnego hamowania rozwoju lub zanikania organów płci przeciwnej, dzięki interakcji genów determinujących płeć, hormonów i czynników środowiska [7]. Na wczesnym etapie rozwoju kwiatostany żeńskie i męskie są nie do rozpoznania. Staje się to możliwe dopiero po osiągnięciu przez kwiatostan długości 10 mm [1].

Właśnie u kukurydzy po raz pierwszy wyizolowano geny determinujące płeć. Znane są liczne loci, które wpływają na płeć kwiatów u kukurydzy, ale głównie uwagę skupia się na maskulinizującym genie *TS 2* (*Tasselseed 2*) i feminizującym *An 1* (*anther ear 1*) i *D* (*dwarf*).

W wyniku mutacji genów *D* czy *An 1* rozwój słupka w kolbie jest normalny, ale nie zachodzi rozwój pręcików. Mutacje tych genów powodują również opóźnienie kwitnienia, a także zmianę fenotypu (*d* – karłowaty, *an 1* – półkarłowaty). Z badań biochemicznych wiadomo, że mutanty te mają upośledzony szlak biosyntezy giberelin. Egzogenne dostarczenie takim roślinom tego hormonu powoduje powrót do fenotypu dzikiego.

Gen *An 1* został ostatnio sklonowany. Stwierdzono, że koduje on białko związane z syntezą *ent*-kaurenu, tetracykliny pośredniczącej w biosyntezie giberelin. Podanie *ent*-kaurenu powoduje feminizację. U roślin typu dzikiego poziom giberelin jest znacznie niższy w wiechach niż w kolbach, są one więc niezbędne dla uni-

cestwienia pręcików w kwiatach żeńskich. Gibereliny wydają się mieć jednak znaczenie dla męskiej płodności u większości gatunków dwuliściennych [15].

Zmapowano 5 loci genu *TASSELSEED* (*TS*), którego mutacje feminizują rośliny: *ts 1*, *ts 2*, *ts 3*, *ts 4* i *ts 5*. W najbardziej ekstremalnych przypadkach (*ts 1*, *ts 2*) powodują one odwrócenie płci w kwiatach wiechy – rozwijają się w nich słupki, a rozwój pręcików zostaje zahamowany. Uważa się, że geny *TS 1* i *TS 2* powodują zanik słupka w kwiatach męskich i determinują drugorzędowe cechy płciowe. Gen *TS 2* został sklonowany – koduje on białko, które przypomina dehydrogenazy steroidowe [1]. Funkcja dehydrogenazy sugeruje, że mogłoby ono inaktywować hormony konieczne do rozwoju słupka. Z drugiej strony, mogłoby prowadzić do produkowania toksyn zabijających komórki, w których powstają [15]. Analiza podwójnych mutacji w genach *TS* i *D* sugeruje, że geny te działają niezależnie i addytywnie, u mutantów *ts 2 / d 1* kwiaty w kolbach i wiechach mają dobrze rozwinięte pręciki. Może z tego wynikać, że substancje hamujące rozwój pręcików, być może gibereliny, produkowane są przez rozwijające się słupki [7].

Unicestwienie zawiązków organów żeńskich w kwiatach męskich uważane jest za klasyczny przykład apoptozy u roślin [11].

Zaproponowano następujący model dla determinacji płci u kukurydzy: gen *SILKLESS 1* (*SK 1*) daje sygnał do rozwoju słupka, słupek wytwarza specyficzny czynnik (PSF – ang. *pistil specific factor*) – prawdopodobnie jest on gibereliną, czynnik ten hamuje rozwój pręcików i feminizuje tkanki kwiatowe. *TS 2* indukuje zanikanie słupka i hamuje ekspresję genu *SK 1*, blokuje więc rozwój słupka, produkcję PSF i hamowanie rozwoju pręcików [7]. Zasadniczą kwestią, która w dalszym ciągu pozostaje do wyjaśnienia, jest: czy istnieje gen, który decyduje o rozwoju kolby lub wiechy oraz w jaki sposób zachodzi taka kontrola ?

### Ogórek (*Cucumis sativus*)

Gruntowna analiza determinacji płci u ogórka przyniosła korzyści zarówno naukowe, jak i praktyczne, szczególnie ze względu na tworzenie hybrydowych nasion w pokoleniu F1.

Generalnie gatunek ten jest jednopienny, można jednak znaleźć szereg genotypów, które mają kwiaty żeńskie, męskie lub hermafrodytyczne. Kwiaty z pręcikami występują w grupach, kwiaty ze słupkami zaś pojedynczo. W pączkach kwiatowych pojawiają się zaczątki organów płci przeciwnej, których rozwój zostaje zahamowany. Szczątkowe organy są obecne w dojrzałych kwiatach ogórka.

Ekspresję płci u tego gatunku charakteryzują 3 fazy:

- 1) wytwarzanie kwiatów męskich,
- 2) wytwarzanie kwiatów męskich i żeńskich,
- 3) wytwarzanie kwiatów żeńskich.



Muszą zatem istnieć geny, które regulują płęć kwiatów i determinują ich umiejscowienie na roślinie. Zidentyfikowano 7 genów dotyczących fenotypu płci, kombinacja alleli w 3 niesprzężonych genach odpowiada za większość fenotypów płci u ogórka [16]. Dominujący allel *M* wywołuje obupłciowość kwiatów, częściowo dominujący allel *F* kontroluje wytwarzanie kwiatów żeńskich, a recesywny allel genu *A* zwiększa prawdopodobieństwo męskich homozygot względem recesywnego allelu genu *F* [16].

Płęć ogórka może ulegać zmianie pod wpływem egzogennych regulatorów wzrostu. Żeńskość wywołuje etylen i auksyny, męskość zaś powodowana jest przez gibereliny i związki, które są antagonistami etylenu [16]. Gibereliny nie tylko indukują kwiaty męskie na roślinach żeńskich, ale również powodują śmierć kwiatów żeńskich i tworzenie przypadkowych pączków kwiatów męskich [1].

Istnieją dwie hipotezy dotyczące determinacji płci u roślin o kwiatach jednopłciowych przez regulatory wzrostu. W systemie dwóch regulatorów wzrostu, każdy odpowiada za jedną płęć. W systemie pojedynczego regulatora wzrostu związek taki teoretycznie ma receptory męskie i żeńskie, które powodują niezależne hamowanie jednej płci i indukowanie przeciwnej. Trafność drugiego modelu została sprawdzona na ogórku. Wyniki doświadczeń poparły założenie, w myśl którego w tym przypadku tylko jeden regulator wzrostu związany jest z determinacją płci. Jest nim etylen, a nie gibereliny, ponieważ ma on zdolność znoszenia aktywności giberelin. Hipotetyczny gen *F* kontroluje wewnętrzne stężenie etylenu, a hipotetyczny gen *M* kontroluje wrażliwość osobników męskich na etylen. Kombinacje alleli dominujących i recesywnych w tych loci prowadzą do różnych poziomów etylenu i różnych wrażliwości na ten związek, co odpowiada za płęć fenotypową [1]. W tym modelu dopiero wyizolowanie stosownych genów może potwierdzić tę hipotezę.

## 2. DETERMINACJA PŁCI U ROŚLIN DWUPIENNYCH

Wśród wielu gatunków roślin dwupiennych jedynie niewielka liczba była szczegółowo analizowana z uwzględnieniem mechanizmu determinacji płci. Należą do nich m.in. konopie, chmiel, szczaw. Badania takie wiążą się z poszukiwaniem u danego gatunku chromosomów płci, sprawdzeniem, czy na determinację mają wpływ regulatory wzrostu, a także ze stwierdzeniem stabilności dwupienności w odpowiedzi na zmiany warunków środowiska. Liczne doświadczenia prowadzone na gatunkach, u których udokumentowano występowanie chromosomów płci, potwierdziły założenie, że wśród roślin istnieją różne strategie determinacji płci, np. system aktywnego chromosomu Y, system stosunku liczby chromosomów X do liczby autosomów oraz regulowana hormonalnie konwersja płci [22].

## Chromosomowe podstawy dwupienności

Roślinne chromosomy płci opisał po raz pierwszy Allen w 1919 roku u wątrobowca *Sphaerocarpus donnellii*. Kilka lat później odkryto heteromorficzne chromosomy płci u osobników męskich i homomorficzne u osobników żeńskich roślin kwiatowych *Rumex acetosa* i *Melandrium rubrum* (syn. *Silene dioica*). Od tego czasu prowadzi się intensywne poszukiwania chromosomów płci wśród dwupiennych roślin kwiatowych, jednak lista dobrze udokumentowanych przypadków jest krótka. Ogranicza się do przedstawicieli pięciu rodzin: *Cannabinaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Loranthaceae* i *Polygonaceae*. Mimo znacznego rozwoju technik cytologicznych w ciągu ostatnich 40 lat udało się opisać bardzo mało systemów chromosomów płci. Fakt ten sugeruje, że systemy chromosomów płci u roślin okrytozależkowych są raczej wyjątkiem; występują one u zaledwie 1 czy 2 gatunków w obrębie rodziny. Np. rodzinę *Caryophyllaceae* tworzy ponad 2000 gatunków, jednym z rodzajów wchodzących w jej skład jest *Melandrium* (500 gatunków), ale tylko dwa – *M. album* i *M. rubrum* mają chromosomy płci (ref. [1]). *Cannabinaceae* jest jedyną rodziną, w której u wszystkich gatunków (3) stwierdzono obecność chromosomów płci. Tworzą ją 2 gatunki chmielu: *Humulus lupulus* i *Humulus japonica* oraz konopie – *Cannabis sativa*. Jednak nawet w obrębie tak małej rodziny istnieją różnice w tych systemach [18]. Chromosomy płci u roślin kwiatowych ewoluowały zatem niezależnie, badania porównawcze nie doprowadzą więc do odkrycia ewolucyjnych dróg prowadzących do wyróżnicowania się chromosomów płci.

W genomie roślinnym chromosomy Y są większe niż X u wszystkich gatunków z wyjątkiem *H. lupulus* i *Viscum*. Poza tym, chromosomy X i Y są największe w obrębie rodzaju *Melandrium*, *Rumex*, *Coccinia*. Ewolucja chromosomów płci wydaje się być związana ze wzrostem zawartości DNA w chromosomach Y. Zakłada się, że wielkość chromosomu Y to jedynie przypadkowa zbieżność. Inne wytłumaczenie tego zjawiska będzie bardzo trudne [1].

## System aktywnego chromosomu Y

Rośliną dwupienną, u której płeć determinuje system aktywnego chromosomu Y jest *Melandrium album*. Osobniki męskie mają kariotyp  $2n = 2x = 24, XY$ , żeńskie zaś  $2n = 2x = 24, XX$  [5]. Jeden z dwóch chromosomów X jest bardzo wysoko zmetylowany, późno replikujący i względnie silnie skondensowany [21, 22]. Stan taki jest efektem tzw. mechanizmu kompensacji, który ma na celu wyrównanie poziomu ekspresji genów związanych z chromosomami X u obu płci (tzw. lyonizacja odkryta u ssaków). Specyficzny dla osobników męskich chromosom Y jest zwykle opisywany jako heterochromatynowy i późno replikujący, jednak wykazano, że nie jest wysoko zmetylowany, zatem odgrywa aktywną rolę w rozwoju roślin męskich [22]. Geny, które wpływają na rozwój cech męskich i hamują żeńskość,

znajdują się w chromosomie Y. Chromosom X wydaje się być istotny zarówno dla osobników męskich, jak i żeńskich, ponieważ techniką *in vitro* można otrzymać jedynie haploidalne osobniki żeńskie [23]. Egzogenne regulatory wzrostu: gibereliny, auksyny i cytokininy nie wywołują konwersji płci [1]. Jednak 5-azacytydyna, związek powodujący demetylację reszt cytydyny hamuje supresję cech żeńskich u osobników męskich. W populacji pojawiają się tzw. androhermafrodyty, czyli rośliny mające kwiaty męskie i obupłciowe. Genotypowo są to osobniki męskie mające chromosom Y. Androhermafrodytyzm może być wynikiem procesów epigenetycznych, które znoszą działanie genów hamujących rozwój cech żeńskich związanych z chromosomem Y lub aktywują geny determinujące żeńskość, zlokalizowane w autosomach [14]. Obecność pojedynczego chromosomu Y może hamować rozwój żeńskości nawet przy obecności trzech chromosomów X. Wyższa liczba kopii chromosomu X „zagłusza” maskulinizujący efekt działania chromosomu Y. Zwiokrotnienie zespołu autosomów nie wywiera wpływu na geny determinujące płęć obecne w chromosomie Y. Sugeruje to, że właśnie chromosom Y odgrywa decydującą rolę w determinowaniu płci u *M. album*. Zidentyfikowano 3 różne regiony tego chromosomu, które spełniają odrębne funkcje przy determinacji płci. Jeden odcinek dystalny chromosomu zawiera geny, które hamują tworzenie słupka, drugi odcinek dystalny zawiera gen(y) męskiej płodności, region środkowy zawiera gen(y) wymagane do zainicjowania pręcików, zatem chromosom Y u *M. album* zawiera kompletne sprzężenie między genami hamującymi rozwój płci żeńskiej i niezbędnymi do rozwoju płci męskiej.

U szparaga istnieje system homomorficznych chromosomów płci XX / XY, gdzie płcią heterogametyczną są osobniki męskie. Szparag jest „męsko” dominujący i zawiera dwuczęściowy gen typu aktywacja męskości /hamowanie żeńskości, podobnie jak *M. album*. Poziom cytokinin, IAA i ABA (antygiberelina) jest wyższy u osobników męskich niż u żeńskich.

Prawdopodobnie między poszczególnymi regulatorami istnieje stan równowagi, nie ma zaś określonego ich poziomu, którego wartość byłaby istotna dla determinowania płci [2]. Wykazano, że gibereliny wywołują efekt maskulinizujący [7]. Sugeruje to, że ABA odgrywa rolę w określaniu stanu równowagi między regulatorami wzrostu [2]. W dwupiennych populacjach szparaga czasem znajdowane są rośliny męskie z nielicznymi kwiatami hermafrodytycznymi. Kwiaty te są samopylne i tworzą homogametyczne osobniki męskie (YY). Ponieważ do praktycznego zastosowania wymagane są osobniki o określonej płci, rośliny YY i XX ze względu na zwiększoną żywotność wykorzystuje się jako osobniki rodzicielskie w celu uzyskania męskich hybrydowych nasion w pokoleniu F1. Brak heteromorficznych chromosomów i żywotność genotypu YY sugeruje, że dwupienność u szparaga pojawiła się względnie niedawno [6].



System stosunku liczby chromosomów X do liczby autosomów ( $X : A$ )

Rodzaj *Rumex*, podrodzaj *acetosa* zawiera 10 gatunków roślin dwupiennych, u których determinację płci kontroluje stosunek  $X : \text{autosomy}$ . Kariotyp osobników żeńskich to:  $2n=14,XX$  a męskich  $2n=15,XY_1Y_2$ , jednak rośliny o kariotypach  $XXY$  i  $XXY_1Y_2$  są płodnymi osobnikami żeńskimi. Chromosomy Y są późno replikujące i heterochromatynowe. Wśród poliploidów organizmy o stosunku  $X : \text{autosomy}$  równym 1 i więcej są osobnikami żeńskimi, wartość 0,5 i niższa charakteryzuje płć męską. Interseksy powstają przy wartości między 0,5 a 1 [18].

Chromosomy Y u *Rumex* są konieczne do uzyskania płodnego pyłku, ale nie wydają się niezbędne do rozwoju pręcików. Obecność  $Y_1$  i  $Y_2$  pozwala na prawidłowy przebieg mejozy komórek macierzystych pyłku. W przeciwieństwie do *Melandrium album*, chromosomy Y u *Rumex* nie hamują rozwoju słupka [6].

*Humulus lupulus* – chmiel uprawny ma  $2n = 20$  u obu płci. Główne znaczenie gospodarcze mają rośliny żeńskie. Istnieje co najmniej 5 różnych systemów chromosomów płci u *H. lupulus*. Wśród roślin pochodzenia europejskiego organizmy żeńskie mają chromosomy płci typu  $XX$ , a męskie  $XY$  oprócz tego 9 par autosomów. Istnieją również różnice pod względem proporcji wielkości między X a Y wśród odmian, niektóre są homomorficzne. U *H. lupulus* subsp. *cordifolius* z Japonii powstały systemy zwielokrotnione u płci żeńskiej  $X_1X_1X_2X_2$ , a u męskiej  $X_1X_2Y_1Y_2$ . Poza odmianami homomorficznymi, chromosomy Y u chmielu są wyjątkiem wśród roślin – jako jedyne są mniejsze od chromosomów X. *H. japonicus* ma system chromosomów płci podobny do systemu *Rumex acetosa*: kariotyp osobników żeńskich  $2n = 14, XX$ , a męskich  $2n = 14, Y_1Y_2$ .

Determinacja płci u *H. lupulus* i *H. japonicus* opiera się na mechanizmie analogicznym do *Rumex*. Stosunek liczbowy chromosomów X do autosomów niższy i równy 0,5 związany jest z fenotypem męskim, natomiast 1 to fenotyp żeński. Wartości pośrednie to fenotypy jednopienne interseksualne. Męski fenotyp nie zależy od obecności chromosomu Y, chociaż jego brak powoduje tworzenie nieżywotnego pyłku. Można jednak manipulować płcią kilku odmian *japonicus* przez zastosowanie słabej syntetycznej auksyny – kwasu  $\alpha$ -propionowego. Indukuje on wytwarzanie na żeńskich roślinach pewnej liczby kwiatów męskich [1].

Zmienność wśród genetycznych mechanizmów, które leżą u podstaw determinacji płci, odzwierciedla kontrola tego procesu na poziomie fizjologicznym. Można bowiem mówić o hormonalnym typie regulowania płci, który bywa przez niektórych uznawany za trzeci główny rodzaj determinowania męskości lub żeńskości.

### Regulacja hormonalna płci

*Mercurialis annua* jest gatunkiem dwupiennym o homomorficznych chromosomach i heterogametyczności płci męskiej ( $2n = 16$ ). Z determinacją płci wiąza

się kombinacje 2 alternatywnych alleli w każdym z 3 niesprzężonych loci  $A$ ,  $B_1$  i  $B_2$ . Loci te dotyczą poziomych regulatorów wzrostu: auksyn i cytokinin. Męskość jest indukowana przez obecność dominującego allelu  $A$  wraz z jednym czy więcej dominujących alleli w loci  $B_1$  i  $B_2$ . „Siła” męskości w znaczeniu oporności na feminizujące efekty cytokinin jest odzwierciedleniem liczby dominujących alleli  $B$ . Żeńskość jest indukowana przez obecność dominującego allelu  $A$  i recesywnych alleli w obu loci  $B$  albo przez obecność recesywnego allelu w locus  $A$  i dominującego allelu w jednym z loci  $B$  [10].

Ekspresja płci u *M. annua* podlega działaniu regulatorów wzrostu. Auksyny wpływają maskulinizująco, cytokiny zaś feminizująco. Wysoki poziom endogennej cytokiny (trans-zeatyny) wydaje się być skorelowany z indukowaniem rozwoju owocolistków w ząbkach kwiatów. U osobników męskich kumulowane są nukleotydy zeatyny, nie zaś wolne zasady. Wykazano, że jakościowa i ilościowa zmienność zeatyny u roślin męskich i żeńskich znajduje się pod kontrolą genów determinujących płć. Zaobserwowano u kilku innych roślin dwupiennych, u gatunków: *Spinacia*, *Cannabis* feminizację kwiatów męskich przez wpływ cytokinin. Zdolność mechanizmu determinacji płci do konwersji przez traktowanie hormonalne sugeruje, że ząbki kwiatów są bipotencjalne płciowo, a także geny determinacji płci regulują alternatywne programy płciowości prawdopodobnie przez mechanizm przesyłania sygnału, który modyfikuje endogenne poziomy auksyn i cytokinin [10].

Podsumowując, działanie maskulinizujące i feminizujące poszczególnych regulatorów wydaje się być zależne od gatunku. Te same regulatory mogą odwrotnie działać na różne rośliny, np. cytokiny powodują konwersję płci męskiej do żeńskiej u *Mercurialis annua*, ale działają przeciwnie u innych gatunków. U *Melandrium album* regulatory mają bardzo mały wpływ na płć lub nie mają go wcale. Zmienność ta może być wynikiem różnicy w podstawowych mechanizmach determinujących płć.

### Kryptodwupienność – *Actinidia deliciosa*

U dwupienego gatunku kiwi (*Actinidia deliciosa*) dojrzałe kwiaty męskie i żeńskie są pozornie identyczne. Rośliny męskie mają kwiaty z pręcikami, w których tworzą się żywotne ziarna pyłku oraz małą zalążnię o szczytkowym znamieniu, która nie zawiera komórek jajowych. Rośliny żeńskie mają kwiaty z pręcikami, w których tworzy się sterylny pyłek i zalążnię z zalążkami zawierającymi komórki jajowe.

Różnice strukturalne między kwiatami męskimi i żeńskimi powstają w bardzo późnym etapie rozwoju, równolegle z mikrosporoogenezą. Analiza tego procesu u osobników żeńskich wykazała, że nieżywotność ziaren pyłku spowodowana jest zakłóceniami w tworzeniu intynowej części ściany pyłku.

Zjawisko pozornie identycznej budowy kwiatów męskich i żeńskich u roślin dwupiennych połączone z funkcjonalnym upośledzeniem organów rozmnażania płci przeciwnej, czyli kryptodwupienność, spotykana jest u wszystkich 60 gatunków rodzaju *Actinidia*. Kryptodwupienność gatunków roślinnych obecna jest u wielu nie spokrewnionych rodzin; w obrębie rodziny może być jeden taki rodzaj lub gatunek, co świadczy o niezależnym ewoluowaniu tego zjawiska. Wytwarzanie sterylne pyłku może wydawać się rozrzutnością natury, może być jednak wyjaśnione przez fakt, że nawet taki pyłek jest atrakcyjny dla zapylających kwiaty owadów. Prawdopodobnie mutacje, które sprzyjają usuwaniu sterylnych organów, ulegają negatywnej selekcji.

U diploidalnych i poliploidalnych osobników *Actinidia* kontrolowane krzyżówki dają w potomstwie stosunek roślin męskich do żeńskich 1 : 1, a płć męska wydaje się być heterogametyczna. Zaproponowano w tym przypadku system kontroli ekspresji płci oparty na jednym lub więcej sprzężonych genów lub parze chromosomów X / Y. Jak na razie brak dowodów na istnienie u kiwi chromosomów płci.

Bardziej podrzędne geny modyfikujące wydają się odpowiadać za feminizowanie roślin męskich, a ich ekspresja prawdopodobnie wzmacniana jest przez wpływ środowiska. Nie uważa się, aby geny maskulinizujące były obecne u roślin żeńskich.

Niestabilność systemu endogennych regulatorów wzrostu może sugerować ich wpływ na determinację płci u kiwi, choć informacje na ten temat są bardzo skąpe [1].

## MOLEKULARNE RÓŻNICE MIĘDZY DNA OSOBNIKÓW O RÓŻNEJ PŁCI; GENETYCZNE MARKERY

Niezwykle interesujące wydaje się być zagadnienie, jakie są różnice pod względem molekularnym między genomami organizmów męskich i żeńskich tego samego gatunku. Wiadomo np. że genom osobników męskich *Melandrium album* składa się z  $5.645 \times 10^9$  pz, a u żeńskich  $2C \text{ DNA} = 5.532 \times 10^9$  pz [3].

Różnice w zawartości DNA między organizmami męskimi a żeńskimi są punktem wyjścia do opracowania technik szybkiej identyfikacji płci. Wśród roślin dwupiętnych duże znaczenie ekonomiczne mają rośliny żeńskie, które uprawiane są dla owoców i nasion, np. kiwi, chmiel, daktylowiec, pistacja. Wyjątkiem jest szparag – preferuje się tu rośliny męskie. Ważny jest zatem rozwój systemów wczesnego diagnozowania płci u owocowych roślin dwupiętnych. Można tego dokonać np. dzięki analizie DNA techniką cytometrii przepływowej. Metoda ta jest szczególnie przydatna przy określaniu płci we wczesnych etapach rozwoju rośliny [8].

Wśród całkowitego DNA wyizolowanego z roślin o określonej płci szuka się sekwencji DNA specyficznych dla płci. Na przykład technika RAPD pozwoliła



na amplifikowanie kilkunastu losowo wybranych sekwencji (kryterium był dobór primerów) z DNA *Cannabis sativa*, w ten sposób znaleziono jedną sekwencję specyficzną dla płci męskiej o długości 729 pz [20]. Jest to sekwencja nie kodująca i nie wykazująca homologii z innymi sekwencjami. Może ona być linkerem lub sekwencją związaną z konstrukcją chromosomów płci [20]. U pistacji za pomocą tej samej techniki udało się wśród zamplifikowanych 700 sekwencji znaleźć jedną specyficzną dla organizmów żeńskich – OPO08<sub>945</sub>. Dalsze badania potwierdziły, że marker OPO08<sub>945</sub> jest ściśle związany z segmentem chromosomu determinującego płęć u *Pistacia vera* [12]. U dwupiennego gatunku *Atriplex garrettii* (*Chenopodiaceae*) dzięki RAPD zidentyfikowano fragment DNA o długości 2075 pz, który był charakterystyczny dla organizmów męskich i jedynej analizowanej rośliny hermafrodytycznej. Został on całkowicie zsekwencjonowany. Aż 318 pz w tym fragmencie stanowią różne warianty sekwencji powtarzalnych; są to powtórzenia zarówno doskonałe (ang. *perfect*), jak i niedoskonałe (ang. *imperfect*). Sekwencja ta nie jest częścią regionu transkrybowanego. Analiza cytogenetyczna nie wykazała u *A. garrettii* heteromorficznych chromosomów płci [19]. Również u szparaga markery RFLP zostały z powodzeniem wykorzystane dla wykazania molekularnych różnic między płcią.

W stosunku do gatunków roślin dwupięnnych, które mają chromosomy płci, znalazły zastosowanie metody cytologiczne. U daktylowca można łatwo rozróżnić płęć badając jądra interfazowe w komórkach merystemu korzeniowego przy założeniu, że w komórkach roślin męskich występują dwa niejednakowo fluoryzujące bloki heterochromatynowe, zaś w komórkach roślin żeńskich bloki te wykazują jednakową intensywność fluorescencji [1].

## SEKWENCJE DNA W CHROMOSOMACH PŁCI U ROŚLIN

Mało wiadomo o naturze sekwencji DNA znajdujących się w roślinnych chromosomach płci. Chromosomy Y u szczawiu wydają się być chromocentrami w jądrach interfazowych. Zbudowane są z tzw. fakultatywnej heterochromatyny i są aktywne transkrypcyjnie podczas kilku cykli bezpośrednio przed mejozą w komórkach macierzystych pyłku. Próbowano wyizolować sekwencje powtarzalne specyficzne dla chromosomu Y, próby te zakończyły się niepowodzeniem, chociaż uzyskano 7 niehomologicznych powtórzeń. Sekwencje te były rozproszone w genomie. Sekwencja powtarzalna o dł. 180 pz wyizolowana z roślin tego samego gatunku hybrydowała *in situ* tylko z DNA chromosomów płci Y<sub>1</sub> i Y<sub>2</sub>, również oba ramiona chromosomu X dawały silny sygnał hybrydazyjny. Brak dowodu na występowanie tej sekwencji w obrębie autosomów. Jej rozkład sugeruje po-

chodzenie chromosomów Y od chromosomu X lub jego ewolucyjnego prekursora (ref. [1]).

Za pomocą techniki BSA udało się zamplifikować cztery sekwencje charakterystyczne dla DNA męskich osobników *Melandrium album* [17].

Technika RDA pozwala amplifikować za pomocą PCR sekwencje DNA, które są polimorficzne w obrębie porównywanych genomów. Możliwe jest więc przeprowadzenie tego typu analizy między DNA wyizolowanymi z osobników różnej płci tego samego gatunku; te odmienne DNA traktuje się jako odrębne genomy. Zastosowanie różnych enzymów restrykcyjnych w początkowych etapach preparatyki pozwala zanalizować różne części genomu. U *Melandrium album* uzyskano w ten sposób cztery klonów zawierające sekwencje specyficzne dla chromosomu Y. Wszystkie są sekwencjami powtarzalnymi i nie kodują genów aktywnych transkrypcyjnie, nie mają też znaczącej homologii ze znanymi genami. Niewielkie podobieństwo ogranicza się jedynie do ciągów powtarzalnego DNA w jednym z klonów Bgl 16 (72% homologii z retrotranspozonom u *Arabidopsis thaliana*); sklonowana sekwencja Bam 37 wykazywała zaś 89% homologii z powtarzalną sekwencją rodziny Alu u człowieka. Uzyskane sekwencje wykorzystuje się ponadto do mapowania chromosomu Y *M. album* na podstawie analizy kariotypów mutantów otrzymanych przez poddawanie ziaren pyłku działaniu promieni X. Znajomość rodzaju mutacji, o czym świadczy występowanie kwiatów hermafrodytycznych lub bezpłciowych u testowanych roślin, pozwala na wstępne określenie funkcji genów sąsiadujących z sekwencjami markerowymi [9]. Bezpośrednim podejściem przy izolowaniu sekwencji chromosomowo-specyficznych może być zastosowanie cytometrii przepływowej (ang. *chromosome sorting*) i mikrorozdziału z wykorzystaniem mikromanipulatora (ang. *microdissection*). Cytometria przepływowa została zastosowana przy izolowaniu chromosomu Y u *M. album*. Pozwoliło to na tworzenie bogatych bibliotek genomowych i wyizolowanie sekwencji DNA, które są specyficzne dla chromosomu Y (ref. [1]). Mikrorozdział chromosomów został zastosowany w przypadku chromosomu X u *M. album*. Przez amplifikację DOP-PCR skonstruowano bibliotekę genomową, z której sześć klonów charakteryzowano szczegółowo przez hybrydyzację typu Southern, Northern i FISH. Wszystkie klonów zawierały sekwencje powtarzalne i pochodziły z telomerowego regionu chromosomu X. Mapowały się one w subterminalnych regionach większości ramion chromosomowych, brakowało ich w niehomologicznym ramieniu chromosomu Y, stąd wniosek, że chromosom Y różni się od pozostałych elementów genomu. Po zsekwencjonowaniu żaden z tych klonów nie był dostatecznie charakterystyczny, chociaż jeden zawierał krótkie powtórzenia konserwatywnych roślinnych sekwencji telomerowych [3].

Wobec ogromu pracy i zaangażowania autorów szukających sekwencji specyficznych dla płci u gatunków roślinnych, liczba wyników pozytywnych wydaje się być niewielka. Zrealizowanie takiego zamierzenia jest bowiem niezwykle trudne.

TABELA 2. Zidentyfikowane sekwencje DNA specyficzne dla płci u roślin okrytozalążkowych

Gatunek	Sekwencja DNA	Specyficzność płci	Lokalizacja	Wykorzystana technika	Autor
<i>Cannabis sativa</i>	MADC1 729 pz	Męska	?	RAPD	[20]
<i>Pistacia vera</i>	OPO08 945 pz	Żeńska	Chromosom determinujący płęć	RAPD	[12]
<i>Atriplex garrettii</i>	2075 pz	Męska	?	RAPD	[19]
<i>Melandrium album</i>	800 pz	Męska	Chromosom Y	BSA	[17]
<i>Melandrium album</i>	Bgl7, X99865 Bgl10, X99866 Bgl16, X99867 Bam37, X99864	Męska	Chromosom Y	RDA	[9]
<i>Melandrium album</i>	X - 3, 254 pz X - 12, 750 pz X - 36, 310 pz X - 41, 256 pz X - 43.1, 208 pz X - 43.2, 400 pz	Żeńska	Telomerowy region chromosomu X	DOP-PCR	[3]
<i>Melandrium album</i>	Biblioteki cDNA	Męska	Chromosom Y	Cytometria przepływowa, sortowanie chromosomów	ref. [1]

Prawdopodobnie wynika to z faktu, że segment(y) DNA związane z determinacją płci nie są duże i zawierają od jednego do kilku genów. W przypadku roślin o wyodrębnionych chromosomach płci sekwencje takie zlokalizowane są w ich obrębie, jednak rośliny pozbawione chromosomów płci mają takie sekwencje zlokalizowane w różnych obszarach genomu. Możliwy niski poziom ekspresji tych genów i tłumiący efekt całkowitego DNA utrudnia poszukiwania. W tabeli 2 zestawiono zidentyfikowane u poszczególnych gatunków sekwencje DNA specyficzne dla płci

## PERSPEKTYWY

Wiadomo, że identyfikacja kluczowych genów, które determinują płęć u roślin, nie będzie łatwa. Celem klonowania mają być geny, które kontrolują rozwój kwiatów u roślin hermafrodytycznych. Problemem przy izolowaniu genów z roślin dwupiennych jak *Rumex* czy *Melandrium* jest fakt, że standardowe genetyczne mapowanie i spacerowanie po chromosomie (*ang. chromosome walking*) nie dają się w tym przypadku zastosować. Trudno jest uzyskiwać użyteczne dla mapowania



populacje gatunków, które nie są samopylne, ponieważ mutacje dotyczące płci nie wywoływane przez poliploidyzację czy delecje dużych fragmentów DNA będą występować rzadko. Standardowe metody molekularne łącznie z przeszukiwaniem bibliotek cDNA mogą nie przynieść efektów, bowiem poziom ekspresji genów determinujących płęć jest prawdopodobnie bardzo niski. Łatwiejsze do zidentyfikowania i scharakteryzowania wydają się geny związane z różnicowaniem płci.

W celu izolowania genów determinujących płęć stosowane są różne metody, np. mikrorozdział chromosomów, hybrydyzacja *in situ*, *differential display*, RDA, RAPD. Przy pomocy tych technik prowadzone są ostatnie badania, które mają na celu: identyfikowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji podczas rozwoju osobników męskich i żeńskich *Melandrium album* i szparaga. U *M. album* wykryto kilka klonów cDNA, które stanowią geny związane z rozwojem pręcików. Tworzone są również chromosomowo-specyficzne biblioteki w celu scharakteryzowania sekwencji DNA znajdujących się w tych chromosomach. Aktualnie izoluje się również geny chromosomu X u szczawiu, które podlegają ekspresji w czasie rozwoju kwiatów. Na obecnym etapie badań ani *M. album*, ani szczaw nie były transformowane. Jeżeli przypuszczalna determinacja płci przez określone geny zostanie potwierdzona przez ich wyizolowanie, konieczny stanie się rozwój systemów transformowania tych gatunków roślin.

## PODSUMOWANIE

Systemy determinacji płci u roślin, prowadzące do jednopłciowości: jedno- i dwupienności ewoluowały niezależnie wiele razy i są jedną ze strategii zapobiegania krzyżowaniu wsobnemu. W systemach jednopłciowych standardowe hermafrodytyczne kwiaty zostały zmodyfikowane w kierunku odrębnych kwiatów męskich i żeńskich. W przypadku jednopienności u kukurydzy i ogórka wydaje się istnieć silny wpływ roślinnych substancji wzrostowych na determinację płci, chociaż systemy te różnią się. Manipulowanie płcią przez zmianę poziomu substancji wzrostowych czy równowagi między różnymi regulatorami wydaje się być sposobem na wyznaczanie różnych pozycji dwu typów kwiatów na tej samej roślinie. Nie jest dotąd wyjaśnione, w jaki sposób zachodzi kontrola różnych poziomów tych substancji w łodydze.

O zmienności podstaw genetycznych u gatunków dwupienych świadczy np. duża zmienność między gatunkami. Rośliny dwupienne można jednak spróbować podzielić na dwie grupy. Pierwsza zawierałaby takie gatunki, jak: *Mercurialis annua*, *Spinacia oleracea*, *Cannabis sativa* i *Humulus lupulus*. Pochodzą one z taksonów, w których gatunki pokrewne są roślinami w większym stopniu jednopienymi niż hermafrodytycznymi (albo wszystkie są dwupienne). Różnice między kwiatami męskimi a żeńskimi są tu programowane we wczesnych etapach ich rozwoju, prawdopodobnie w drodze zmiany poziomu regulatorów wzrostu. Druga grupa to np.

*Melandrium* i *Rumex*, których krewni są w większości roślinami hermafrodytycznymi. Kwiaty męskie i żeńskie w tej grupie mają szczątkowe organy przeciwnej płci. Mało jest dowodów na wpływ u tych roślin substancji wzrostowych na płęć. Dwupienność jest u nich bardzo stabilna, środowisko wywiera na nią nieznaczny wpływ. Zaproponowano więc, że dwupienność powstała z jednopienności jako środowiskowo niestabilnego systemu kontrolowanego przez substancje wzrostowe lub z hermafrodytyzmu, gdzie podstawowe mechanizmy są bardzo stabilne i kontrola nie jest związana z regulatorami wzrostu [1]. Fakt, że te same substancje wzrostowe mają całkiem odmienny wpływ na różne rośliny, świadczy o tym, że mechanizmy związane z pierwszą grupą są fundamentalnie różne.

Nie wydaje się, aby istniała korelacja między ewolucją heteromorficznych chromosomów płci i mechanizmem determinacji płci. W terminach ewolucyjnych najstarszymi, istniejącymi systemami mogą być te o wysoko wyewoluowanych chromosomach płci. Jednak wierzba i topola z rodziny *Salicaceae*, w której wszystkie gatunki są dwupienne, mają kwiaty jednopłciowe, ale brak u nich chromosomów płci. Być może, nowoczesne metody cytologiczne pozwolą je odróżnić.

Determinacja płci stanowi przykład decyzji rozwojowej podejmowanej przez komórkę. Wybiera ona zaledwie między dwoma stanami: męskością a żeńskością. Jednak wyizolowanie kluczowych genów związanych z taką determinacją nie będzie proste.

## LITERATURA

- [1] AINSWORTH C, PARKER J, BUCHANAN-WOLLASTON V. Sex determination in plants. *Cur Top Dev Biol* 1998; **38**: 167–223.
- [2] BRACALE M, CAPORALI E, GALLI MG, LONGO C, MARZIANI-LONGO G, ROSSI G, SPADA A, SOAVE C, FALAVIGNA A, RAFFALDI F, MAESTRI E, RESTIVO FM, TASSI F. Sex determination and differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Plant Sci* 1991; **80**: 67–77.
- [3] BUZEK J, KOUTNIKOWA H, HOUBEN A, RIHA K, JANOUSEK B, SIROKY J, GRANT S, VYSKOT B. Isolation and characterization of X chromosome-derived DNA sequences from a dioecious plant *Melandrium album*. *Chrom Res* 1997; **5**: 57–65.
- [4] CHARLESWORTH B. The evolution of sex chromosomes. *Science* 1991; **251**: 1030–1033.
- [5] CIUPERESCU DD, VEUSKENS J, MOURAS A, YE D, BRIQUET M, NEGRUTIU I. Karyotyping *Melandrium album*, a dioecious plant with heteromorphic sex chromosomes. *Genome* 1990; **33**: 556–562.
- [6] DELLAPORTA SL, CALDERON-URREA A. Sex determination in flowering plants. *Plant Cell* 1993; **5**: 1241–1251.
- [7] DELLAPORTA SL, CALDERON-URREA A. The sex determination process in maize. *Science* 1994; **266**: 1501–1505.
- [8] DOLEZEL J, GOHDE W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 1995; **19**: 103–106.
- [9] DONNISON IS, SIROKY J, VYSKOT B, SAEDLER H, GRANT SR. Isolation of Y chromosome-specific sequences from *Silene latifolia* and mapping of male sex-determining genes using representational difference analysis. *Genetics* 1996; **144**: 1893–1901.

- [10] DURAND B, DURAND R. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. *Plant Sci* 1991; **80**: 49–65.
- [11] GREENBERG JT. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 12094–12097.
- [12] HORMAZA JI, DOLLO L, POLITO VS. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor Appl Genet* 1994; **89**: 9–13.
- [13] IRISH EE, NELSON T. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *Plant Cell* 1989; **1**: 737–744.
- [14] JANOUSEK B, SIROKY J, VYSKOT B. Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* 1996; **250**: 483–490.
- [15] LEBEL-HARDENACK S, GRANT SR. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 130–135.
- [16] MALEPSZY S, NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology. *Plant Sci* 1991; **80**: 39–47.
- [17] MULCAHY DL, WEEDEN NF, KESSELI R, CARROLL SB. DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Reprod* 1992; **5**: 86–88.
- [18] PARKER JS, CLARK MS. Dosage sex-chromosome system in plants. *Plant Sci* 1991; **80**: 79–92.
- [19] RUAS CF, FAIRBANKS DJ, EVANS RP, STUTZ HC, ANDERSEN WR, RUAS PM. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (*Chenopodiaceae*). *Am J Bot* 1998; **85**: 162–167.
- [20] SAKAMOTO K, SHIMOMURA K, KOMEDA Y, KAMADA H, SATOH S. A male-association DNA sequence in dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**: 1549–1554.
- [21] SIROKY J, JANOUSEK B, MOURAS A, VYSKOT B. Replication patterns of sex chromosomes in *Melandrium album* female cells. *Hereditas* 1994; **120**: 175–181.
- [22] VYSKOT B, ARAYA A, VEUSKENS J, NEGRUTIU I, MOURAS A. DNA methylation of sex chromosomes in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol Gen Genet* 1993; **239**: 219–224.
- [23] YE D, OLIVEIRA M, VEUSKENS J, WU Y, INSTALLE P, HINNISDAELS S, TRUONG AT, BROWN S, MOURAS A, NEGRUTIU I. Sex determination in the dioecious *Melandrium*. The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. *Plant Sci* 1991; **80**: 93–106.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 24.08.1998 r.

Przyjęto: 15.09.1998 r.

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





# p21<sup>WAF1/CIP1</sup>: ROLA W FIZJOLOGII KOMÓRKI I W ROZROSTACH NOWOTWOROWYCH

## p21<sup>WAF1/CIP1</sup>: ROLE IN CELL PHYSIOLOGY AND IN MALIGNANCIES

Dariusz WOŁOWIEC

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Akademii Medycznej  
we Wrocławiu

**Streszczenie:** p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest białkiem odgrywającym istotną rolę w regulacji cyklu komórkowego jako inhibitor aktywności podziałowej komórek. Hamuje ono aktywność większości kompleksów kinaz cyklinozależnych-cykliny, odgrywających kluczową rolę w przechodzeniu komórki przez poszczególne fazy cyklu mitotycznego, a ponadto działa hamująco na polimerazę DNA przez interakcje z jego podjednostką PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Transkrypcja genu p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest pobudzana przez p53 po zadziałaniu na komórkę czynnikami genotoksycznymi, tak więc białko to odpowiada za obserwowane po uszkodzeniu DNA zatrzymanie komórki w fazie G1. Ekspresja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zwiększa się też drogą niezależną od p53, głównie podczas różnicowania i dojrzewania komórek. Odgrywa ono też rolę w przeżyciu komórek i w apoptozie. *In vitro* p21<sup>WAF1/CIP1</sup> hamuje wzrost i klonogenność wielu linii komórek nowotworowych oraz ich zdolność do tworzenia guzów wszczepialnych. Jego ekspresja w guzach nowotworowych wykazuje często zaburzenia: jest ona obniżona lub zwiększona w stosunku do zdrowych tkanek, co może mieć niekiedy znaczenie rokownicze. Częstość zaburzeń ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w rozrostach złośliwych i duża zmienność jego ekspresji sugeruje konieczność dalszych badań nad jego rolą w patogenezie transformacji nowotworowych.

**Słowa kluczowe:** p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cykl komórkowy, inhibitor, nowotwór złośliwy

**Summary:** p21<sup>WAF1/CIP1</sup> plays an important role in the cell cycle regulation as an inhibitor of the proliferative activity of mammalian cells. It suppresses the activity of the most complexes of cyclin-dependent kinases with cyclins, their regulatory sub-units, known as crucial promoters of the cell cycle progression. Moreover, it blocks directly the DNA replication owing to its inhibitory interaction with the proliferating cell nuclear antigen, a sub-unit of DNA polymerase. The transcription of its gene is stimulated by p53 after DNA injury, so that p21<sup>WAF1/CIP1</sup> is responsible for G1 arrest brought about by genotoxic agents. Expression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> may be also enhanced on a p53-independent way, mainly during cell differentiation. Moreover, it is supposed to play a role in cell survival and apoptosis. *In vitro* p21<sup>WAF1/CIP1</sup> inhibits growth, clonogenicity and tumorigenicity of a number of malignant cell lines. Its

expression in human tumor cells is often altered (diminished or increased) comparatively to their normal counterparts and, in some instances, may have prognostic importance. The frequency of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> aberrations in malignancies, and a great variability of its expression in human tumors, point out to the necessity of carrying on investigations on its role in the mechanisms of malignant transformation.

*Key words:* p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, cell cycle, inhibitor, malignancy

## 1. WSTĘP

Centralną rolę w regulacji proliferacji komórkowej odgrywa rodzina kinaz serynowo-treoninowych zwanych kinazami cyklinozależnymi (*cyclin-dependent kinases*, CDK). Ich aktywacja na określonych etapach cyklu komórkowego warunkuje jego właściwy przebieg, a w szczególności jest niezbędna do replikacji DNA oraz mitozy. Do chwili obecnej zidentyfikowano u człowieka kilkanaście genów kodujących enzymy tej rodziny, z których najważniejsze i najlepiej poznane zostały określone jako CDK1-CDK9. Ich aktywność enzymatyczna wymaga przyłączenia podjednostki regulacyjnej, którą stanowi białko zwane cykliną (znanych jest obecnie kilkanaście cyklin, określonych kolejnymi literami alfabetu: A do H), a także zderminowana jest stanem ich fosforylacji i interakcjami z inną grupą białek, zwanych inhibitorami CDK [34,35,94,95].

Inhibitory CDK są to białka, których połączenie się z CDK lub z dimerem CDK-cyklina uniemożliwia nabycie przez nie aktywności enzymatycznej. Inhibitory CDK są więc białkami o właściwościach antyproliferacyjnych. Podzielić je można na dwie rodziny. Pierwsza z nich zawiera białka p16<sup>MTS1/INK4a/CDKN2A</sup>, p15<sup>MTS2/INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> oraz p19<sup>INK4b</sup>, łączące się wybiórczo z CDK4 i CDK6, które to CDK są kinazami białka pRb kodowanego przez gen podatności na retinoblastoma. Do drugiej zaś rodziny należą białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> i p57<sup>KIP2</sup>, będące inhibitorami większości znanych kompleksów CDK-cykliny [40].

Szczególną uwagę badaczy zarówno biologii komórki, jak i patologii procesów rozrostowych zwraca białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a to z uwagi na funkcje wewnątrzkomórkowe wykraczające poza hamowanie aktywności podziałowej oraz przypuszczalną rolę w transformacji nowotworowej.

## 2. WAF1/CIP1: GEN, JEGO PRODUKT I REGULACJA EKSPRESJI

Białko p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i kodujący je gen zostały opisane przez kilka zespołów badawczych, a na różne okoliczności jego odkrycia wskazują ich synonimiczne nazwy. Gen kodujący białko p21 zidentyfikowano jako jeden z efektorów czynnika



transkrypcji p53 w dzikiej, niezmutowanej postaci (*wild-type p53*, wt p53) (*wild-type p53-activated fragment*: WAF1; *p53-regulated inhibitor of CDKs*: PIC1) [21]. p21<sup>Waf1/Cip1</sup> zostało też znalezione w połączeniu z Cdk2 w fibroblastach mysich 3T3 (*cdk2-associated protein*: Cap 20) [36], jako białko mające zdolność interakcji z CDK i hamowania ich aktywności (*CDK-Interacting Protein 1*: CIP1) [39] i jako składnik czterocząsteczkowego kompleksu zawierającego ponadto CDK (CDK2 lub CDK4), cyklinę (A, B, D lub E) oraz antygen jądrowy komórek proliferujących (*proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) w fibroblastach ludzkich [97]. Opisano je też jako białko, którego ekspresja ulega stymulacji podczas starzenia się fibroblastów (*senescent cell-derived inhibitor 1*, SDI1) [67] oraz podczas inhibicji wzrostu i terminalnego dojrzewania komórek czerniaka (*melanoma differentiation associated gene-6*, MDA-6) [44]. Białko omawiane w niniejszej pracy jest określone, zgodnie z tendencją w bieżącym piśmiennictwie, jako p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Gen jego zlokalizowany jest w chromosomie 6p21.2 [12], w wyniku jego transkrypcji powstaje mRNA długości ok. 2,1 kb, wykrywalny w większości ludzkich tkanek [39]. Koduje on białko bogate w argininę zawierające 164 aminokwasy i mające teoretyczną masę cząsteczkową (m. cz.) 18,107 kDa, a migrujące w żelu poliakrylamidowym z szybkością odpowiadającą m. cz. 21 kDa. [39].

Regulacja ekspresji genu *WAF1/CIP1* dokonuje się zależnie i niezależnie od wt p53. p53 uważany jest za najważniejszy fizjologiczny stymulator tej ekspresji: akumulacja p53 w komórce po zadziałaniu czynnika szkodliwego, np. promieniowania jonizującego lub substancji uszkadzającej DNA, prowadzi do wzrostu ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i w następstwie do zablokowania komórki na pograniczu faz G1/S cyklu mitotycznego. Efektu tego nie obserwuje się w komórkach zawierających zmutowany gen p53 [15,18,21,62,65]. Za indukcję genu *WAF1/CIP1* pod wpływem p53 odpowiedzialna jest sekwencja w jego promotorze położona 2,4 kb w kierunku 5' od sekwencji kodującej [22]. Ekspresja genu *WAF1/CIP1* może być też pobudzona drogą niezależną od p53. Dzieje się tak przede wszystkim, choć nie tylko, podczas różnicowania komórek [11,38,54,62,71] i zależne jest od sekwencji promotorowych położonych poza regionem zaangażowanym w odpowiedź na p53. Pomimo że do stymulacji ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> po zadziałaniu na komórkę promieni jonizujących wymagane jest funkcjonalne białko p53, niezależne od p53 pobudzenie transkrypcji genu *WAF1/CIP1* obserwowano w niektórych przypadkach uszkodzenia genomu pod wpływem innych czynników: promieni ultrafioletowych i siarczanu metylometanu [100]. Indukcja genu *WAF1/CIP1* może też być wynikiem działania takich czynników transkrypcji, jak: Myo D [38], IRF1 [86], STAT1 [9] i E2F [41]. Innym mechanizmem regulacji ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest zwiększenie stabilności jego mRNA, co opisano pod wpływem działania pochodnej kwasu retinowego CD437 na komórki linii HBC [50], podczas różnicowania się komórek HL-60 w kierunku linii monocytowej [77] i w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego dwuetylmaleinianem [25]. Zidentyfikowano też mechanizm transkrypcyjnej represji genu

*WAF1/CIP1* poprzez element(y) obecny(e) na 3' końcu mRNA nie ulegającym translacji [74]; w tym też odcinku mRNA mieści się region odpowiedzialny za jego niestabilność [50]. Regulacja ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może też polegać na modyfikacji jego stabilności: czynnik transkrypcji p120<sup>E4F</sup>, działający represyjnie na promotor E4 adenowirusa w nieobecności onkoproteiny adenowirusowej E1A i przez to zatrzymujący komórki w fazie G1, zwiększa okres półtrwania p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z ok. 45 do ok. 165 min [26].

Ekspresja genu *WAF1/CIP1* w komórkach spoczynkowych jest, inaczej niż innego inhibitora CDK tej samej rodziny, tj. p27<sup>KIP1</sup>, najczęściej niska lub niekiedy nawet niewykrywalna. Podczas cyklu komórkowego fibroblastów ludzkich IMR90 zawartość jego mRNA zwiększa się bezpośrednio po ich rekrutacji do cyklu, obniża się w późnej fazie G1 oraz S, a następnie ponownie zwiększa się w fazie G2 [51]. Podobną stymulację ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> podczas rekrutacji do cyklu mitotycznego zaobserwowano w komórkach limfoidalnych T po zadziałaniu interleukiny 2 [68].

Otrzymanie przeciwciał specyficznie reagujących z p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i możliwych do zastosowania w parafinowych lub rezynowych preparatach histologicznych utrwalonych w formalinie pozwoliło na zbadanie ekspresji białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w różnych tkankach i narządach. Białko to, o lokalizacji jądrowej, wykazywało w błonie śluzowej przewodu pokarmowego wyraźną odwrotną zależność od aktywności podziałowej, tzn. występowało tylko w komórkach nie wykazujących ekspresji markera proliferacji Ki-67. Szczególnie było to widoczne w kryptach jelitowych, na których dnie, czyli w ich strefie podziałowej, występowały komórki Ki-67+/p21-, podczas gdy w górnej połowie, kontaktującej się ze światłem przewodu pokarmowego, komórki wykazywały ekspresję p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, a nie Ki-67 [23]. W innych tkankach zależność pomiędzy ekspresją p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a aktywnością podziałową była mniej wyraźna. W szczególności, w narządach takich, jak: serce, wątroba, śledziona, mózgowie, płuca i węzły chłonne, w których większość komórek znajduje się w fazie G0, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> było wykrywalne tylko w pojedynczych z nich [23,27].

### 3. ROLA p21<sup>WAF1/CIP1</sup> JAKO NEGATYWNEGO REGULATORA PROLIFERACJI KOMÓRKOWEJ

Do najważniejszych zadań p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, wynikających z jego właściwości antyproliferacyjnych, zalicza się blokowanie komórki pod koniec fazy G1 w odpowiedzi na uszkodzenie genomu pod wpływem czynników fizycznych lub chemicznych. Następuje wówczas wzrost zawartości w komórce „strażnika genomu”, białka p53, które z kolei jako czynnik transkrypcji pobudza ekspresję takich genów efektorowych, jak: *MDM2*, *GADD45* czy *WAF1/CIP1*. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest więc kluczowym skład-

nikami mechanizmu zabezpieczającego stabilność genomu, gdyż pobudzenie jego ekspresji jest niezbędnym warunkiem zależnego od p53 zablokowania aktywności podziałowej, także w komórkach nowotworowych [92]. Wykazano to na modelu doświadczalnym myszy z unieczynnionym genem *waf1/cip1*: nie stwierdzono u nich anomalii rozwojowych, lecz „punkt kontrolny” genomu pod koniec fazy G1 był w ich komórkach zniesiony [13].

Zahamowanie aktywności podziałowej komórki za pośrednictwem p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest wynikiem przede wszystkim jego hamującego wpływu na aktywność enzymatyczną CDK: p21<sup>WAF1/CIP1</sup> blokuje fosforylację histonu H1 i pRb przez kompleksy CDK4-cyklina D, CDK2-cyklina A, CDK2-cyklina E oraz CDK1-cyklina B [39,96]. Należy tu podkreślić, że p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, w odróżnieniu od inhibitorów CDK z rodziny p16<sup>CDKN2</sup> mających powinowactwo do monomerów CDK, działa hamująco na utworzone już kompleksy CDK-cykliny. Mechanizm tego działania, za które odpowiedzialny jest fragment N-końcowy cząsteczki p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [6,33,56], nie jest znany. Zaobserwowane ostatnio w fibroblastach zależne od p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zwiększenie zawartości nieufosforylowanej CDK2 związanej z cykliną A sugerowałoby hamowanie przez ten inhibitor aktywacyjnej fosforylacji CDK2 przez CAK (*cyclin-activating kinase*) [19]. Nie jest to jednak mechanizm uniwersalny, gdyż indukcja p21<sup>waf1/cip1</sup> w keratynocytach noworodka szczura z następowym blokiem komórek w fazach G1 i S pod wpływem promieni ultrafioletowych B nie spowodowała zaburzeń aktywacyjnej fosforylacji Cdk2 na treoninie 160 [72].

Drugim mechanizmem zahamowania progresji komórki w cyklu mitotycznym przez p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jest jego hamujące działanie na PCNA, za które odpowiedzialny jest fragment C-końcowy cząsteczki p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Delecja tego fragmentu zapobiega replikacji genomu wirusa SV40, ma jednak mały wpływ na wzrost populacji komórkowej [6,33,56]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> zaburzać ma jedynie zależną od PCNA syntezę replikacyjną, nie zaś reparacyjną DNA [49,90]. Rola p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w zależnym od PCNA hamowaniu replikacji DNA *in vivo* nie jest jednak jednoznacznie ustalona, gdyż interakcja między p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a PCNA wydaje się mieć miejsce wyłącznie w fazie G1 i G2, nie zaś w fazie S [61,76], a indukcja ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> komórek linii UTA21.15 (komórki mięsaka kostnego transfekowane plazmidem zawierającym *WAF1/CIP1*) blokuje inicjację fazy S, lecz nie zaburza przebiegu zapoczątkowanej już replikacji DNA [61].

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wywiera ponadto hamujący wpływ na promotory genów zależnych od czynnika transkrypcji E2F, są to geny kodujące takie białka niezbędne do realizacji cyklu mitotycznego, jak: DHFR i CDK1. Powoduje ono rozbitcie kompleksu zawierającego E2F, CDK2 i p107, modyfikując przez to jego powinowactwo do DNA i zdolność do transaktywacji genów uczestniczących w replikacji DNA [16,81].

Ostatnio zwraca się uwagę na rolę p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w drugim „punkcie kontrolnym” cyklu mitotycznego: przejściu G2/M. Jak wspomniano, stymulacja fibroblastów do cyklu komórkowego powoduje dwuszczytowy wzrost mRNA *WAF1/CIP1*: na



początku fazy G1 i pod koniec G2 [51], co sugeruje rolę tego inhibitora CDK także pod koniec interfazy. Wykazano ostatnio, że w niestransformowanych fibroblastach ludzkich p21<sup>WAF1/CIP1</sup> pod koniec fazy G2 przemieszczane jest z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie jest wykrywalne tylko do początku mitozy. To przemieszczenie jest zbieżne w czasie z translokacją jądrową cykliny B1 (translokacja ta nie zachodzi w płodowych fibroblastach myszy nie zawierających genu *waf1/cip1*) i, prawdopodobnie w następstwie zahamowania kompleksów Cdk-cykliny, powoduje przejściowe zatrzymanie komórek w późnej fazie G2, tuż przed rozpoczęciem mitozy [19]. Ekspresja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach zawierających funkcjonalny pRb prowadzi do ich zablokowania w fazie G1, gdy zaś pRb jest nieobecny lub unieczynniony, dochodzi do inaktywacji CDK zależnej od cykliny A i do zatrzymania komórek pod koniec fazy G2, przy czym niektóre z nich wykazują replikację DNA bez towarzyszącego podziału komórkowego [66]. Obserwacje te wskazują na niedocenianą dotychczas i nie w pełni jeszcze wyjaśnioną rolę p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w regulacji drugiego „punktu kontrolnego” stabilności genomu, tzn. przejścia G2/M. Wydaje się jednak, że rola ta jest *in vivo* mniejsza niż w odniesieniu do przejścia G1/S i ogranicza się do szczególnych sytuacji, gdyż u myszy z unieczynnionym genem *waf1/cip1* nie stwierdzono zaburzeń kontroli przejścia G2/M [13].

#### 4. INNE ZADANIA p21<sup>WAF1/CIP1</sup> W FIZJOLOGII KOMÓRKI

Coraz więcej danych wskazuje, że rola p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w fizjologii komórki wykracza poza negatywną regulację cyklu podziałowego. Już w roku 1994 zauważono w trakcie badań nad kilkoma liniami komórkowymi, że p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wchodzi w skład zarówno aktywnych, jak i nieaktywnych kompleksów CDK-cykliny, przy czym kompleksy nieaktywne zawierają więcej niż jedną cząsteczkę p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [101]. Autorzy sugerują, opierając się na pomiarach aktywności kinazowej kompleksów CDK-cykliny po dodaniu różnej ilości p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, że białko to działa na tę aktywność bądź pobudzająco (mała zawartość p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w kompleksie), bądź hamująco (większa zawartość) [101]. Koncepcja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jako czynnika niezbędnego do aktywacji CDK uzyskuje też poparcie w cytowanych już obserwacjach stymulacji jego ekspresji po zadziałaniu na komórki spoczynkowe (fibroblasty, limfocyty T) czynnikiem wzrostu [51,68]. Wreszcie, łączenie się p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z kompleksami CDK-cykliny może mieć znaczenie w zapewnieniu właściwej ich lokalizacji subkomórkowej.

Wspomniano już, że p21<sup>WAF1/CIP1</sup> przypuszczalnie odgrywa rolę w translokacji jądrowej cykliny B1. Stwierdzono też korelację pomiędzy łączeniem się

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> z kompleksami CDK4-cykлина D a gromadzeniem się ich w jądrach proliferujących hepatocytów wątroby po częściowej hepatektomii [43].

Dużą rolę odgrywa p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w procesie różnicowania komórek. Stwierdzono, że podczas terminalnego różnicowania się i dojrzewania komórek mięśniowych czynnik transkrypcji MyoD pobudza ekspresję *WAF1/CIP1* drogą niezależną od p53. Z kolei wymuszona ekspresja cykliny D1 hamuje aktywację przez MyoD transkrypcji genów specyficznych dla mięśni szkieletowych [38,82]. Wykazano na wielu modelach doświadczalnych, że podczas różnicowania się i dojrzewania komórek różnego pochodzenia (komórki krwiotwórcze, komórki pheochromocytoza, komórki czerniaka i in.) pod wpływem specyficznych bodźców chemicznych i biologicznych, jak np. TPA, DMSO, retinoidy, NGF (*nerve growth factor*), czynnik transkrypcji MyoD, interferon gamma, dochodzi do pobudzenia ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> i zahamowania aktywności różnych kompleksów CDK-cykliny [37,38,44,45,77,85,102]. Rola p21<sup>WAF1/CIP1</sup> polega tu głównie na indukcji właściwego procesowi różnicowania się i dojrzewania zahamowania proliferacji komórkowej, ale być może wykracza poza prostą inhibicję aktywności podziałowej. Dojrzwaniu mioblastów linii C2C12 do miotub towarzyszy bowiem znaczne zwiększenie się ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> nie obniżającej się po stymulacji dojrzałych miotub do podziałów [37]. Keratynocyty myszy z homozygotycznym brakiem genu *waf1/cip1* zachowują zdolność do bloku w fazie G1 po zadziałaniu jonów wapnia lub czynnika transformującego wzrost  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ale wykazują upośledzenie ekspresji markerów różnicowania [63]. Ponadto, transfekcja proliferujących mioblastów za pomocą *WAF1/CIP1* pobudza zdolność czynnika transkrypcji MyoD do transaktywacji genów uczestniczących w tym dojrzewaniu, prawdopodobnie w wyniku inhibicji kompleksów CDK-cykлина D1 hamujących aktywność MyoD [82]. Warto zwrócić też uwagę na zróżnicowaną rolę p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w zależności od kierunku różnicowania się komórek: pobudzenie komórek ostrej białaczki do różnicowania w kierunku szeregu monocytowego za pomocą estru forbolu TPA, interferonu  $\gamma$  lub (1,25)dihydroksywitaminy D3 zwiększa ekspresję p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, podczas gdy dimetylsulfotlenek (DMSO) i kwas all-trans retinowy, stymulując różnicowanie w kierunku szeregu granulocytowego, nie wywiera tego efektu [77,102]. Rola p21<sup>waf1/cip1</sup> w zjawiskach różnicowania i dojrzewania *in vivo* została udokumentowana w badaniach nad rozwojem zarodkowym myszy. Transkryptu *waf1/cip1* nie stwierdzono we wczesnych 7,5-dniowych zarodkach, pojawiał się on natomiast w miarę postępu embriogenezy w różnych tkankach zawierających postmitotyczne, zróżnicowane komórki. Przykładowo, mRNA był niewykrywalny w mózgu i rdzeniu kręgowym zarodków mysich, był natomiast obecny w znacznych ilościach w mózgu dorosłych zwierząt. Ekspresja *waf1/cip1* obecna była również u myszy nie zawierających genu p53, co potwierdza niezależność jego aktywacji od p53 w procesie różnicowania i dojrzewania [71].

Nie jest jasna rola p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w indukcji apoptozy. Indukcja jego genu była obserwowana w czasie apoptozy wywołanej przez p53 w następstwie działania czynników genotoksycznych [21,28]. W niektórych sytuacjach zwiększona ekspresja p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, np. w wyniku transfekcji komórek ludzkiego raka sutka, mięsaka kostnego lub komórek nerki oseska chomika (BHKZ1) odpowiednim nukleotydem, prowadziła nie tylko do zahamowania wzrostu, ale i do śmierci komórki [78, 79,83]. Udział p21<sup>waf1/cip1</sup> w indukcji apoptozy jest jednak kontrowersyjny, gdyż myszy nie mające jego genu nie wykazują zaburzeń apoptozy wewnątrzgrasicznej [13]. Ponadto infekcja komórek linii raka oskrzela, raka sutka i odpowiadających im komórek nienowotworowych wektorem adenowirusowym zawierającym cDNA *WAF1/CIP1* spowodowała zatrzymanie ich w fazie G1, lecz w odróżnieniu od wymuszonej ekspresji wt p53 nie wywołała apoptozy [47]. Nie wykazano również wpływu p21<sup>waf1/cip1</sup> na apoptozę w dojrzewających pod jego działaniem komórkach PC12 (feochromocytoma szczura) [24]. Co więcej, opisano szereg sytuacji wskazujących na to, że *WAF1/CIP1* może być traktowany jako „gen przeżycia”. Zahamowanie ekspresji *WAF1/CIP1* sekwencjami antysensowymi hamuje różnicowanie komórek neuroblastoma SH-SY5Y i prowadzi do apoptozy [73]; podobny też wpływ ma ona na przeżycie komórek raka sutka MCF-7 [31]. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> chroni również komórki raka jelita grubego i czerniaka złośliwego przed apoptozą odpowiednio wywołaną przez prostaglandynę A2 i zależną od p53. [30,32]. Anty-apoptotyczny efekt p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może być, przynajmniej w niektórych przypadkach, zależny od hamowania aktywności kompleksów CDK-cyklin, gdyż mutant p21<sup>WAF1/CIP1</sup> pozbawiony zdolności ich inhibicji nie chroni komórek raka jelita grubego przed tą formą śmierci [55]. Byłoby to też zgodne ze znaną, wykazaną w wielu układach doświadczalnych rolą kompleksów CDK-cykliny w aktywacji apoptozy.

Ten krótki przegląd funkcji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wskazuje na jego centralne, choć nie do końca poznane miejsce w regulacji podstawowych zjawisk składających się na pojęcie proliferacji komórkowej: aktywności podziałowej komórki, jej dojrzewania i śmierci. Wyjaśnia to zainteresowanie, jakie w ostatnich latach p21<sup>WAF1/CIP1</sup> budzi w kontekście badań nad rozrostami nowotworowymi.

## 5. ROLA p21<sup>WAF1/CIP1</sup> W ROZROSTACH NOWOTWOROWYCH

### 5.1. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> jako inhibitor proliferacji komórek nowotworowych

Liczne dane doświadczalne wskazują na ochronny wpływ p21<sup>WAF1/CIP1</sup> przed transformacją nowotworową. Możliwość taka wynika już z negatywnej roli tego



białka w regulacji aktywności podziałowej wynikającej z jego właściwości hamujących aktywność kompleksów CDK-cykliny. Liczne obserwacje wskazują, że p21<sup>WAF1/CIP1</sup> działa antyproliferacyjnie także na komórki nowotworowe: wymuszona ekspresja tego białka w wielu liniach nowotworowych powoduje nie tylko *in vitro* zahamowanie wzrostu i zablokowanie komórek w fazie G1, ale także obniżenie ich klonogenności i zdolności tworzenia wszczepialnych guzów [7,20,-48,53,98]. Ekspresja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w immortalizowanych fibroblastach powoduje nie tylko zahamowanie ich wzrostu, ale też i inhibicję aktywności telomerazy ulegającej hiperekspresji w wielu rozrostach nowotworowych [46]. Podjęto też próbę doświadczalnej terapii genowej raka prostaty myszy za pomocą infekcji adenowirusem zawierającym sekwencję kodującą waf1/cip1, uzyskując zmniejszenie masy guza oraz wydłużenie przeżycia badanych zwierząt [20].

Omówione wyżej antyonkogenne działanie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> wynika, przynajmniej częściowo, z jego hamującego wpływu na aktywność kompleksów CDK-cykliny. Świadczy o tym częściowe przywrócenie zablokowanej przez p21<sup>WAF1/CIP1</sup> aktywności proliferacyjnej komórek linii Saos-2 i H1299 przez kotransfekcję komórek za pomocą cDNA *WAF1/CIP1* oraz cykliny D1 lub cykliny E [53].

## 5.2. Zaburzenia ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w rozrostach nowotworowych

Zaburzenia regulacji ekspresji białek cyklu komórkowego, w szczególności cyklin, CDK i ich inhibitorów, są częstym zjawiskiem w rozrostach nowotworowych. W szczególności, w dużym odsetku nowotworów różnego pochodzenia zaburzenia te dotyczą inhibitorów CDK p16<sup>CDKN2/MTS1/INK4a</sup>, p15<sup>MTS2/INK4b</sup> lub p27<sup>KIP1</sup>, przy czym polegają one zawsze na ich niedoborze najczęściej w wyniku delecji homozygotycznej lub hipermetylacji genu (p16 i p15) bądź zaburzeń stabilności białka (p27) (np. [40, 84]). Deregulacja ekspresji dotyczy też p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, przy czym sytuacja jest tu bardziej złożona niż w przypadku innych inhibitorów i trudna do jednoznacznego wyjaśnienia.

Somatyczne mutacje punktowe genu *WAF1/CIP1* w nowotworach opisywane są bardzo rzadko [4, 52, 80], jednak obniżenie jego ekspresji na poziomie RNA i/lub białka bywa obserwowane w tkance patologicznej u części chorych na różne nowotwory. Matsushita i wsp. [60] stwierdzili niższą ekspresję genu *WAF1/CIP1* w tkance nowotworowej w stosunku do zdrowej u 16 chorych na raka jelita grubego, przy czym w guzach przerzutujących ekspresja ta była mniejsza niż u chorych bez przerzutów. Podobnie, mniejszą zawartość mRNA *WAF1/CIP1* w guzie niż w zdrowej tkance stwierdzono u 27 spośród 28 chorych na raka pęcherza moczowego [58], a niższą niż w prawidłowym endometrium ekspresję białka wykazano immunohistochemicznie u 48 pacjentek chorych na raka szyjki lub trzonu macicy [70].

Częściej opisuje się w nowotworach zwiększoną w stosunku do komórek zdrowych ekspresję *WAF1/CIP1* na poziomie mRNA i/lub białka i to nieraz w schorzeniach,

w których inni autorzy wykazali jej obniżenie. Oznaczając immunohistochemicznie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach nowotworowych 124 chorych na raka pęcherza moczowego Clasen i wsp. wykazali jego obecność w ok. połowie przypadków, głównie raka powierzchniowego, dobrze zróżnicowanego, rzadziej natomiast w rakach naciekających głębsze warstwy ściany pęcherza. Białko to natomiast było niewykrywalne w zdrowej błonie śluzowej. Ekspresja mRNA natomiast w części próbek była wyższa, w niektórych innych zaś niższa w porównaniu ze zdrową błoną śluzową [10]. Dwa zespoły badawcze wykazały zwiększenie zawartości białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach raka jelita grubego u 19 spośród 38 [17] i 21 spośród 40 chorych [93], głównie o niskim stopniu zaawansowania klinicznego. Zawartość p21<sup>WAF1/CIP1</sup> była zaś obniżona u 5 pacjentów, z których 4 wykazywało przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych [93]. Patologiczną ekspresję białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> stwierdzono też histochemicznie u znaczącej części chorych na raka sutka [2,5], żołądka [29,99], mięśniaki, a zwłaszcza mięsaki mięśni gładkich macicy [70], raka płaskonabłonkowego skóry [87], tarczycy [42], niedrobnokomórkowego raka oskrzela [59], chłoniaki złośliwe niezziarnicze [8,89] i chorobę Hodgkina, gdzie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> obserwowane było głównie w komórkach Reed-Sternberga [75].

Istnieją rozbieżności co do oceny zależności pomiędzy ekspresją p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a stopniem inwazyjności i stadium klinicznym nowotworu. Wspomniano już, że w raku jelita grubego wyższa zawartość p21<sup>WAF1/CIP1</sup> została stwierdzona u chorych we wczesnych stadiach zaawansowania choroby [17,93]. Podobnie, w raku pęcherza moczowego poziom mRNA był niższy w raku powierzchniowym w porównaniu z formami inwazyjnymi [58], a hiperekspresję tego białka stwierdzono najczęściej w raku powierzchniowym i dobrze zróżnicowanym [10]. U 22 spośród 34 pacjentów chorych na przerzutującego czerniaka zawartość p21<sup>WAF1/CIP1</sup> była niższa w przerzutach niż w ognisku pierwotnym, ale w czerniakach powierzchniowych ekspresja jego była tym wyższa, im zmiana była grubsza [57]. Badania grupy 343 chorych na gruczolakoraka żołądka wykazały z kolei większy odsetek pacjentów z wysoką zawartością p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w grupie z naciekiem błony podśluzowej lub w stadiach klinicznych 2, 3 i 4 (wg klasyfikacji japońskiej) niż w grupie raków ograniczonych do błony śluzowej lub w stadium 1, jak również w grupie chorych z rakiem przerzutującym w stosunku do pacjentów bez przerzutów [99]. W raku żołądka więc, inaczej niż w raku jelita grubego lub pęcherza moczowego, wysoka ekspresja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> byłaby związana z agresywnością choroby.

Nieznane są mechanizmy prowadzące do takich zmian zawartości p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach nowotworowych w stosunku do tkanek, z których się wywodzą. Jest mało prawdopodobne, żeby hiperekspresja białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> była wynikiem jego zwiększonej stabilności w wyniku mutacji genu, jak to się dzieje w przypadku p53, gdyż, jak wspomniano wcześniej, mutacje genu *WAF1/CIP1* są bardzo rzadkie. W kilku badaniach wykonanych na różnych komórkach złośliwych (czerniaka, raka jajnika i niedrobnokomórkowego raka oskrzela) wykazano ponadto korelację po-

między zawartością mRNA i białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, co sugeruje, że jego zaburzenia mają miejsce na poziomie regulacji transkrypcji [3,57,59]. Kieruje to uwagę na mutacje p53 upośledzające jego funkcje jako czynnika stymulującego transkrypcję m.in. genu *WAF1/CIP1*. Wyniki dotychczasowych badań nad zależnością między ekspresją p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a mutacjami p53 dały jednak rozbieżne wyniki. Niektóre doniesienia wykazały zmniejszenie transkryptu *WAF1/CIP1* w tkance raka sutka [69] i pęcherza moczowego [58] mającej zmutowany gen p53 w porównaniu chorymi z wt p53. Wykazano też ujemną korelację pomiędzy obecnością mutacji p53 (lub jego wykrywalnością histochemiczną) a ekspresją p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w raku sutka [5,91]. Podobną zależność wykazano też w chłoniakach niezłośliwych: badania wykonane na grupie 253 pacjentów wykazały, że gen p53 jest zmutowany tylko u tych spośród chorych wykazujących immunohistochemiczną ekspresję p53, u których nie stwierdza się równoczesnej ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [8]. Wykrywalność p21<sup>WAF1/CIP1</sup> dowodzi więc obecności wt p53 i pozwala zidentyfikować chorych, u których immunocytochemiczna ekspresja p53 jest wynikiem jego mutacji.

Większość opublikowanych badań na nowotworach różnego pochodzenia (rak trzustki [14], okrężnicy [60], niedrobnokomórkowy oskrzela [59], tarczycy [42], żołądka [29], przełyku [64], jajnika [3] i inne) nie wykazały współzależności pomiędzy ekspresją p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a stanem genu p53. Należy jednak pamiętać, że część tych badań opierała się na pośredniej ocenie stanu p53, tzn. wyłącznie histochemicznej wykrywalności jego produktu, co, jak obecnie wiadomo, nie zawsze pozwala wnioskować o obecności mutacji lub ich braku. Mimo tego jednak można przyjąć, że w części chorób nowotworowych pobudzenie transkrypcji *WAF1/CIP1* dokonuje się niezależnie od p53.

Innym mechanizmem wpływającym na ekspresję p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach złośliwych mogą być zaburzenia ich różnicowania i dojrzewania. Sugerują to obserwacje wykazujące związek zawartości białka p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach niedrobnokomórkowego raka oskrzela a stopniem ich zróżnicowania [59] oraz zwiększenie jego ekspresji w powierzchniowych, bardziej zróżnicowanych zawierających keratynę warstwach raka płaskonabłonkowego skóry [87].

Różnorodność zaburzeń ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> może więc być wypadkową wielorakich funkcji pełnionych przez to białko w fizjologii komórki i zakłóconych podczas transformacji nowotworowej: zahamowanie proliferacji, udział w różnicowaniu i dojrzewaniu oraz regulacja przeżycia komórki i jej programowanej śmierci. Tak więc jego niedobór może być wyrazem np. derepresji proliferacji komórkowej, nadmiar zaś może świadczyć o zahamowaniu apoptozy lub patologii dojrzewania.

Nie są też znane konsekwencje nieprawidłowej ekspresji p21<sup>WAF1/CIP1</sup> *in vivo*. Niektóre badania wykazały, w nowotworach macicy i raku skóry, szczególnie częste występowanie p21<sup>WAF1/CIP1</sup> w komórkach nie wykazujących ekspresji Ki-67 [70,87]. Inne doniesienia nie opisują jednak związku pomiędzy zawartością p21<sup>WAF1/CIP1</sup> a aktywnością podziałową komórek raka żołądka i jajnika [3,99] ani też aktywnością



kinazową CDK2 i CDK4 w liniach wywodzących się z raka wątroby [88]. Wreszcie, myszy z unieczynnionym genem *waf1/cip1* nie zapadają częściej na nowotwory niż myszy z funkcjonalnymi oboma jego allelami [13].

Pomimo zasygnalizowanych wyżej niejasności dotyczących roli  $p21^{WAF1/CIP1}$  w rozrostach złośliwych nie ulega wątpliwości, że zagadnienia te, choćby z uwagi na częstość zaburzeń ekspresji  $p21^{WAF1/CIP1}$  w chorobach nowotworowych zasługują na dalsze badania. Dla klinicysty interesujące są pojedyncze na razie doniesienia sugerujące ich znaczenie rokownicze. U chorych na raka żołądka odsetek pacjentów z 5-letnim przeżyciem okazał się istotnie wyższy w grupie wykazującej w tkance guza immunohistochemiczną ekspresję  $p21^{WAF1/CIP1}$  niż u pacjentów bez tego białka [29]. W przypadku raka sutka dane są rozbieżne. W badaniach grupy włoskiej na 91 pacjentkach, wysoka ekspresja  $p21^{WAF1/CIP1}$  była związana z krótszym okresem wolnym od wznowy [2]. Zdaniem tej samej grupy badaczy jednoczesowe histochemiczne określenie obecności  $p21^{WAF1/CIP1}$  i p53 pozwala na prognozowanie wyników leczenia adjuwantowego [1]. Wakasugi i wsp. natomiast oceniając  $p21^{WAF1/CIP1}$  w tkance guza 104 chorych na raka sutka leczonych operacyjnie wykazali dłuższy okres wolny od nawrotu u pacjentek z wysoką ekspresją tego białka [91]. Sprawa znaczenia rokowniczego  $p21^{WAF1/CIP1}$  wymaga więc dalszych badań na większych grupach chorych, z uwzględnieniem sposobu ich leczenia i ewentualnych interakcji z innymi czynnikami prognostycznymi. Uzyskane dotychczas wyniki pozwalają jednak przypuszczać, że określanie ekspresji omawianego białka będzie interesowało nie tylko badaczy fizjologii i patologii komórki, ale także w coraz szerszym zakresie lekarzy onkologów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BARBARESCHI M, CAFFO O. P21(WAF1) and p53 immunohistochemical expression in breast cancer may predict therapeutic response to adjuvant treatment. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2182–2183.
- [2] BARBARESCHI M, CAFFO O, DOGLIONI C, FINA P, MARCHETTI A, BUTTITTA F, LEEK R, MORELLI L, LEONARDI E, BEVILACQUA G, DALLA PALMA P, HARRIS AL. p21WAF1 immunohistochemical expression in breast carcinoma: correlations with clinicopathological data, oestrogen receptor status, MIB1 expression, p53 gene and protein alteration and relapse-free survival. *Br J Cancer* 1996; **74**: 208–215.
- [3] BARBOULE N, MAZARS P, BALDIN V, VIDAL S, JOZAN S, MARTEL P, VALETTE A. Expression of  $p21^{WAF1/Cip1}$  is heterogenous and unrelated to proliferation index in human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 1995; **63**: 611–615.
- [4] BHATIA K, FAN S, SPANGLER G, WEINTRAUB M, O'CONNOR PM, JUDGE JG, MAGRATH I. A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma. *Cancer Res* 1995; **55**: 1431–1435.

- [5] BUKHOLM IK, NESLAND JM, KARESEN R, JACOBSEN U, BORRESEN AL. Relationship between abnormal p53 protein and failure to express p21 protein in human breast carcinoma. *J Pathol* 1997; **181**: 140–145.
- [6] CHEN J, JACKSON PK, KIRSCHNER MW, DUTTA A. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 1995; **374**: 386–388.
- [7] CHEN YQ, CIPRIANO SC, ARENKIEL JM, MILLER FR. Tumor suppression by p21<sup>WAF1</sup>. *Cancer Res* 1995; **55**: 4536–4539.
- [8] CHILOSI M, DOGLIONI C, MAGALINI A, INGHIRAMI G, KRAMPERA M, NADALI G, RAHEL D, PEDRON S, BENEDETTI A, SCARDONI M, MACRI E, LESTANI M, MENESTRINA F, PIZZOLO G, SCARPA A. p21/Waf1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood* 1996; **10**: 4012–4020.
- [9] CHIN YE, KITAGAWA M, SU WCS, YOU ZH, IWAMOTO Y, FU XY. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 1996; **272**: 719–722.
- [10] CLASEN S, SCHULZ WA, GERHARZ CD, GRIMM MO, CHRISTOPH F, SCHMITZ-DRAEGER BJ. Frequent and heterogenous expression of cyclin-dependent kinase inhibitor WAF1/p21 protein and mRNA in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 1998; **77**: 515–521.
- [11] DATTO MB, LI Y, PANUS JF, HOWE DJ, XIONG Y, WANG XF. Transforming growth factor  $\beta$  induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 5545–5549.
- [12] DEMETRICK DJ, MATSUMOTO S, HANNON GJ, OKAMOTO K, XIONG Y, ZHANG H, BEACH DH. Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet* 1995; **69**: 190–192.
- [13] DENG C, ZHANG P, HARPER JW, ELLEDGE SJ, LEDER P. Mice lacking p21<sup>CIP1/WAF1</sup> undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995; **82**: 675–684.
- [14] Di GIUSEPPE JA, REDSTON MS, YEO CJ, KERN SE, HRUBAN RH. p53-independent expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995; **147**: 884–888.
- [15] Di LEONARDO A, LINKE SP, CLARKIN K, WAHL GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Develop* 1994; **8**: 2540–2551.
- [16] DIMRI GP, NAKANISHI M, DESPREZ PY, SMITH JR, CAMPISI J. Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 2987–2799.
- [17] DOGLIONI C, PELOSIO P, LAURINO L, MACRI E, MEGGIOLARO E, FAVRETTI F, BARBARESCHI M. p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. *J Pathol* 1996; **179**: 248–253.
- [18] DULIC V, KAUFMANN WK, WILSON SJ, TLSTY TD, LEES E, HARPER JW, ELLEDGE SJ, REED SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994; **76**: 1013–1023.
- [19] DULIC V, STEIN GH, FAR DF, REED SI. Nuclear accumulation of p21<sup>Cip1</sup> the onset of mitosis: a role at the G2/M phase transition. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 546–557.
- [20] EASTHAM JA, HALL SJ, SEGHALI, WANG J, TIMME TL, YANG G, CONNELL-CROWLEY L, ELLEDGE SJ, ZHANG WW, HARPER JW, THOMPSON TC. *In vivo* gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res* 1995; **55**: 5151–5155.
- [21] EI-DEIRY WS, HARPER JW, O'CONNOR P, VELCULESCU V, CANMAN, JACKMAN J, PIETENPOL JA, BURRELL M, HILL DE, WANG Y, WIMAN KG, MERCER WE,

- KASTAN MB, KOHN KW, ELLEDGE SJ, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. *WAF1/CIP1* is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; **54**: 1169–1174.
- [22] EI-DEIRY WS, TOKINO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; **75**: 817–825.
- [23] EI-DEIRY WS, TOKINO T, WALDMAN T, OLINER JD, VELCULESCU VE, BURRELL M, HILL DE, HEALY E, REES JL, HAMILTON SR, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Topological control of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; **55**: 2910–2919.
- [24] ERHARDT JA, PITTMAN RN. p21(WAF1) induces permanent growth arrest and enhances differentiation, but does not alter apoptosis in PC12 cells. *Oncogene* 1998; **16**: 443–452.
- [25] ESPOSITO F, CUCCOVILLO F, VANONI M, CIMINO F, ANDERSON CW, APPELLA E, RUSSO T. Redox-mediated regulation of p21<sup>waf1/cip1</sup> expression involves a post-transcriptional mechanism and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem* 1997; **245**: 730–737.
- [26] FERNANDES ER, ZHANG JY, ROONEY RJ. Adenovirus E1A-regulated transcription factor p120<sup>E4F</sup> inhibits cell growth and induces the stabilization of the cdk inhibitor p21<sup>WAF1</sup>. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 459–467.
- [27] FREDERSDORF S, MILNE AW, HALL PA, LU X. Characterisation of a panel of novel anti-p21<sup>Waf1/Cip1</sup> monoclonal antibodies and immunochemical analysis of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression in normal human tissues. *Am J Pathol* 1996; **148**: 825–835.
- [28] GANSAUGE S, GANSAUGE F, GAUSE H, POCH B, SCHOENBERG MH, BEGER HG. The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxygen radicals is associated with a p53 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> induction. *FEBS Lett* 1997; **404**: 6–10.
- [29] GOMYO Y, IKEDA M, OSAKI M, TATEBE S, TSUJITANI S, IKEGUCHI M., KAIBARA N, ITO H. Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1997; **79**: 2067–2072.
- [30] GOROSPE M, CIRELLI C, WANG XT, SETH P, CAPOGROSSI MC, HOLBROOK NJ. p21<sup>WAF1/Cip1</sup> protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* 1997; **14**: 929–936.
- [31] GOROSPE M, HOLBROOK NJ. Role of p21 in prostaglandin A2-mediated cellular arrest and death. *Cancer Res* 1996; **56**: 475–479.
- [32] GOROSPE M, WANG X, GUYTON KZ., HOLBROOK NJ. Protective role of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 6654–6660.
- [33] GOUBIN F, DUCOMMUN B. Identification of binding domains on the p21<sup>Cip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 1995; **10**:
- [34] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu. *Post Biochem* 1996; **42**: 99–107.
- [35] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego. *Post Biochem* 1993; **39**: 16–25.
- [36] GU Y, TURCK CW, MORGAN DO. Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 1993; **366**: 707–710.
- [37] GUO K, WANG J, ANDRES V, SMITH RC, WALSH K. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3823–3829.
- [38] HALEVY O, NOVITCH BG, SPICER DB, SKAPEK SX, RHEE J, HANNON GJ, BEACH D, LASSAR AB. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 1995; **267**: 1018–1021.
- [39] HARPER JW, ADAMI GR, WEIN, KEYOMARSI K, ELLEDGE SJ. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; **75**: 805–816.



- [40] HIRAMA T, KOEFFLER HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995; **86**: 841–854.
- [41] HIYAMA H, IAVARONE A, LABAER J, REEVES SA. Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering the cell cycle progression. *Oncogene* 1997; **14**: 2533–2542.
- [42] ITO Y, KOBAYASHI T, TAKEDA T, KOMOIKE Y, WAKASUGI E, TAMAKI Y, TSUJIMOTO M, MATSUURA N, MONDEN M. Expression of p21(WAF1/CIP1) protein in clinical thyroid tissues. *Br J Cancer* 1996; **74**: 1269–1274.
- [43] JAUMOT M, ESTANOL JM, CASANOVAS O, GRANA X, AGELL N, BACHS O. The cell cycle inhibitor p21(CIP) is phosphorylated by cyclin A-CDK2 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **241**: 434–438.
- [44] JIANG H, LIN J, SU ZZ, COLLART FR, HUBERMAN E, FISHER PB. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* 1994; **9**: 3397–3406.
- [45] JIANG H, LIN J, SU ZZ, HERLYN M, KERBEL RS, WEISSMAN BE, WELCH DR, FISHER PB. The melanoma differentiation-associated gene mda-6, which encodes the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, is differentially expressed during growth, differentiation and progression in human melanoma cells. *Oncogene* 1995; **10**: 1855–1864.
- [46] KALLASSY M, MARTEL N, DAMOUR O, YAMASAKI H, NAKAZAWA H. Growth arrest of immortalized human keratinocytes and suppression of telomerase activity by p21(WAF1) gene expression. *Mol Carcinogenesis* 1998; **21**: 26–36.
- [47] KATAYOSE D, WERSTO R, COWAN KH, SETH P. Effects of a recombinant adenovirus expressing WAF1/Cip1 on cell growth, cell cycle, and apoptosis. *Cell Growth Differentiat* 1995; **6**: 1207–1212.
- [48] KOKUNAI T, IZAWA I, TAMAKI N. Overexpression of p21(WAF1/CIP1) induces cell differentiation and growth inhibition in a human glioma cell line. *Int J Cancer* 1998; **75**: 643–648.
- [49] LI R, WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 1994; **371**: 534–537.
- [50] LI XL, RISHI AK, SHAO ZM, DAWSON MI, JONG L, SHROOT B, REICHERT U, ORDONEZ J, FONTANA JA. Posttranscriptional regulation of p21 WAF1/CIP1 expression in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 5055–5062.
- [51] LI Y., JENKINS CW, NICHOLS MA, XIONG Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994; **9**: 2261–2268.
- [52] LI Y.J., LAURENT-PUIG P, SALMON RJ, THOMAS G, HAMELIN R. Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene* 1995; **10**: 599–601.
- [53] LIN JY, REICHNER C, WU X, LEVINE AJ. Analysis of wild-type and mutant p21(WAF-1) gene activities. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 1786–1793.
- [54] LIU M, IAVARONE A, FREEDMAN LP. Transcriptional activation of the human p21 WAF1/CIP1 gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* 1996; **271**: 31723–31728.
- [55] LU YJ, YAMAGISHI N, YAGI T, TAKEBE H. Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 1998; **16**: 705–712.
- [56] LUO Y, HURWITZ J, MASSAGUE J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21<sup>Cip1</sup>. *Nature* 1995; **375**: 159–161.
- [57] MAELANDSMO GM, HOLM R, FODSTAD O, KERBEL RS, FLORENES VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma. Reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1813–1822.

- [58] MALKOWICZ SB, TOMASZEWSKI JE, LINNENBACH AJ, CANGIANO TA, MARUTA Y, MCGARVEY TW. Novel p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. *Oncogene* 1996; **13**: 1831–1837.
- [59] MARCHETTI A, PELLEGRINI S, BERTACCA G, CHELLA A, MERLO G, ANGELETTI CA, DALLA PALMA C, BEVILACQUA G. p21 mRNA and protein expression in non-small cell lung cancers: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. *Oncogene* 1996; **12**: 1319–1324.
- [60] MATSUSHITA K, KOBAYASHI S, KATO M, ITOH Y, OKUYAMA K, SAKIYAMA S, ISONO K. Reduced messenger RNA expression level of p21CIP1 in human colorectal carcinoma tissues and its association with p53 gene mutation. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1996; **69**: 259–264.
- [61] MEDEMA RH, KLOMPMAKER R, SMITS VAJ, RIJKSEN G. p21(waf1) can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene* 1998; **16**: 431–441.
- [62] MICHIELI P, CHEDID M, LIN D, PIERCE JH, MERCER WE, GIVOL D. Induction of WAF/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; **54**: 3391–3395.
- [63] MISSERO F, DI CUNTO F, KIYOKAWA H, KOFF A, DOTTO GP. The absence of p21<sup>CIP1/WAF1</sup> alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 1996; **10**: 3065–3075.
- [64] MOSKALUK CA, HEITMILLER R, ZAHURAK M, SCHWAB D, SIDRANSKY D, HAMMILTON SR. p53 and p21<sup>WAF1/CIP1/SDI1</sup> gene products in Barrett oesophagus and adenocarcinoma of the oesophagus and oesophagogastric junction. *Human Pathol* 1996; **27**: 1211–1220.
- [65] NAMBA H, HARA T, TUKAZAKI T, MIGITA K, ISHIKAWA N, ITO K, NAGATAKI S, YAMASHITA S. Radiation-induced G1 arrest is selectively mediated by the p53-WAF1/Cip1 pathway in human thyroid cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 2075–2080.
- [66] NICULESCU AB, CHEN X, SMEETS M, HENGST L, PRIVES C, REED SI. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 629–643.
- [67] NODA A, NING Y, VENABLE SF, PEREIRA-SMITH OM, SMITH JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exptl Cell Res* 1994; **211**: 90–98.
- [68] NOURSE J, FIRPO E, FLANAGAN WM, COATS S, POLYAK K, LEE M.H., MASSAGUE J, CRABTREE GR, ROBERTS JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 1994; **372**: 570–573.
- [69] OZELIK H, MOUSSES S, ANDRULIS IL. Low levels of expression of an inhibitor of cyclin-dependent kinases (CIP1/WAF1) in primary breast carcinomas with p53 mutations. *Clin Cancer Res* 1995; **1**: 907–912.
- [70] PALAZZO JP, MERCER WE, KOVATICH AJ, McHUGH M. Immunohistochemical localization of p21WAF1/CIP1 in normal, hyperplastic, and neoplastic uterine tissues. *Hum Pathol* 1997; **27**: 60–66.
- [71] PARKER SB, EICHELE G, ZHANG P, RAWLS A, SANDS AT, BRADLEY A, OLSON EN, HARPER JW, ELLEDGE SJ p53-independent expression of p21<sup>Cip1</sup> in muscle and other terminally differentiating cells. *Nature* 1995; **267**: 1024–1027.
- [72] PETROCELLI T, POON R, DRUCKER DJ, SLINGERLAND JM, ROSEN CF UVB radiation induces p21(Cip1/WAF1) and mediates G1 and S phase checkpoints. *Oncogene* 1996; **12**: 1387–1396.
- [73] POLUHA W, POLUHA D, CHANG B, CROSBIE NE, SCHONHOFF CM, KILPATRICK DL, HOSS AH The cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 is required for survival of differentiating neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 1335–1341.

- [74] RISHI AK, HSU CKA, LI XS, HUSSAIN A, GERALD TM, FONTANA JA. Transcriptional repression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> gene mediated by cis element present in the 3'-untranslated region. *Cancer Res* 1997; **57**: 5129-5136.
- [75] SANCHEZ-BEATO M, PIRIS MA, MARTINEZ-MONTERO JC, GARCIA JF, VILLUENDAS R, GARCIA FJ, ORRADRE JL, MARTINEZ P. MDM2 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, wild type p53-induced proteins, are regularly expressed by Sternberg-Reed cells in Hodgkin's disease. *J Pathol* 1996; **180**: 58-64.
- [76] SAVIO M, STIVALA LA, SCOVASSI AI, BIANCHI L, PROSPERI E. *Oncogene* 1996; **13**: 1591-1598.
- [77] SCHWALLER J, KOEFFLER HP, NIKLAUS G, LOETSCHER P, NAGEL S, FEY MF, TOBLER A. Posttranscriptional stabilization underlies p53-independent induction of p21<sup>WAF1/CIP1/SDI1</sup> in differentiating human leukemic cells. *J Clin Invest* 1995; **95**: 973-979. (806)
- [78] SEKIGUCHI T, HUNTER T. Induction of growth arrest and cell death by overexpression of the cyclin-Cdk inhibitor p21 in hamster BHKZ1 cells. *Oncogene* 1998; **16**: 369-380.
- [79] SHEIKH MS, ROCHEFORT H, GARCIA M. Overexpression of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> induces growth arrest, giant cell formation and apoptosis in human breast carcinoma cell lines. *Oncogene* 1995; **11**: 1899-1905.
- [80] SHIOHARA M, EL-DEIRY WS, WADA M, NAKAMAKI T, TAKEUCHI S, YANG R, CHEN DL, VOGELSTEIN B, KOEFFLER HP. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* 1994; **84**: 3781-3784.
- [81] SHIYANOV P, BAGCHI B, ADAMI G, KOKONTIS J, HAY N, ARROYO M, MOROZOV A, RAYCHAUDHURI P. p21 disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 737-744.
- [82] SKAPEK SX, RHEE J, SPICER DB, LASSAR AB. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 1995; **267**: 1022-1024.
- [83] SKOTZKO M, WU L, ANDERSON WF, GORDON EM, HALL FL. Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 5493-5498.
- [84] STEEG PS, ABRAMS JS. Cancer prognostics: past, present and p27. *Nature Med* 1997; **3**: 152-154.
- [85] STEINMAN RA, HOFFMAN B, IRO A, GUILLOUF C, LIEBERMANN DA, EL-HOUSEINI M.E. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994; **9**: 3389-3396.
- [86] TANAKA N, ISHIHARA M, LAMPHIER MS, NOZAWA H, MATSUYAMA T, MAK TW, AIZAWA S, TOKINO T, OREN M, TANIGUCHI T. Cooperation of the tumor suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 1996; **382**: 816-818.
- [87] TRON VA, TANG L, YONG WP, TROTTER MJ. Differentiation-associated overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21<sup>Waf-1</sup> in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1139-1146.
- [88] TSUJIT, MIYAZAKI M, FUSHIMI K, MIHARA K, INOUE Y, OHASHI R, OHTSUBO M, HAMAZAKI K, FURUSAKO S, NAMBA M. Cyclin E overexpression responsible for growth of human hepatic tumors with p21<sup>WAF1/CIP1/SDI1</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **242**: 317-321.
- [89] VILLUENDAS R, PEZZELLA F, GATTER K, ALGARA P, SANCHEZ-BEATO M, MARTINEZ P, MARTINEZ JC, MUNOZ K, GARCIA P, SANCHEZ L, KOCIALKOWSKY S, CAMPO E, ORRADRE JL, PIRIS MA. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and MDM2 expression in non-Hodgkin's lymphoma and their relationship to p53 status: a p53+, MDM2-, p21-immunophenotype associated with missense mutations. *J Pathol* 1997; **181**: 51-61.
- [90] WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interacting with PCNA. *Nature* 1994; **369**: 574-578.



- [91] WAKASUGI E, KOBAYASHI T, TAMAKI Y, ITO Y, MIYASHIRO I, KOMOIKE Y, TAKEDA T, SHIN E, TAKATSUKA Y, KIKAWA N, MONDEN T, MONDEN M. p21(Waf1/Cp1) and p53 protein expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1997; **107**: 684–691.
- [92] WALDMAN T, KINZLER KW, VOGELSTEIN B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995; **55**: 5187–5190.
- [93] WANG A, YOSHIMIN, INON, TANAKA T, MORIH. WAF-1 expression and p53 mutations in human colorectal cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; **123**: 118–123.
- [94] WOŁOWIEC D. Cykliny a patologia rozrostowa. *Acta Haematol Pol* 1994; **25**: 195–204.
- [95] WOŁOWIEC D. Kinazy zależne od cyklin. Od biologii molekularnej do patologii. *Post Hig Med Dośw* 1995; **49**: 221–235.
- [96] XIONG Y, HANNON GJ, ZHANG H, CASSO D, KOBAYASHI R, BEACH D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; **366**: 701–704.
- [97] XIONG Y, ZHANG H, BEACH D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication factor PCNA. *Cell* 1992; **71**: 505–514.
- [98] YANGZY, PERKINS ND, OHNO T, NABEL EG. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity *in vivo*. *Nature Med* 1995; **1**: 1052–1057.
- [99] YASUI W, AKAMA Y, KUNIYASU H, YOKOZAKI H, SEMBA S, SHIMAMOTO F, TAHARA E. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in non-neoplastic mucosa and neoplasia of the stomach: relationship with p53 status and proliferative activity. *J Pathol* 1996; **180**: 122–128.
- [100] ZHAN Q, EL-DEIRY W, BAE I, ALAMO I, KASTAN MB, VOGELSTEIN B, FORNACE AJ Jr. Similarity of the DNA-damage responsiveness and growth-suppressive properties of WAF1/CIP1 and GADD45. *Int J Oncol* 1995; **6**: 937–946.
- [101] ZHANG H, HANNON GJ, BEACH D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Develop* 1994; **8**: 1750–1758.
- [102] ZHANG W, GRASSO L, McCLAIN CD, GAMBEL AM, CHA Y, TRAVALI S, DEISSE-ROTH AB, MERCER WE. p53-independent induction of WAF1/CIP1 in human leukemia cells is correlated with growth arrest accompanying monocyte/macrophage differentiation. *Cancer Res* 1995; **55**: 668–674.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel.

Otrzymano: 12.08. 1998 r.

Przyjęto: 12.10.1998 r.

Adres autora: ul. Pasteura 4, 50-367 Wrocław

## POCHODZENIE KOMÓREK B CD5<sup>+</sup> DODATNICH

### ORIGIN OF CD5<sup>+</sup> B CELLS

Zofia Monika RUPNIEWSKA\*, Jacek ROLIŃSKI<sup>\*\*</sup>,  
Magdalena DMOSZYŃSKA<sup>\*\*\*</sup>

\*Katedra i Klinika Hematologii, <sup>\*\*</sup>Zakład Immunologii Klinicznej,  
<sup>\*\*\*</sup>Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej, Akademia Medyczna, Lublin

*Streszczenie:* Obecnie istnieją dwie odmienne hipotezy próbujące wyjaśnić pochodzenie komórek B CD5<sup>+</sup>. W wyniku wszechstronnych badań prowadzonych na myszach zaproponowano, że komórki B CD5<sup>+</sup> pochodzą z odrębnych komórek prekursorowych, znajdujących się w płodowej wątrobie lub sieci, ale nie występujących (lub występujących sporadycznie) w szpiku osobników dorosłych. Alternatywna hipoteza przyjmuje, że ekspresję CD5 można indukować na jakiegokolwiek „dziewiczej” komórce B przez odpowiednie krzyżowe wiązanie powierzchniowego receptora immunoglobulinowego (indukcja antygenem). W niniejszej pracy dokonano przeglądu piśmiennictwa odnoszącego się do obu hipotez.

*Słowa kluczowe:* komórki B CD5<sup>+</sup>, konwencjonalne komórki B, linia rozwojowa, fenotyp immunologiczny powierzchni, indukcja ekspresji CD5.

*Summary:* At present there are two hypotheses explaining the origin of CD5<sup>+</sup> B cells. From studies on mice it was found that CD5<sup>+</sup> B cells come from separate precursors. These precursors can be detected in the fetal liver and fetal omentum but they do not exist in adult bone marrow in detectable quantities. The alternative hypothesis claims that any „virgin” B cell may be induced to become CD5 positive by appropriate cross-linking of the surface Ig receptor. We have reviewed the literature concerning these hypotheses.

*Key words:* CD5<sup>+</sup> B cells, conventional B cells, developmental lineage, surface phenotype, induction of CD5 expression.

Czynność układu immunologicznego ssaków zasada się na trzech głównych populacjach limfocytów różniących się układami cząsteczek rozpoznających antygen (receptorów dla antygeny). Są to: komórki T, komórki B i naturalne komórki cytotoksyczne (*natural killer cells*). (Więcej danych czytelnik znajdzie w podręcznikach immunologii, np. poz. [27]). W obrębie każdej z tych populacji wyróżniono jeszcze

kilka subpopulacji. I tak np. z uwagi na budowę łańcuchów wchodzących w skład receptora dla antygeny komórki T, wyróżnia się limfocyty T o receptorach typu  $\alpha\beta$  i limfocyty T o receptorach typu  $\gamma\delta$ , zaś z uwagi na pełnione czynności wyróżniono: limfocyty T cytotoksyczno-supresorowe i limfocyty T o czynnościach pomocniczych. Limfocyty B można oczywiście podzielić w zależności od wytwarzanych przeciwciał, ale za tym podziałem nie idą żadne istotne różnice czynnościowe. Przed kilkunastu laty u myszy [20] i u człowieka [36] wyróżniono małą subpopulację komórek B, które charakteryzuje ekspresja cząsteczki CD5 (u myszy komórki B Ly-1<sup>+</sup>). Szczególny fenotyp immunologiczny komórek CD5<sup>+</sup>, zdolność do wytwarzania autoprzeciwciał, praktyczny brak prekursorów tych komórek w szpiku osobników dorosłych budzą ciekawość immunologów. Ciekawość tę podzielają hemato-onkolodzy i histopatolodzy m.in. dlatego, że nowotworowe komórki niektórych przewlekłych białaczek limfatycznych i chłoniaków wywodzących się z komórek strefy płaszcz grudek chłonnych (*mantle cell lymphoma*) noszą antygen CD5.

Obecnie istnieją dwie hipotezy próbujące wyjaśnić pochodzenie komórek B CD5<sup>+</sup>:

- Pierwsza z nich to hipoteza wierności wobec linii rozwojowej [15, 16, 22, 30,31], która zakłada, że ukierunkowane prekursorzy komórek B w tkankach płodowych, np. w płodowej wątrobie i sieci, ale nie w szpiku osobników dorosłych są predysponowane do ekspresji cząsteczki CD5.
- Alternatywna hipoteza [8, 17, 75] przyjmuje, że ekspresję CD5 można indukować na jakiegokolwiek „dziewiczej” komórce B przez odpowiednie krzyżowe wiązanie powierzchniowego receptora immunoglobulinowego (sIg) (indukcja antygenem).

Dotychczas jednak nie dostarczono wystarczających dowodów, które mogłyby potwierdzić lub zaprzeczyć którejsz z tych hipotez.

Kantor i Herzenberg [30], współautorzy pierwszej z omawianych hipotez, wyróżniają u myszy trzy linie rozwojowe komórki B, które pochodzą z trzech odmiennych komórek prekursorowych (*progenitors*). Linie te przedstawiono w tabeli 1.

Na populację komórek B-2 składa się szereg odmiennych subpopulacji, które tworzą jednak pojedynczą jednostkę. Natomiast komórki B-1a i B-1b, chociaż mają wiele cech wspólnych, takich np. jak: zdolność do samoodnowy i zdolność do regulacji własnego rozwoju przez sprzężenie zwrotne (*feedback regulation of development*), to jednak pochodzą z odrębnych komórek prekursorowych i reprezentują dwie odmienne linie. Odmienność linii komórek B-1a i B-1b odzwierciedla kontrolowana genetycznie zmienność w ich liczbie w różnych szczepach myszy. Tak np. w jamie otrzewnej i opłucnowej u myszy Balb/c znajduje się 20–25% komórek B-1b, zaś u myszy CBA jest ich 40–50% [66].

Komórki B-1 są stosunkowo łatwe do odróżnienia od komórek B-2 dzięki ich charakterystycznej lokalizacji i to zarówno w życiu płodowym, jak i u osobników



TABELA 1. Trzy linie komórek B u myszy [wg 30]

KOMÓRKI B-1a	(komórki B CD5 <sup>+</sup> lub Ly-1 <sup>+</sup> ) pochodzące z komórek prekursorowych występujących w płodowej sieci i wątrobie, ale nieobecnych w szpiku osobników dorosłych
KOMÓRKI B-1b	(populacja „siostrzana” niemal identyczna czynnościowo, ale CD5 <sup>-</sup> lub Ly-1 <sup>-</sup> ) pochodząca z prekursorów znajdujących się w płodowej sieci i wątrobie, a także w szpiku osobników dorosłych
„KONWENCJONALNE” KOMÓRKI B nazywane także KOMÓRKAMI B-2	ich prekursory nie występują w płodowej sieci, ale wykryto je w płodowej wątrobie i w szpiku osobników dorosłych

dorosłych. Komórki B-1 rozwijają się we wczesnym okresie ontogenezy. I tak w sieci 13-dniowego płodu myszy już się znajdują prekursorowe komórki sIg ujemne, odrębne dla linii komórek B-1a i B-1b. Natomiast w sieci nie wykryto prekursorów dla „konwencjonalnych” komórek B-2. U 13- i 14-dniowych płodów w wątrobie znajdują się prekursorowe komórki, również sIg ujemne, z których można odtworzyć zarówno dwie linie komórek B-1 (B-1a i B-1b), jak i linię komórek B-2. Wydaje się, że w płodowej wątrobie prekursory komórek B-1 i komórek B-2 są rozmieszczone w anatomicznie różnych miejscach. I tak prekursory komórek B-2 znajdują się we wnętrzu płodowej wątroby, zaś prekursory komórek B-1 są związane z jej torebką [30]. Komórki B-1 są łatwe do wykrycia w płodowej śledzionie [20], a także w małych ilościach występują w grasicy [51], natomiast nie wykryto ich w szpiku [19, 31, 32]. Sugeruje się, że u dorosłych myszy jama otrzewnowa jest źródłem prekursorów komórek B-1 (B-1a i B-1b) [49], komórki B-1 występują także w dużych ilościach w jamie opłucnowej [19, 39, 48]. Z populacji komórek B-1 pochodzi większość komórek plazmatycznych wydzielających IgA, zlokalizowanych w blaszce właściwej jelit i śledzionowe komórki wydzielające IgM [40]. Jednakże u dorosłych zwierząt tylko niewielkie ilości komórek B-1 znajdują się w śledzionie i praktycznie nie ma ich w węzłach chłonnych, kępkach Peyera i krwi obwodowej, gdzie znamienne przeważają komórki B-2. W szpiku dorosłych myszy znajdują się głównie prekursory „konwencjonalnych” komórek B-2 i w mniejszych ilościach – prekursory komórek B-1b. Natomiast liczba prekursorów komórek B-1a jest zbyt mała, aby możliwa była rekonstrukcja tej linii po przeszczepie komórek szpiku [30].

Marcos i wsp. [49] sugerują, że komórki B CD5<sup>+</sup> (B-1a) reprezentują najwcześniejszy okres limfopoezy w życiu zarodkowym ssaków. Przypuszczalnie komórki te pochodzą z limfo-hemopoetycznej komórki macierzystej (HSC – *haematopoietic*

*stem cell*) znajdującej się w tzw. regionie aortalno-gonadalno-śródnierzowym (*aorta-gonad-mesonephros region*). HSC wykazuje zdolność do regionalnej kolonizacji tkanek hemopoetycznych w podobny sposób jak u embrionów ptaków. Zresztą komórki  $CD5^+$  charakteryzuje szereg podobieństw czynnościowych do komórek B pochodzących z kaletki Fabrycjusza ptaków. Do cech tych m.in. należą: trwałość ekspansywnych klonów i zdolność do samoodnowy, a więc cechy „atawistyczne”.

Niezwykle interesujące są pewne powiązania, jakie występują między komórkami B  $CD5^+$  a komórkami T, których receptor składa się z łańcuchów  $\gamma$  i  $\delta$  (komórki  $T\gamma\delta$ ) [28]:

- Komórki  $T\gamma\delta$ , podobnie jak komórki B  $CD5^+$ , powstają stosunkowo wcześniej w rozwoju filogenetycznym (komórki  $T\gamma\delta$  wykryto już u ryb chrzęstnoszkieletowych) [61].
- Obie populacje powstają z wyjątkowo wczesnej rozwojowo płodowej komórki macierzystej (HSC) i jako pierwsze pojawiają się w ontogenezie myszy. Kantor i Herzenberg [30] sądzą, że komórki B-1a i komórki  $T\gamma\delta$  ( $V\gamma3$ ) reprezentują najbardziej pierwotną „warstwę” układu immunologicznego. Komórki  $TV\gamma3$  powstają tylko z płodowych HSC, zanim osiedlą się one w szpiku. Natomiast w szpiku płodowe HSC tracą zdolność tworzenia komórek  $TV\gamma3$ , podobnie jak HSC osobników dorosłych [26].
- Komórki B  $CD5^+$ , jak i komórki  $T\gamma\delta$  stanowią niewielki odsetek w ogólnej puli limfocytów u myszy i ludzi. Przebywają one w niezwykłych miejscach, gdzie stanowią dominującą populację. Warto odnotowania jest fakt, że prymitywne organizmy składają się głównie z powierzchni nabłonkowych z pierwotnym jelitem w jamie ciała. Komórki  $T\gamma\delta$  znajdują się właśnie w nabłonkach. W ontogenezie myszy pierwsza fala komórek  $T\gamma\delta$  zasiedla skórę. Komórki B  $CD5^+$  występują jako dominująca populacja w jamie otrzewnowej myszy. Natomiast w szpiku dorosłych myszy praktycznie nie występują ani prekursorzy komórek B  $CD5^+$  [19, 31, 32], ani komórek  $T\gamma\delta$  [35].
- Obie populacje mają zdolność do samoodnowy w tkankach obwodowych (w ciągu życia zwierzęcia ubytki w puli komórek B  $CD5^+$  i komórek  $T\gamma\delta$  nie są uzupełniane przez różnicowanie się komórek prekursorowych osiadłych w szpiku).
- Charakterystyczny jest brak lub bardzo ograniczona zmienność na złączach między rearanzowanymi segmentami genów kodujących receptor komórki B  $CD5^+$  i receptor komórki  $T\gamma\delta$ . (Przy tworzeniu receptorów immunoglobulinowych „konwencjonalnych” komórek B zmienność na złączach między V i D oraz między D i J powstaje dzięki doczepieniu nowych nukleotydów – sekwencji N. Podobnie doczepiane są sekwencje N przy rekombinacji genów dla receptora komórki T).
- Obie populacje mają zdolność do rozpoznawania autoantygenów. Niektóre z komórek  $T\gamma\delta$  potrafią specyficznie rozpoznawać idiotypy Ig znajdujących się na powierzchni komórek B  $CD5^+$  [76]. W chorobach autoimmunologicznych,

takich jak: zespół Sjögrena, toczeń rumieniowaty trzewny, limfocyty  $T\gamma\delta$  mogą pełnić funkcje komórek pomocniczych wobec limfocytów B ( $B\ CD5^+$  ?) w procesie tworzenia autoprzeciwciał [11, 60]. (Przegląd piśmiennictwa na temat komórek  $T\gamma\delta$  czytelnik znajdzie w pozycji [68]).

Oдноśnie związków komórek B-1 z innymi rodzajami komórek układu immunologicznego, Borello i Phipps [4] podają, że w pewnych warunkach komórki B-1 mogą nabywać zdolności żernych i upodabniać się do makrofagów. A zatem niektóre komórki B-1 łączyłyby pewne cechy limfocytów z ewolucyjnie znacznie starszym mechanizmem fagocytozy. W związku z powyższą publikacją Płytycz i Seljelid [55, 56] spekulują, że makrofagi prehistorycznych kręgowców były tymi komórkami, w których dokonała się prarearanżacja genów VDJ, co w dalszym przebiegu ewolucji umożliwiło powstanie receptorów dla antygeny i wykształcenie się m.in. komórek B-1 i  $T\gamma\delta$ .

Komórki B-1 charakteryzuje szczególny fenotyp immunologiczny pozwalający stosunkowo łatwo odróżnić je od komórek B-2 (patrz tab. 2). Istnieją także pewne różnice fenotypowe między komórkami B-1a i B-1b. Najbardziej charakterystycznym markerem komórek B-1a jest antygen CD5, który podobnie jak CD6 i typ I receptora makrofagów (Scav R I) należy do rodziny receptorów „zmiataczy” (*scavenger receptor*) bogatych w cysteinę [7]. CD5 początkowo był uważany za antygen charakteryzujący wyłącznie komórki T. W ontogenezie CD5 na komórkach T pojawia się później niż antygen CD7, dopiero po migracji płodowych komórek pro-T  $CD34^+CD7^+$  z wątroby lub szpiku w warstwę podtorebkową grasicy [70] na tzw. grasiczych komórkach pro-T w ich I etapie różnicowania. Ekspresja CD5 zwiększa się w miarę dojrzewania komórki T [62]. Na komórkach B-1 ekspresja CD5 jest wyraźnie słabsza niż na komórkach T [niepublikowane badania własne, poz. 43]. Fizjologiczna rola, jaką pełni cząsteczka CD5 na limfocytach B, nie jest w pełni wyjaśniona. Wydaje się, że CD5 na komórkach B-1 działa jako negatywny regulator funkcji immunoglobulinowego receptora komórki B [3]. Mianowicie związanie powierzchniowej IgM na komórkach B-1 indukuje apoptozę, natomiast związanie IgM na komórkach B-2 powoduje ich wejście w fazę S cyklu komórkowego. U myszy  $CD5^{-/-}$  komórki B-1 po związaniu powierzchniowej IgM stają się odporne na apoptozę i wchodzi w cykl komórkowy. Jeśli w komórkach B-1 typu dzikiego (*wild-type*) zostaną przerwane kontakty między CD5 a powierzchnią IgM, to odzyskują one zdolność do proliferacji po krzyżowym związaniu powierzchniowej IgM. CD5 może regulować sygnały pochodzące z IgM, ponieważ pozostaje w związku z cytoplazmatyczną fosfatazą tyrozynową SHP-1 (wewnątrzkomórkowy enzym regulujący drogę przemian fosfolipazy C $\gamma$ ) [cyt. wg 3]. U myszy z niedoborem fosfatazy tyrozynowej SHP-1 występuje proliferacja komórek B  $CD5^+$  [cyt. wg 38].

Innym markerem otrzewnowych i opłucnowych komórek B-1 jest cząsteczka CD11b, która jednak nie występuje na śledzionowych komórkach B-1, a także



TABELA 2. Wybrane markery komórek B-1 i B-2 u myszy [modyfikacja wg 5, 30]

Markery powierzchni	Komórki B-1	„Konwencjonalne” komórki B-2
s Ig M*	(+ + +)	(+)
s Ig D	(+ / -), ale także (+ +)	zwykle (+ + +), rzadziej (+ +)
CD 5 (Ly-1, Tp 67)	komórki B-1a (+); komórki B-1b (-)	w zasadzie (-), ale ekspresja CD5 może zostać wzbudzona <i>in vitro</i>
Integryna CD 11b (receptor typu 3 dopełniacza - CR 3) w śledzionie (-)	w jamach ciała (+), w śledzionie (-)	(-)
CD 23 (antygen aktywacji, (-)		(+) komórki B-2 sIgD <sup>+++</sup>
Fcε RII)		
CD 44 (receptor dla hialuronianu)	(+ +)	w zasadzie (-), ale ekspresja CD44 może zostać wzbudzona <i>in vitro</i>
CD 45 RA (B 220)	(+ +)	(+ + +)
CD 72 (ligand CD5)	(+) na komórkach B-1a i B-1b	(+ +)
CDw 125 (receptor IL-5)** (+)		(-), ale ekspresja R-IL5 może zostać wzbudzona <i>in vitro</i>

\*sIg – powierzchniowa immunoglobulina, \*\*IL-5 – interleukina-5

nie ma jej na komórkach B-2 [30]. CD11b stanowi łańcuch  $\alpha$  integryny leukocytów i może pozostawać w niekowalentnym związku z łańcuchem  $\beta$  integryny (CD18) jako heterodimer CD11b/CD18. Inne nazwy CD11b to: MAC-1, OKM 1, receptor typu 3 dopełniacza (CR3). Istnieje kilka ligandów CD11b, są to: C3bi, składniki macierzy pozakomórkowej (np. fibronektyna), X czynnik krzepnięcia. Ligandy mogą znajdować się także na komórkach śródbłonnków (np. adresyna CD54, inna nazwa ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule-1*) [7]. U ludzi ekspresja CD11b charakteryzuje przede wszystkim monocyty-makrofagi i granulocyty, na których to komórkach odgrywa kluczową rolę w procesach adherencji do śródbłonnków, pozanaczyniowej migracji, homotypowej agregacji neutrofilii, chemotaksji i fagocytozie [44].

CD23 u myszy występuje na komórkach B-2 z jamy otrzewnowej i na śledzionowych komórkach B-2, które cechuje silna ekspresja sIgD. Natomiast nie ma go na komórkach B-2 ze strefy brzeżnej śledziony noszących skąpą warstwę sIgD i na wszystkich komórkach B-1 [30]. CD23 jest nazywany receptorem o niskim powinowactwie wobec IgE (Fcε R II), markerem komórek B transformowanych wirusem Epsteina-Barr lub antygenem aktywacji komórek B, ponieważ komórki B pozostające w stanie spoczynku nabywają CD23 po aktywacji, zwłaszcza przy współdziałaniu IL-4. Cząsteczka CD23 pełni wiele czynności, takich jak: regulacja syntezy IgE, skupianie antygenów IgE-zależnych, cytotoksyczność zależna od IgE, aktywność promująca wzrost komórki B, zapobieganie apoptozie komórki B w ośrodkach rozrodczych, wpływ na różnicowanie tymocytów i proliferację prekur-

sorów komórek mieloidalnych. U ludzi CD23 wybiórczo występuje na komórkach B sIgM<sup>+</sup>sIgD<sup>+</sup> i jest gubiony podczas ich różnicowania do komórek sekrecyjnych. W przeciwieństwie do myszy, u ludzi ekspresja CD23 charakteryzuje zwłaszcza komórki B CD5<sup>+</sup> strefy płaszczka grudki chłonnej (*mantle cells*). Rozpuszczalna postać CD23 wykazuje aktywność czynnika wzrostu [63].

Ekspresja CD 44 charakteryzuje komórki B-1 myszy, chociaż marker ten przez stymulację może zostać wzbudzony także na komórkach B-2 [5]. Inne nazwy CD44, które określają jego właściwości to: fagocytarna glikoproteina-1 (Pgp-1), receptor typu III dla macierzy pozakomórkowej. CD44 jest receptorem dla kwasu hialuronowego. Odgrywa on rolę w wiązaniu limfocytów z komórkami wysokiego śródbłonka żyłek węzłów chłonnych i kępek Peyera, co ułatwia zasiedlanie się limfocytów. Wskutek zróżnicowanego scalania (*splicing*) mRNA, CD44 występuje w kilku izoformach. Niektóre z nich odgrywają rolę w limfopoezie, wpływając na przyczepność prekursorowych komórek B do elementów zrębowych tkanek. Izofорма CD44 M (od *metastasis*) bierze udział w powstawaniu przerzutów nowotworowych [7, 37].

Inna nazwa CD45 to LCA (*leucocyte-common antigen*). Wewnątrzkomórkowa domena CD45 jest fosfatazą tyrozynową. Enzym ten powoduje defosforylację kinaz komórkowych i aktywację komórki. Część CD45 jest konieczna dla transdukcji sygnału pochodzącego z receptora dla antygeny znajdującego się na powierzchni komórki (kompleksy receptora komórki B lub T). Zmiany w zewnątrzkomórkowej domenie CD45 nie wpływają na aktywność fosfatazy tyrozynowej domeny cytoplazmatycznej. CD 45 występuje w pięciu izoformach, jedną z nich jest CD45 RA (inna nazwa *220 kD isoform of LCA*) – marker komórek B (u myszy komórek B-1), a także tzw. „naiwnych” pomocniczych komórek T (komórki T CD4<sup>+</sup>), które jeszcze nie zetknęły się z antygenem oraz monocytów [37].

Należy jeszcze wspomnieć o cząsteczce CD72, która jak się wydaje, jest ligandem dla CD5 [45, 73]. CD72 występuje zarówno na komórkach B CD5<sup>+</sup> (komórki B-1a), jak i na komórkach B CD5<sup>-</sup> (komórki B-1b i B-2), co sugeruje istnienie różnic czynnościowych między tymi pozornie „siostrzanymi” populacjami B-1a i B-1b, chociażby dlatego, że komórki B-1a noszą zarówno receptor, jak i jego ligand.

Ponadto komórki B-1 z jamy otrzewnowej myszy noszą receptor dla IL-5 (CDw 125) [24, 74]. Jeszcze inną cechą charakteryzującą komórki B-1 (ale nie B-2) jest zdolność do sekrecji IL-10, po stymulacji lipopolisacharydami. Ta właściwość komórek B-1 może odgrywać istotną rolę w ich rozwoju [29, 53].

Niestety u ludzi cechy różniące komórki B-1 od B-2 nie są tak wyraźne jak u myszy, z wyjątkiem ekspresji CD5, którą jednak można także wywołać na komórkach B CD5<sup>-</sup> (patrz niżej).

W rozwoju komórek B-1 po narodzeniu i w dalszym życiu myszy, zdaniem Kantora i Herzenberg [30], zasadniczą rolę odgrywają dwa mechanizmy, są to: zdolność do samoodnowy i działanie sprzężenia zwrotnego.

Konwencjonalne komórki B-2 są uzupełniane w ciągu życia zwierzęcia dzięki różnicowaniu się *de novo* z pierwotnych prekursorów osiadłych w szpiku. Przeciwnie natomiast populacja komórek B-1, powstała w życiu płodowym, utrzymuje się przez całe późniejsze życie myszy, a ubytki w puli obwodowej są uzupełniane przez samoodnowę, tj. przez podziały całkowicie dojrzałych komórek B-1 [19, 21].

Drugi mechanizm regulujący rozwój komórek B-1 to sprzężenie zwrotne. Mechanizm ten hamuje różnicowanie się *de novo* komórek B-1 (zarówno komórek B-1a, jak i B-1b) z niedojrzałych prekursorów, ale nie wpływa na rozwój komórek B-2 [41, 42]. Rozwój komórek B-1 z nieodróżnicowanych prekursorów kończy się mniej więcej między 3 a 6 tygodniem życia, podczas gdy komórki B-2 kontynuują swój rozwój przez całe życie myszy. W zasadzie repertuar przeciwciał wytwarzanych przez komórki B-1 pozostaje niezmienny już od wczesnego okresu rozwoju zwierzęcia i w miarę starzenia się jest coraz bardziej ograniczony przez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Mechanizm ten z jednej strony zapobiega powiększaniu się ogólnej puli komórek B-1 przez nowe komórki, co jest korzystne, ponieważ komórki B-1 wytwarzają m.in. naturalne autoprzeciwciała skierowane przeciw własnym krążącym antygenom. Z drugiej jednak strony hamujące sprzężenie zwrotne sprzyja ekspansji populacji klonalnej. Niemal wszystkie myszy powyżej 15 miesięcy życia mają klonalną populację komórek B-1 w śledzionie lub otrzewnej, wykrywalną techniką Southerna w żelu agarozowym [69]. Ta klonalna populacja w niektórych szczepach myszy pojawia się już u 5-miesięcznych zwierząt, a nawet u noworodków np. w szczepie NZB [67], przy czym długo istniejący klon komórkowy łatwo ulega transformacji nowotworowej. W tabeli 3, cytowanej z pracy Kantora i Herzenberg [30], przedstawiono ontogenezę komórek B u myszy, wpływ sprzężenia zwrotnego na przebieg tego procesu i pojawienie się klonalnej populacji komórki B-1.

Jak to już powiedziano, komórki B-1 pojawiają się we wczesnym okresie ontogenezy, kiedy to zarówno zdolność do wykorzystania repertuaru genów regionu zmiennego V, jak i dodatek sekwencji N przy złączach V-D-J są ograniczone. W procesie rekombinacji genów Ig w komórkach B-1 są wykorzystywane prawie wyłącznie  $V_H11$  i  $V_H12$  [6, 14, 54]. Ponadto geny Ig komórek B-1 nie podlegają hipermutacji, co jeszcze bardziej ogranicza repertuar tych komórek [12]. Komórki B-1 wytwarzają przeciwciała głównie klasy IgM, chociaż uczestniczą także w wytwarzaniu IgG<sub>3</sub> i IgA [23, 64, 65]. Jak już powiedziano, większość komórek plazmatycznych, wytwarzających IgA w błonach śluzowych, pochodzi z komórek B-1 [40]. Przeciwciała IgM wytwarzane przez komórki B-1 charakteryzuje niskie powinowactwo wobec antygenów i wielospecyficzność. Niskie powinowactwo wobec antygenów dotyczy zarówno powszechnych antygenów bakteryjnych, jak i autoantygenów [18]. Wielospecyficzność oznacza, że określone przeciwciało jest zdolne do wiązania wielu różnych antygenów (w tym także autoantygenów). Przeciwciała te wiążą preferencyjnie antygeny niezależne od komórki T, zwłaszcza polisacharydy, co wskazuje, że komórki B-1 są jakąś formą prymitywnego układu immunologicznego



TABELA 3. Ontogeneza linii komórek B u myszy i rozwój klonalnej populacji komórek B-1 [wg 30]

Okres rozwoju zwierzęcia	Wiek	Komórki B-1	Komórki B-2
Życie płodowe	12–13 dni	Limfopoetyczne komórki macierzyste (HSC) znajdują się w płodowej wątrobie i w sieci	Limfopoetyczne HSC znajdują się w płodowej wątrobie, ale nie w sieci
	>16 dni	Komórki prekursorowe (w tym komórki pro-B) zapoczątkowują rozwój linii komórki B-1	
<b>URUCHOMIENIE SZCZEGÓLNYCH SIŁ KSZTAŁTUJĄCYCH POTENCJALNY SKŁAD KOMÓREK B-1</b>			
Życie po narodzeniu	0–4 tyg.	Komórki prekursorowe kontynuują rozwój linii samoodnawiających się komórek B-1; wielkość populacji zbliża się do rozmiarów spotykanych u osobników dorosłych	Populacja zaczyna się powiększać
Okres dorastania	4–8 tyg.	Hamujące sprzężenie zwrotne blokuje ponowny rozwój z komórek prekursorowych	Wielkość populacji zbliża się do rozmiarów populacji u osobników dorosłych; utrzymuje się różnicowanie <i>de novo</i> z prekursorów
<b>POTENCJALNY SKŁAD KOMÓREK B-1 ZOSTAJE UTRWALONY</b>			
Okres dojrzałości	8–20 tyg.	Występuje ekspansja lub eliminacja poszczególnych klonów	Populacja osiąga maksymalną wielkość (12–14 tyg.); nadal utrzymuje się różnicowanie <i>de novo</i> z komórek prekursorowych
<b>SKŁAD KOMÓREK B-1 ZOSTAJE JESZCZE BARDZIEJ ZAWĘŻONY</b>			
Okres starości	>20 tyg.	Dochodzi do monoklonalnej hyperplazji i transformacji nowotworowej (PBL-B)	

pozbawionego tej elastyczności i zmienności, która charakteryzuje komórki B-2. Geny V, wykorzystywane przez komórki B-1, prawdopodobnie zostały wyselekcjonowane w przebiegu ewolucji z uwagi na ich zdolność do szybkiej odpowiedzi początkowej na patogeny bakteryjne [34].

Sprawą niezwykle interesującą jest różnicowanie się komórek B-1 do plazmocytów wytwarzających IgM u zwierząt hodowanych w jałowych warunkach i pozostających na chemicznie określonej diecie. Dotychczas stanowi zagadkę pochodzenie bodźca stymulującego końcowe różnicowanie się komórek B-1 [46].

Z kolei należałoby omówić alternatywną do hipotezy Kantora i Herzenberg teorię zakładającą, że ekspresję cząsteczki CD5 można indukować na jakiegokolwiek dziewiczej komórce B [8, 17, 75]. Tak np. Cong i wsp. [8] wykazali, że cząsteczka CD5, jak również inne markery powierzchni komórki B-1a mogą *in vitro* zostać wzbudzone na komórkach B-2 po stymulacji przeciwciałem anti- $\mu$  i IL-6. Także estry forbolu [10, 50] lub stymulacja szczepem Covan I gronkowca złocistego [2, 33, 52, 71] wywołują ekspresję cząsteczki CD5 na komórkach B CD5<sup>-</sup>. Z drugiej strony ekspresja CD 5 na prawidłowych komórkach B CD5<sup>+</sup> może zostać obniżona przez działanie IL-4 [9]. Allison i wsp. [1] stymulując śledzionowe „konwencjonalne” komórki B-2 przeciwciałem anti-Ig-dekstran uzyskiwali ekspresję receptora dla IL-5, który charakteryzuje komórki B-1.

Bardzo ważnym testem przemawiającym za słusznością drugiej hipotezy byłoby wykrycie w szpiku osobników dorosłych komórek prekursorowych zapoczątkowujących rozwój linii komórek B CD5<sup>+</sup>. W przeciwieństwie do Kantora i Herzenberg [22, 30, 31], a także Hardy i Hayakawa [15, 16] zespół kierowany przez Wortisa [25] sugeruje, że w szpiku dorosłych myszy znajdują się prekursorowe komórki B zdolne do generowania komórek B CD5<sup>+</sup>. Autorzy ci rekonstruowali noworodki myszy szczepu C3H.SCID (*severe combined immunodeficiency*) szpikiem pochodzącym od dorosłych (6-miesięcznych) myszy C57BL/6 i po upływie 10 miesięcy w śledzionach rekonstruowanych zwierząt znajdowali komórki B CD5<sup>+</sup>. Jednakże wiek 10 miesięcy życia myszy jest właściwie okresem bliskim starości zwierzęcia, nie można więc wykluczyć, że ekspresja CD5 została wtórnie wzbudzona na komórkach CD5<sup>-</sup> dawcy wskutek stymulacji antygenowej w ciągu życia biorcy. Być może ekspresję CD5 ujawniają komórki B-1b dawcy, które występują w szpiku osobników dorosłych [30]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że u myszy istnieją dwie subpopulacje komórek B Ly-1<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>): otrzewnowa i występująca w grasicy, które nieco się różnią markerami powierzchni i czynnością. Than i wsp. [72] wykazali, że u letalnie napromienionej myszy C57BL/6 grasicze komórki B Ly-1<sup>+</sup> mogą być rekonstruowane przez przeszczepienie szpiku. Natomiast otrzewnowe komórki B Ly-1<sup>+</sup> mogą zostać zrekonstruowane dopiero po przeszczepieniu wątroby 14-dniowego płodu. Komórki płodowej wątroby mają zresztą także zdolność do rekonstrukcji grasiczych komórek B Ly-1<sup>+</sup>. Hardy i wsp. [13] podają, że prekursorowe komórki B w szpiku mają względnie wysoki poziom mRNA CD5, ale na ich powierzchni nie można wykryć ekspresji CD5. Pospisil i Mage [59] sugerują, że wszystkie komórki B, nawet komórki B-2 noszą na swojej powierzchni cząsteczki CD5, chociaż na tych ostatnich ekspresja CD 5 jest śladowa.

Cząsteczka CD 5 na komórce B sama może pełnić rolę ligandu dla szczególnego regionu zrębowego (FR – *frame region*) części zmiennej łańcucha ciężkiego (V<sub>H</sub>) powierzchniowych Ig [57, 58] (część zmienna każdego łańcucha składa się z 3 regionów hiperzmiennych, między którymi znajdują się 4 regiony FR). Taka niekonwencjonalna interakcja między cząsteczką CD5 a strukturami FR V<sub>H</sub> na tej

samej lub innej komórce B może powodować jej stymulację. Przedłużająca się stymulacja komórki B o szczególnej strukturze FR  $V_H$  może sprzyjać klonalnej ekspansji tej komórki i być jednym z istotnych mechanizmów w patogenezie przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej (PBL-B) [59].

Z przedstawionych badań wynika, że chociaż cząsteczka CD5 jest uważana za charakterystyczny marker komórek B-1, to jednak brak jej ekspresji nie wyklucza przynależności danej komórki B do linii B-1. Z drugiej strony MacLennan [46] sugeruje, że obecność cząsteczki CD5 na ludzkiej komórce B nie jest jednoznaczna z przynależnością tej komórki do linii B-1, jak to ustalono u myszy. Ponad połowa komórek B w strefie płaszczka grudek chłonnych migdałków u dzieci powyżej 5 roku życia charakteryzuje ekspresja cząsteczek CD5 i CD23. Nie jest jednak pewne, czy komórki te wchodzą w łańcuch rozwojowy „konwencjonalnych” komórek B-2, czy komórek B-1. Wydaje się więc, że dopiero w przyszłości będzie można ustalić pochodzenie komórek B  $CD5^+$ , a także pochodzenie komórek PBL-B.

## LITERATURA

- [1] ALLISON KC, STROBER W, HARRIMAN GR. Induction of IL-5 receptors on normal B cells by cross-linking surface Ig with anti-Ig-dextran. *J Immunol* 1991; **146**: 4197–4203.
- [2] BANDYOPADHYAY RS, TEUTSCH MR, WORTIS HH. Activation of B-cells by sIgM cross-linking induces accumulation of CD5 mRNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; **194**: 219–228.
- [3] BIKAH G, CAREY J, CIALLELLA JR, TARAKHOVSKY A, BONDADA S. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996; **274**: 1906–1909.
- [4] BORELLO AM, PHIPPS RP. The B/macrophage cell: an elusive link between  $CD5^+$  B lymphocytes and macrophages. *Immunol Today* 1996; **17**: 471–475.
- [5] BURROWS PD, KEARNEY JF, SCHROEDER HWJr, COOPER MD. Normal B lymphocyte differentiation. *Bailliere's Clin Haematol* 1993; **6**: 785–806.
- [6] CARMACK CE, SHINTON SA, HAYAKAWA K, HARDY RR. Rearrangement and selection of  $V_H11$  in the Ly-1 B cell lineage. *J Exp Med* 1990; **172**: 371–374.
- [7] CLARK EA, LAW C-L. Immune accessory molecules and signal transduction. [w] Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ [red.] Williams Hematology Fifth Edition. New York, St Louis, San Francisco: McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division 1995: 946–955.
- [8] CONG Y-Z, RABIN E, WORTIS HH. Treatment of murine  $CD5^-$  B cells with anti-Ig, but not LPS, induces surface CD5: two B-cell activation pathways. *Int Immunol* 1991; **3**: 467–476.
- [9] DEFRANCE T, VANBERVLIET B, DURAND I, BANCHEREAU J. Human interleukin 4 down-regulates the surface expression of CD5 on normal and leukemic B-cells. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 293–299.
- [10] FREEDMAN AS, FREEMAN G, WHITMAN J, SEGIL J, DALEY J, NADLER LM. Studies of *in vitro* activated  $CD5^+$  B cells. *Blood* 1989; **73**: 202–208.
- [11] GERLI R, AGEA E, MUSCAT C, BERTOTTO A, ERCOLANI R, BISTONI R, BINI P, SPINOZZI F, VENZA F. Functional characterization of  $\gamma\delta T$  cells bearing the  $\gamma\delta T$ -cell receptor in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1993; **11**: 295–299.



- [12] GU H, FÖRSTER I, RAJEWSKY K. Sequence homologies. N sequence insertion and J<sub>H</sub> gene utilization in V<sub>H</sub>DJ<sub>H</sub> joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly-1 B-CLL progenitor generation. *Embo J* 1990; **9**: 2133–2140.
- [13] HARDY RR, CARMACK CE, LI SY, HAYAKAWA K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5<sup>+</sup> B cells. *Immunol Rev* 1994; **137**: 91–118.
- [14] HARDY RR, CARMACK CE, SHINTON SA, RIBLET RJ, HAYAKAWA K. A single V<sub>H</sub> gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the V<sub>H</sub>11 family. *J Immunol* 1989; **142**: 3643–3651.
- [15] HARDY RR, HAYAKAWA K. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 11550–11554.
- [16] HARDY RR, HAYAKAWA K. Generation of Ly-1 B cells from developmentally distinct precursors: enrichment by stromal-cell culture or cell sorting. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 99–111.
- [17] HAUGHTON G, ARNOLD LW, WHITMORE AC, CLARKE SH. B-1 cells are made, not born. *Immunol Today* 1993; **14**: 84–87; discussion 87–91.
- [18] HAYAKAWA K, CARMACK CE, HYMAN R, HARDY RR. Natural autoantibodies to thymocytes: origin, V<sub>H</sub> genes, fine specificities and the role of Thy-1 glycoprotein. *J Exp Med* 1990; **172**: 869–878.
- [19] HAYAKAWA K, HARDY RR, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 1985; **161**: 1554–1568.
- [20] HAYAKAWA K, HARDY RR, PARKS DR, HERZENBERG LA. The „Ly-1 B” cell subpopulation in normal, immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983; **157**: 202–218.
- [21] HAYAKAWA K, HARDY RR, STALL AM, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol* 1986; **16**: 1313–1316.
- [22] HERZENBERG LA, KANTOR AB. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol Today* 1993; **14**: 79–83; discussion 88–90.
- [23] HERZENBERG LA, STALL AM, LALOR PA, SIDMAN C, MOORE WA, PARKS DR, HERZENBERG LA. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 1986; **93**: 81–102.
- [24] HITOSHI Y, YAMAGUCHI N, MITA S, SONODA E, TAKAKI S, TOMINAGA A, TAKATSU K. Distribution of IL-5 receptor-positive B cells. Expression of IL-5 receptor on Ly-1 (CD5)<sup>+</sup> B cells. *J Immunol* 1990; **144**: 4218–4225.
- [25] HUANG ChA, CASSIS H., IACOMINI J, IMANISHI-KARI T, WORTIS HH. Adult bone marrow contains precursors for CD5<sup>+</sup> B cells. *Eur J Immunol* 1996; **26**: 2537–2540.
- [26] IKUTA K, KINA T, MAC NEIL I, UCHIDA N, PEULT B, CHIEN YH, WEISSMAN IL. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell* 1990; **62**: 863–874.
- [27] JAKÓBISIAK M [red.] Immunologia. Warszawa: PWN 1996.
- [28] JANEWAY ChA Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992; **13**: 11–16.
- [29] KANTOR AB. The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells). *Immunol Today* 1992; **12**: 389–391.
- [30] KANTOR AB, HERZENBERG LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 501–538.
- [31] KANTOR AB, STALL AM, ADAMS S, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 3320–3324.
- [32] KANTOR AB, STALL AM, ADAMS S, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Adoptive transfer of murine B cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 168–169.

- [33] KAWAMURA M, WHEELER JC, NOTKINS AL, BICH-THUY LT. Modulation of the expression of CD5 antigen on the surface of human peripheral B lymphocytes. *Cell Immunol* 1994; **159**: 61–76.
- [34] KEARNEY JF, BARTELS J, HAMILTON AM, LEHUEN A, SOLVASON N, VAKIL M. Development and function of the early B cell repertoire. *Int Rev Immunol* 1992; **8**: 247–257.
- [35] KELLY KA, OBRIEN R, BORN W. Reconstitution of SCID mice with haemopoietic precursors: a detailed analysis of  $\gamma\delta$  T cell reconstitution. *Immunology* 1997; **91**: 65–72.
- [36] KIPPS TJ. The CD5 B cell. *Adv Immunol* 1989; **47**: 117–185.
- [37] KIPPS TJ. The cluster of differentiation (CD) antigens. [w] Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ [red.] Williams Hematology Fifth Edition. New York, St Louis, San Francisco: McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division 1995: 113–140.
- [38] KIPPS TJ. Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocyte: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther* 1997; **39** (Suppl. 1): S17–S27.
- [39] KROESE FGM, AMMERLAAN WAM, DEENAN GJ. Location and dynamics of B-cell lineages. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 44–58.
- [40] KROESE FGM, BUTCHER EC, STALL AM, LALOR PA, ADAMS S, HERZENBERG LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1988; **1**: 75–84.
- [41] LALOR PA, HERZENBERG LA, ADAMS S, STALL AM. Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 507–513.
- [42] LALOR PA, STALL AM, ADAMS S, HERZENBERG LA. Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 501–506.
- [43] LAVABRE-BERTRAND T, JANOSSY G, EXBRAYAT C, BOURQUARD P, DUPERRAY C, NAVARRO M. Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. II. CD5 over-expression and monitoring in B-CLL. *Leukemia* 1994; **8**: 1557–1563.
- [44] LUK J, SPRINGER TA. CD11b cluster report. [w] Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF, Todd RF [red.] Leukocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1995; **2**: 1588–1590.
- [45] LUO W, VAN DE VELDE H, VON HOEGEN I, PARNES JR, THIELEMANS K. Ly-1 (CD5), a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cell, is a natural ligand of the B cell surface protein Lyb-2 (CD72). *J Immunol* 1992; **148**: 1630–1634.
- [46] MAC LENNAN ICM. B-cell development. *Hematol Cell Therap* 1997; **39** (Suppl. 1): S54–S55.
- [47] MARCOS MAR, GUTIERREZ JC, HUETZ F, MARTINEZ C, DIETERLEN-LIEVRE F. Waves of B-lymphopoiesis in the establishment of the mouse B-cell compartment (Editorial). *Scand J Immunol* 1991; **34**: 129–135.
- [48] MARCOS MAR, HUETZ F, PEREIRA P, ANDREU JL, MARTINEZ AC, COUTINHO A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 2031–2035.
- [49] MARCOS MAR, MALENCHERE E, SUNDBLAD A, HUETZ F, GRANDIEN A, MARTINEZ C, COUTINHO A. Coelomic and bone marrow-derived B cells: developmental constraints vs. antigenic-specific selection. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 433–442.
- [50] MILLER RA, GRALOW J. The induction of Leu-1 antigen expression in human malignant and normal B cells by phorbol myristic acetate (PMA). *J Immunol* 1984; **133**: 3408–3414.
- [51] MIYAMA IM, KUMA S, INABA K, OGATA H, IWAI H, YASUMIZU R, MURAMATSU S, STEINMAN RM, IKEHARA S. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J Exp Med* 1988; **168**: 811–816.
- [52] MORIKAWA K, OSEKO F, MORIKAWA S. Induction of CD5 antigen on human CD5<sup>+</sup> B cells by stimulation with *Staphylococcus aureus* Cowan strain I. *Int Immunol* 1993; **5**: 809–816.

- [53] OGARRA A, CHANG R, GO N, HASTINGS R, HAUGHTON G, HOWARD M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 711–717.
- [54] PANCET P, HUETZ F, MARCOS MA, ANDRADEL. All V<sub>H</sub>11 genes expressed in peritoneal lymphocytes encode anti-bromelain-treated mouse red blood cell autoantibodies but other V<sub>H</sub> gene families contribute to this specificity. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1583–1589.
- [55] PŁYTYCZ B. Modelowanie DNA w jądrach limfocytów. *Post Biol Kom* 1997; **24** (Suppl. 9): 49–63.
- [56] PŁYTYCZ B, SELJELID R. B-1/macrophages as „living fossils” (letter). *Immunol Today* 1997; **18**: 505.
- [57] POSPISIL R, FITTS MG, MAGE RG. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 1996; **184**: 1279–1284.
- [58] POSPISIL R, MAGE RG. Rabbit appendix: a site of development and selection of the B cell repertoire. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; **229**: 59-70.
- [59] POSPISIL R, MAGE RG. CD5 and other superantigenes as „ticklers” of B-cell receptor. *Immunol Today* 1998; **19**: 106–108.
- [60] RAJAGOPALAN S, ZORDAN T, TSOKOS GC, DATTA S. Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: isolation of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T helper cell lines that express the  $\gamma\delta$  T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7020–7024.
- [61] RAST JA, ANDERSON MK, STRONG SJ, LUER C, LITMAN RT, LITMAN GW.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997; **6**: 1–11.
- [62] REITER Ch. Cluster report: CD5. [w] Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, von dem Borne AEGKr [red.] Leucocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1992: 331–332.
- [63] SARFATI M, ISHIHARA H, DELESPESE G. CD23 Workshop Panel report. [w] Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, Ritz J, Shaw S, Silverstein R, Springer T, Tedder TF, Todd RF [red.] Leucocyte Typing V. White Cell Differentiation Antigens. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press 1995; **1**: 530–533.
- [64] SIDMAN CL, SHULTZ LD, HARDY RR, HAYAKAWA K, HERZENBERG LA. Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1<sup>+</sup> B cells in viable monothean and normal mice. *Science* 1986; **232**: 1423–1425.
- [65] SOLVASAN N, LEHUEN A, KEARNEY JF. An embryonic source of Ly-1 but non conventional B cells. *Int Immunol* 1991; **3**: 543–550.
- [66] STALL AM, ADAMS S, HERZENBERG LA, KANTOR AB. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 33–43.
- [67] STALL AM, FARINAS MC, TARLINTON DM, LALOR PA, HERZENBERG LA, STROBER S, HERZENBERG LA. Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7312–7316.
- [68] SZCZEPANIK M, PŁYTYCZ B. Limfocyty o receptorach gamma/delta ( $\gamma\delta$ T). *Post Biol Kom* 1998; **25**: 155–170.
- [69] TARLINTON DM, STALL AM, HERZENBERG LA. Repetitive usage of immunoglobulin V<sub>H</sub> and D gene segments in CD5<sup>+</sup> Ly-1 B clones of (NZB x NZW)F1 mice. *Embo J* 1988; **7**: 3705–3710.
- [70] TERSTAPPEN LWMM, HUANG S, PICKER LJ. Flow cytometric assessment of human T-cell differentiation in thymus and bone marrow. *Blood* 1992; **79**: 663–677.
- [71] TEUTSCH M, HIGER M, WANG D, WORTIS HH. Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A and rapamycin. *Int Immunol* 1995; **7**: 381–392.
- [72] THAN S, INABA M, INABA K, FUKUBA Y, ADACHI Y, IKEHARA S. Origin of thymic and peritoneal Ly-1 B cells. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 1299–1303.



- [73] VAN DE VELDE H, VON HOEGEN I, LUO W, PARNES JR, THIELEMANS K. The T/B cell antigen, CD5, and the B-cell surface protein, CD72, form a pair of interacting receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **651**: 443–452.
- [74] WETZEL GD. Interleukin 5 regulation of peritoneal Ly-1 B lymphocyte proliferation, differentiation and autoantibody secretion. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 1701–1707.
- [75] WORTIS HH. Surface markers heavy chain sequences and B cell lineages. *Int Rev Immunol* 1992; **8**: 235–246.
- [76] WRIGHT A, LEE JE, LINK MP, SMITH SD, CARROLL W, LEVY R, CLAYBERGER C, KRENSKY AM. Cytotoxic T lymphocytes specific for self tumor immunoglobulin express T cell receptor chain. *J Exp Med* 1989; **169**: 1557–1564.

*Redaktor prowadzący – Szczepan Biliński*

*Otrzymano: 09.09.1998 r.*

*Przyjęto: 30.10.1998 r.*

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



## KOMÓRKI MACIERZyste WĄTROBY I TRZUSTKI U ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA. CZĘŚĆ I

### STEM CELLS IN LIVER AND PANCREAS OF ANIMALS AND HUMANS. PART I

Małgorzata Tatiana MARSZAŁEK

Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Wyniki ostatnich badań wskazują, że w wątrobie dorosłych zwierząt i człowieka znajdują się pierwotne, nieodróżnicowane komórki nabłonkowe, które przypominają komórki ujawnione w wątrobie zarodkowej i płodowej. Pierwotne komórki, zidentyfikowane w wątrobie dojrzałej, podobnie jak komórki wątroby płodowej, stanowią heterogenną populację. Na populację tę składają się wielopotencjalne komórki macierzyste i/lub komórki potomne, tj. bipotencjalne komórki rodzicielskie hepatocytów i cholangiocytów oraz komórki prekursorowe, tj. formy blastyczne komórek nabłonkowych. Wspólną cechą tych komórek jest owalny kształt dużego jądra komórkowego. Należy nadmienić, że termin: komórki macierzyste nie zawsze jest stosowany jednoznacznie w piśmiennictwie i często odnosi się do wszystkich komórek pierwotnych wątroby. Wyniki licznych prac sugerują, że komórki macierzyste wątroby są umiejscowione w strefie okołowrotnej zrazika, a ich liczba w miarę rozwoju organizmu maleje.

*Słowa kluczowe:* komórki macierzyste wątroby, rozwój wątroby, komórki owalne w wątrobie, komórki owalne w trzustce, rak.

*Summary:* Recent results indicate that the liver of adult animals and humans contains a primitive, a nondifferentiated epithelial cells that resembles the early embryonic liver cells. Primitive adult liver cells like embryonic liver cells are a heterogenous population. They consist of multipotential stem cells, and/or progeny cells, i.e. bipotential progenitor cells able to differentiate into hepatocytes and cholangiocytes, and precursors of epithelial cells, i.e. blast-form of cells. The term „stem cells” often has more than one meaning in the literature. It is used for description of less or more differentiated liver epithelial cells. Common feature of all these cells is an oval-shaped, large nucleus. Extensive evidence described in many publications indicates, that in adult liver, stem cells are located in periportal region of liver lobulus, and that the proportion of this cells gradually decreases during the development of animals.

*Key words:* liver stem cells, liver development, oval cells in liver, oval cells in pancreas, cancer.



## I. WPROWADZENIE

Wyniki licznych prac wskazują, że w zależności od charakteru i stopnia uszkodzenia komórek mięszu wątroby obserwuje się dwa różne typy regeneracji. Pierwszy, zwany proliferacją typową, polega na podziałach komórkowych zróżnicowanych hepatocytów i występuje po chirurgicznym usunięciu części narządu – zabiegu częściowej hepatektomii (PH, ang. *partial hepatectomy*), który u ludzi wykonywany jest ze wskazań medycznych, a u zwierząt doświadczalnych stanowi model badawczy hepatocytów, proliferujących w warunkach *in vivo*. W tym przypadku zabieg polega na usunięciu lewego – bocznego oraz środkowego płata wątroby, które stanowią około 2/3 masy narządu.

Drugi typ regeneracji przebiega z zaangażowaniem pierwotnych, niezróżnicowanych komórek nazywanych komórkami macierzystymi (ang. *stem cells*).

Pierwsze obserwacje komórek macierzystych poczyniono w trakcie badań prowadzonych nad hepatokarcynogenezą eksperymentalną. Wyniki analizy histologicznej sugerowały, że w wątrobie badanych zwierząt obecne są niezidentyfikowane komórki, których proliferację obserwowano na wczesnych etapach hepatokarcynogenezy. Choć obserwowane komórki określano różnymi terminami, np. komórki owalne (ze względu na kształt jądra komórkowego), to jednak zgodnie sugerowano, że wszystkie one uczestniczą w procesach naprawczych przebiegających w uszkodzonym narządzie jako populacja komórek „rezerwowych”. Wydawało się, że komórki te są aktywowane do podziałów jedynie w przypadku uszkodzenia hepatocytów czynnikami hamującymi lub opóźniającymi ich podziały komórkowe oraz że komórki te umożliwiają odbudowę wątroby, ponieważ wykazują zdolność do różnicowania zarówno w kierunku hepatocytów, jak i cholangiocytołów. Jednocześnie wyniki wielu prac wskazywały, że proliferujące komórki mają cechy komórek odnajdywanych w prawidłowej wątrobie zarodków zwierząt. Spostrzeżenia te pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że w wątrobie dorosłych zwierząt i człowieka istnieje populacja komórek, które są odpowiednikiem zarodkowych komórek macierzystych.

Obecnie przyjmuje się, że około 1–3% masy wątroby prawidłowej stanowią pierwotne komórki, również nazywane: komórkami owalnymi (ang. *oval cells*). Wydaje się, że termin ten obejmuje w różnym stopniu zróżnicowane pierwotne komórki pochodzenia nabłonkowego, których wspólną cechą jest duże jądro komórkowe o owalnym kształcie [5, 17, 40]. Wielu autorów sądzi, że w rozwijającej się wątrobie pozostaje niewielka liczba niezróżnicowanych komórek wątroby zarodkowej [12,13, 30]. Komórkami tymi mogą być wielopotencjalne komórki macierzyste (ang. *stem cells*) lub/i – morfologicznie bardzo podobne do nich komórki potomne – bipotencjalne komórki rodzicielskie (ang. *bipotential progenitor cells*), a także ukierunkowane formy przejściowe (ang. *transitional cells*) – blastyczne,

z których wywodzą się zróżnicowane komórki nabłonkowe wątroby. Należą do nich hepatocyty – komórki mięszone – parenchymalne, które stanowią około 60% masy narządu, i cholangiocyty (BDEs, ang. *bile duct epithelial cells*) – komórki wyściełające światło kanalików żółciowych, na które przypada około 3–5% masy wątroby. Na pozostałe 30–35% składają się nieparenchymalne komórki pochodzenia mezenchymalnego: komórki przestrzeni zatokowej – sinusoidalnej, tj. komórki śród-błonka, komórki Kupffera i komórki ziarnkowe, tzw. Pit oraz komórki przestrzeni okołozatokowej – perisinusoidalnej, tj. komórki gwiaździste – lipocyty, zwane również komórkami Ito [5,17, 40].

Od wielu lat próbuje się odpowiedzieć na następujące pytania: jaki jest charakter pokrewieństwa komórek owalnych z komórkami macierzystymi? Kolejne pytanie dotyczy wzajemnych relacji między komórkami owalnymi, których proliferację zaobserwowano podczas hepatokarcynogenezy a komórkami owalnymi obecnymi w prawidłowej wątrobie i w trzustce. W artykule zaprezentowano aktualne poglądy naukowe na problemy związane z wyżej postawionymi pytaniami, a także przedstawiono odpowiedzi formułowane na podstawie wyników najnowszych badań eksperymentalnych, opublikowanych w literaturze przedmiotu.

W pracy przyjęto nazewnictwo stosowane w hematologii doświadczalnej, zaproponowane przez Wiktora-Jędrzejczaka [70], i przez analogię komórki określane w piśmiennictwie anglojęzycznym terminem – *stem cells* – nazwano komórkami macierzystymi, świadomie rezygnując z terminu komórki pnia. Termin: komórki owalne zastosowano zgodnie z mianownictwem zaproponowanym przez Moskałewskiego [38] w pracy pt. *Wątroba i pęcherzyk żółciowy*.

## II. WYBRANE BIAŁKA MARKEROWE KOMÓREK WĄTROBY

Aby odnaleźć komórki macierzyste wątroby lub/i komórki prekursorowe dla hepatocytów i cholangiocytów, analizowano komórki pojawiające się we wczesnych fazach rozwoju organizmu, kiedy następują procesy morfogenezy i proliferacji. Analizę zmian w czasie rozwoju wątroby umożliwiły badania ekspresji i translacji białek, które pojawiają się w różnych komórkach należących do danego szlaku rozwojowego i w określonym momencie wzrostu organizmu, tzw. białek markerowych. Do białek markerowych komórek nabłonkowych wątroby, analizowanych w czasie rozwoju, należą między innymi:  $\alpha$ -fetoproteina (AFP) – typowy marker onkofetalny i albumina (ALB), która również cechuje komórki wątroby zarodkowej i płodowej, a także jest markerem zróżnicowanych hepatocytów. Do markerów podstawowych, tj. obecnych we wszystkich komórkach narządu, zalicza się przede wszystkim białka cytoszkieletu – cytokeratyny (CK), których ekspresja, w zależności

od: typu komórki, etapu jej rozwoju i stopnia zróżnicowania, jest wysoce specyficzna. Cytokeratyny są swoistymi markerami histiogenezy komórek [39]. Komórki wątroby, podobnie jak każdy typ komórki nabłonkowej, ujawniają parami ekspresję swoich własnych cytokeratyn, z których jedna należy do typu I (CK9-19, pI<6), a druga, o masie cząsteczkowej o 7 000–10 000 wyższej od masy cytokeratyny typu I – do typu II (CK1-8, pI>6). Hepatocyty i cholangiocyty cechuje obecność cytokeratyn specyficznych dla nabłonka jednowarstwowego, tj. CK18 o m. cz. 45 000/pI 5,7 i CK8 o m. cz. 52 000/pI 6,1. W hepatocytach szczura cytokeratyny oznaczone literami A i D są odpowiednikami CK8 i CK18 ludzkich komórek [20]. Większa ilość obu białek w cholangiocytach pozwala na odróżnienie ich od hepatocytów [67,53,32]. Cholangiocyty mają ponadto cytokeratyny specyficzne dla nabłonkowych komórek gruczołowych, tj. CK19 o m. cz. 40 000/pI 5,2 i CK7 o m. cz. 54 000/pI 6,0 [20, 39, 52]. Komórki nabłonkowe wątroby cechuje również CK14 o m. cz. 50 000/pI 5,3 [39].

Białkami markerowymi komórek wątroby są również enzymy. W przypadku hepatocytów są to np.: aminotransferaza tyrozyny (TAT), forma L (alfa) i P (pi – łożyskowa) transferazy glutationowej (GST), kinaza pirogronianowa (PK), alkaliczna fosfataza (AP), a w przypadku cholangiocytów: transpeptydaza gamma-glutamylowa (GGT) [30, 53, 58, 59, 60, 63].

W badaniach wykorzystuje się oprócz poznanych i zidentyfikowanych markerów również i takie, których nie scharakteryzowano w pełni, a znana jest wyłącznie ich specyficzność tkankowa/komórkowa, specyficzna ekspresja w komórce lub/i ich masa cząsteczkowa. Należą do nich między innymi antygeny powierzchniowe: BDS<sub>7</sub> – zidentyfikowany na cholangiocytach i HES<sub>6</sub> – charakteryzujący wyłącznie hepatocyty [31]. Do tej grupy markerów zalicza się również takie, które w wątrobie szczura są charakterystyczne zarówno dla cholangiocytów, jak i komórek owalnych, np. OV-6, OV-1, OC.1, OC.2, OC.3 [18, 27, 19].

Antygen oznaczony przez Dunsforda i wsp. [18] symbolem OV-6, ujawniony w komórkach owalnych, których proliferację indukowano za pomocą diety pozbawionej choliny, a zawierającej *N*-acetylo-2-aminofluoren (2-AAF), jest mieszaniną cytokeratyn: CK14 i CK19. Białka te są obecne wyłącznie w komórkach przewodów żółciowych wątroby płodowej i wątroby osobników dorosłych, a nieobecne w hepatocytach prawidłowych [8,18]. Drugi antygen – OV-1, ujawniony przez Dunsforda i wsp. [18], nie został bliżej scharakteryzowany. Wiadomo jedynie, że jest to białko o charakterze powierzchniowym, występujące również na komórkach kanalików żółciowych wątroby płodowej [18].

Z kolei, antygeny OC.1 OC.2 ujawniono w komórkach owalnych podczas proliferacji indukowanej za pomocą diety pozbawionej choliny i wzbogaconej w etioninę bądź za pomocą 2-AAF [27]. W przypadku antygeny OC.1 ujawniono jego lokalizację na terenie cytoplazmy komórkowej, a w przypadku antygeny OC.2 – oznaczono wyłącznie masę cząsteczkową, która wynosi 93 000 [27]. Antygen oznaczony sym-



bolem OC.3 cechuje m.in. komórki owalne proliferujące podczas hepatokarcynogenezy indukowanej zgodnie z procedurą Solta-Farbera oraz komórki przewodów żółciowych wątroby. Nie został on jednak bliżej scharakteryzowany [19].

Kolejny antygen, oznaczony symbolem BD1, ujawniany jest w komórkach w postaci sieci filamentów cytoplazmatycznych, ale nie wykazuje cech wspólnych z cytokeratynami [71]. Marker ten różnicuje komórki nabłonkowe przewodów żółciowych, gdyż około 60% tych komórek cechuje wysoki poziom ekspresji tego białka, pozostałą część cechuje niski poziom ekspresji bądź jej brak. Jednocześnie ujawniono, że antygen BD1 nieobecny jest w komórkach owalnych. Analiza immunochemiczna z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi BD1, ujawniła obecność trzech polipeptydów, których masę cząsteczkową oznaczono jako 220 000, 165 000 i 175 000. Pierwszy polipeptyd odpowiada prawdopodobnie białku BD1, dwa pozostałe peptydy są przypuszczalnie jego fragmentami, stanowiąc produkty degradacji proteolitycznej [71].

Z kolei cytoplazmatyczny antygen Hbd1 o m. cz. 46 000 ujawniono w komórkach przewodów żółciowych i hepatocytach [27]. Antygeny oznaczone symbolami H1 i H2 oraz Hep Par1 cechują hepatocyty [27, 69]. Antygen H1 to białko powierzchniowe o m. cz. 115 000, natomiast H2 to białko cytoplazmatyczne o m. cz. 50 000 [27]. W przypadku antygeny Hep Par1 wykazano jego lokalizację w obrębie cytoplazmy. Białko to ujawniono we frakcji mitochondrialnej hepatocytów wątroby człowieka [69].

### III. ORGANOGENEZA WĄTROBY W OKRESIE ZARODKOWYM

Uchyłek wątrobowy (*diverticulum hepaticum*) lub inaczej pączek wątrobowy powstaje z elementów endodermalnych, tj. z komórek nabłonka w ogonowym odcinku przedniego prajelita. Z brzusznej części odcinka ogonowego rozwijają się: wątroba, zewnętrzne drogi żółciowe i jedynie fragment głowy trzustki, a z grzbietowej części powstają trzon, ogon i reszta głowy trzustki. Uchyłek wątrobowy pojawia się u szczura około 10. dnia rozwoju prenatalnego a u człowieka około 18. dnia [7, 30, 26]. Pierwotne, niedojrzałe, endodermalne komórki uchyłka szybko proliferują i układają się tworząc pasma. Komórki pasm dzielą się na dwie części: większą – głowową zwaną czasami czaszkową (ang. *cranial*) i mniejszą – ogonową (ang. *caudal*). Komórki różnicujące się dogłowowo formują lity twór zwany zawiązkiem wątroby (*pars hepatica*), natomiast komórki różnicujące się doogonowo formują zawiązek zewnętrznych przewodów żółciowych (zwany również częścią pęcherzykową, *pars cystica*), tj. wspólnego przewodu żółciowego i pęcherzyka żółciowego. Komórki obydwu zawiązków rozrastają się w mezenchymie krezki brzusznej, która

jest częścią przegrody poprzecznej (ang. *septum transversum*), w miejscu zwanym zatoką wątrobową. Równocześnie w mezenchymie krezki pojawiają się komórki krwiotwórcze, migrujące z pierwotnych ognisk krwiotworzenia, które zlokalizowane są w ścianie pęcherzyka żółtkowego. Następnie rozwijają się naczynia włosowate - sinusoidy. Komórki pozostające w ścisłym kontakcie z żyłą wrotną przekształcają się w komórki nabłonka sześciennego i formują w wątrobie człowieka, w 7. tygodniu ciąży, początkowo jedno-, a potem dwuwarstwowy cylinder zwany *ductal plate*, którego odpowiednikiem w wątrobie szczura jest jednowarstwowa struktura, pojawiająca się w 17. dniu rozwoju, zwana *pearl-like structure* [51, 67]. W trakcie rozwoju organizmu z mezenchymy powstają: torebka wątroby, zrąb łącznotkankowy i komórki zatok wątroby [7, 17].

Rozwijający się zawiązek wątroby, zbudowany z pierwotnych, niezróżnicowanych komórek nazywany jest hepatoblastem (ang. *hepatoblast*) [53]. Należy zaznaczyć jednak, że termin ten w piśmiennictwie anglojęzycznym jest stosowany nieprecyzyjnie i często utożsamiany jest ze słowem hepatoblasty (ang. *hepatoblasts*), przez co rozumie się pierwotną formę hepatocytów i funkcjonuje z nim zamiennie. Zgodnie z przyjętym w pracy mianownictwem, zaproponowanym przez Wiktora-Jędrzejczaka [70] termin hepatoblasty powinien odnosić się do komórek prekursorowych hepatocytów, a więc „...morfologicznie wyróżnialnych, mających już pewne cechy komórek końcowych...”. Ze względu na wspomniane nieścisłości, niektórzy autorzy proponują, aby blastyczne formy hepatocytów (hepatoblasty) określać terminem „niedojrzałe hepatocyty” (ang. *immature hepatocytes*), a zawiązek wątroby hepatoblastem [53].

Wydaje się, że proces dwukierunkowego różnicowania komórek hepatoblastu rozpoczyna się około 12. dnia wzrostu embrionu szczura, u człowieka zaś między 3.–4. tygodniem ciąży [17, 23, 26, 30]. Między 13. a 16. dniem rozwoju embrionu szczura można zaobserwować pierwsze, pierwotne komórki parenchymalne, które tworzą kilkukomórkowe pasma, przypominające beleczki wątrobowe (ang. *hepatic cords*). Pasma te rozlokowane są pośród wysp komórek krwiotwórczych [60, 68]. W 17. dniu rozwoju szczura widoczne są małe pęcherzyki, będące pierwotną formą przewodów żółciowych. W tym czasie można też wyróżnić obszar wokół żyły wrotnej [30, 60]. Wyraźne zmiany w morfologii wątroby następują między 19. a 21. dniem rozwoju embrionu szczura, kiedy komórki powiększają się i wzrasta ich liczba [60, 68]. Wiele niedojrzałych przewodów żółciowych, w formie pęcherzyków, pozwala na odróżnienie strefy okołowrotnej (*periportal*), zwanej też strefą okołobramną, od strefy środkowej (*centrilobular*) zrazika [60]. W obrębie zawiązka wątroby, różnicujące się komórki szybko proliferują i ostatecznie formują: sznury pierwotnych komórek hepatocytarnych oraz sieć przewodników i przewodów żółciowych, które wykazują cechy niedojrzałości jeszcze w 10. dniu po urodzeniu szczura [67].

#### **IV. EKSPRESJA BIAŁEK MARKEROWYCH W KOMÓRKACH HEPATOBLASTU**

Przyjmuje się, że na bardzo wczesnym etapie rozwoju organizmu, tj. zanim rozpoczyna się proces organogenezy i morfogenezy wątroby, o wątrobowym kierunku rozwoju komórek przedniej części prajelita świadczy obecność w tych komórkach mRNA dla  $\alpha$ -fetoproteiny (mRNA AFP) [17, 53]. Stosując metodę hybrydyzacji *in situ* oraz technikę immunocytochemiczną, Shiojiri i wsp. [53] zbadali ekspresję tego markera w komórkach embrionu szczura. Choć mRNA AFP ujawniono już w komórkach pęcherzyka żółtkowego, to jednak między 9,5. a 10. dniem rozwoju embrionu, tj. w stadium 0–4 somitów, w komórkach uchyłka wątroby nie wykazano obecności ani mRNA AFP, ani samego białka. Jednak już w 12 godzin później, tj. po około 10,5 dniach rozwoju embrionu, w stadium 9–14 somitów wykazano obecność mRNA AFP, natomiast po 11,5 dniach wykazano obecność białka. W czasie rozwoju wątroby szczura bardzo wcześnie pojawia się ekspresja drugiego białka, tj. albuminy. mRNA dla albuminy (mRNA ALB) wykazano w komórkach hepatoblastu 11,5-dniowego zarodka, natomiast obecność białka ujawniono o jeden dzień później, tj. po 12,5 dniach. Autorzy zwracają uwagę na fakt, że ekspresja obydwu białek wymaga wcześniejszej obecności w komórkach hepatoblastu, tkanekowo-specyficznych aktywatorów transkrypcji [53]. Sugerują oni także, że zarówno wewnątrzwątrobowe, jak i część zewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych wywodzą się z tych komórek hepatoblastu, które jako pierwsze ujawniają ekspresję AFP [53].

Wydaje się, że pierwotne komórki hepatoblastu, zarówno pod względem prezentowanych markerów jak również pod względem cech morfologicznych, są homogenne do około 13. dnia rozwoju. Komórki są wydłużone, przyjmują owalny kształt i cechuje je wysoki stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny, który w miarę rozwoju zmniejsza się. Efekt ten, obserwowany między 12. a 14. dniem rozwoju, wywołany jest przez wzrost objętości cytoplazmy, gdyż wielkość dużego jądra komórkowego pozostaje w tym okresie niezmienną [30,53,68].

#### **V. KOMÓRKI BIPOTENCJALNE W WĄTROBIE ZARODKOWEJ I PŁODOWEJ ZWIERZĄT**

W toku licznych badań, przeprowadzonych w ostatnich latach, wykazano, że komórki hepatoblastu przechodzą proces różnicowania i stopniowego dojrzewania, o czym świadczy sekwencja, w jakiej pojawiają się bądź zanikają analizowane białka markerowe. Przypuszczano, że kluczowym momentem w rozwoju wątroby



jest pojawienie się komórek bipotencjalnych, tzn. zdolnych do różnicowania zarówno w kierunku hepatocytów, jak i cholangiocytów. Komórek tych poszukiwano w warunkach *in vivo* i metodami *in vitro*.

W 1988 roku Germain i wsp. [23] sugerowali – na podstawie analizy immunologicznej przeprowadzonej za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko: CK8, CK7 i CK 19 (o masach cząsteczkowych oznaczonych wówczas odpowiednio na: 55 000, 52 000 i 39 000), wimentynie, AFP, ALB i antygenom BDS<sub>7</sub> i HES<sub>6</sub> – że bipotencjalne komórki wątroby pojawiają się w około 12. dniu rozwoju embrionu szczura. Wykazano, że w tym czasie wszystkie komórki wątroby płodowej charakteryzowała obecność AFP, ALB, CK7, CK8 i GGT, natomiast antygen BDS<sub>7</sub> obecny był sporadycznie na niewielu komórkach. Germain i wsp. [23] sądzą, że komórki rodzicielskie hepatocytów i cholangiocytów nie mają jeszcze markerów liniowo specyficznych, tj. białek BDS<sub>7</sub> i HES<sub>6</sub>. Białko HES<sub>6</sub> pojawia się w 15. dniu rozwoju na nielicznych komórkach, przypominających morfologicznie hepatocyty. W 18. dniu rozwoju marker ten osiąga poziom obserwowany na hepatocytach u osobników dorosłych. Od około 16. dnia rozwoju komórki ujawniające antygen BDS<sub>7</sub> dodatkowo cechuje obecność CK19.

Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że komórki 12-dniowego hepatoblastu, w zależności od obecnych w środowisku hodowli czynników chemicznych, ujawniają cechy hepatocytów, o czym świadczy obecność antygenu HES<sub>6</sub> bądź cechy komórek kanalików żółciowych, czego świadectwem jest prezentowany antygen BDS<sub>7</sub>, przy czym obydwie grupy komórek zachowują ekspresję ALB [24].

W zgodzie z sugestiami Germain [23] i Marceau [30] pozostaje koncepcja modelu rozwoju wątroby zaproponowana przez Hixona [28]. Również on proponuje, aby za komórki macierzyste uznać populację, pojawiającą się w 12. dniu rozwoju zarodka szczura. Hipotetyczną komórkę prekursorową charakteryzują początkowo: antygen EP1, będący markerem komórek nabłonkowych, oraz antygeny OC.2 i OC.3, które są typowe również dla komórek owalnych. Około 12. dnia rozwoju część komórek hepatoblastu ujawnia dodatkowo antygen HBD1. Zdaniem Hixona [28], właśnie te komórki mogą być traktowane jako komórki macierzyste wątroby. W około 18. dniu rozwoju wątroby, komórki macierzyste lub ich komórki potomne zaczynają się różnicować w dwóch kierunkach. Pierwszą grupę komórek cechują – obecne już wcześniej antygeny: EP1, OC.2, OC.3 oraz antygen Hbd1, ujawniany jednak na bardzo niskim poziomie. Dodatkowo, na tych komórkach pojawia się antygen – BD1, którego obecność wyraźnie wskazuje na cholangiocytarny kierunek różnicowania. Drugą grupę komórek charakteryzuje utrata dotychczasowych antygenów, tj. OC.2 i OC.3, zachowanie antygenu EP1 i wzmożona ekspresja białka HBD1. Pojawienie się nowych antygenów, tj. H1 i H2, sugeruje hepatocytarny kierunek różnicowania drugiej grupy komórek. W modelu rozwoju wątroby, zaproponowanym przez Hixona [28], pierwotne komórki wątroby, uznane za komórki macierzyste, wyraźnie wykazują cechy wspólne z komórkami owalnymi.

Również Shiojiri i wsp. [53] podjęli próbę scharakteryzowania bipotencjalnych komórek rodzicielskich. Markerami, których ekspresję zbadano, były – oprócz wspomnianych już markerów hepatoblastu, tj. AFP i ALB – takie białka, jak: cytokeratyny, GGT i antygeny BDS<sub>7</sub> i HES<sub>6</sub>. Ponadto, komórki zanalizowano pod względem obecności ziaren glikogenu na terenie cytoplazmy, co uznaje się za cechę charakteryzującą hepatocyty. Kolejne zmiany w składzie białek markerowych, zaobserwowane w rozwijających się komórkach hepatoblastu były odzwierciedleniem zmian morfologicznych następujących w czasie rozwoju wątroby. Wykazano, że między 11,5. a 12,5. dniem rozwoju szczura w komórkach hepatoblastu pojawia się ekspresja cytokeratyn. Jako pierwsza ujawniana jest ekspresja CK8, a dopiero nieco później widoczna jest ekspresja CK18. Kolejnym markerem pojawiającym się w komórkach jest GGT. Należy zaznaczyć, że na tym etapie rozwoju komórki hepatoblastu nie stanowią już populacji homogennej i wykazują zróżnicowanie zarówno pod względem ilości CK18, jak i aktywności GGT. W okresie prenatalnym, wysoka aktywność tego enzymu ujawniana jest w wielu komórkach wątroby, w okresie postnatalnym stopniowo maleje w komórkach, natomiast u osobników dorosłych w zróżnicowanych, prawidłowych hepatocytach zanika całkowicie.

Wydaje się, że pomiędzy 11. a 13. dniem rozwoju nie następuje jeszcze proces dwukierunkowego różnicowania komórek hepatoblastu, gdyż nie ujawniono w nich ani obecności białka powierzchniowego hepatocytów – HES<sub>6</sub>, ani nie wykazano gromadzenia ziaren glikogenu [53]. Autorzy sugerują, że proces ten rozpoczyna się dopiero około 15. dnia rozwoju. Wtedy to, większa część pierwotnych komórek hepatoblastu wrasta pasmami między mezenchymatyczne komórki przegrody poprzecznej i rozpoczyna proces formowania komórek o charakterze gruczołowym. Przyjmuje się, że te właśnie komórki dają początek hepatocytom i tworzą następnie podstawę architektoniki narządu, tj. belecзки wątroby, które jednak w wątrobie płodowej jeszcze nie występują. Shiojiri i wsp. [53] wykazali, że antygen powierzchniowy hepatocytów – HES<sub>6</sub> pojawia się na komórkach właśnie między 15. a 16. dniem rozwoju embrionu. Jednak dopiero między 19. a 20. dniem rozwoju, w komórkach linii hepatocytarnej zaobserwowano pierwsze ziarna glikogenu [53]. Pozostała, mniej liczna część komórek hepatoblastu, będąc w kontakcie z komórkami mezenchymy, w sąsiedztwie żyły wrotnej, także około 15. a 16. dnia rozwoju embrionu różnicuje się w kierunku komórek nabłonkowych wyściełających ściany przewodów żółciowych [5, 67]. Shiojiri i wsp. [53] wykazali, że w komórkach hepatoblastu, otaczających strefę naczyniową bądź zlokalizowanych w jej pobliżu, zaczynają pojawiać się markery drugiej linii komórkowej, tj. markery komórek nabłonkowych przewodów żółciowych. Od 15. dnia rozwoju wszystkie komórki drugiej linii rozwojowej wykazują obecność CK8 i CK18, przy czym poziom CK18 jest znacznie wyższy aniżeli w komórkach parenchymalnych. Wyższa jest w tych komórkach również aktywność GGT. Ponadto, niektóre komórki ujawniają obecność cytokeratyny CK19, przy czym większość komórek, bo 50–75%, nadal cechuje

obecność AFP i ALB. Stopniowy rozwój tych komórek związany jest z pojawieniem się kolejnych markerów cholangiocytozy, tj. CK7 i BDS<sub>7</sub>. Komórki należące do tej linii rozwojowej coraz wyraźniej różnicują się w kierunku komórek nabłonkowych kanalików żółciowych, gdyż oprócz obecności: CK7, CK8, CK18 i CK19, ujawnianej aktywności GGT, coraz silniej manifestują marker powierzchniowy charakteryzujący komórki przewodów żółciowych, tj. białko BDS<sub>7</sub>. Obecny jeszcze na tych komórkach marker powierzchniowy hepatocytów – białko HES<sub>6</sub> – powoli zanika i staje się zupełnie niewykrywalny w drugim tygodniu rozwoju noworodka szczura. Zdaniem autorów, wyniki badań wskazują na to, że raczej grupa komórek pojawiających się między 15. a 18. dniem rozwoju embrionu, a nie jak wcześniej sugerowano w 12. dniu, nosi znamiona komórek bipotencjalnych i może być uznana za komórki rodzicielskie zarówno dla hepatocytów, jak i dla komórek kanalików żółciowych.

Do zbadania pierwotnych komórek wątroby płodowej Shiojiri i wsp. [53] wykorzystali również metodę transplantacji. Pomimo sugestii, że komórki bipotencjalne to komórki identyfikowane między 15. a 18. dniem rozwoju embrionu szczura, to jednak do jąder szczura biorcy przetransplantowano fragmenty wątroby 13,5-dniowego embrionu szczura. Ze względów metodycznych, eksperyment wykonano więc wtedy, gdy bipotencjalne komórki rodzicielskie zlokalizowane są jedynie w niewielkim fragmencie hepatoblastu, który otacza przestrzeń naczyńnicową. Podobnie jak Germain i wsp. [24] również i ta grupa badaczy pobrała do badań komórki bardziej pierwotne aniżeli te, które obecne są w wątrobie płodowej w 15.–17. dniu, kiedy rozwijają się struktury przewodów żółciowych. Po 2. miesiącach od momentu transplantacji, u szczura biorcy zaobserwowano obecność hepatocytów i wykazano rozwój struktur podobnych do przewodów żółciowych. Wyniki badań Shiojiri i wsp. [53] potwierdziły obecność w wątrobie płodowej szczura bipotencjalnych komórek rodzicielskich. Jednocześnie autorzy zwracają uwagę, że cechy tych komórek są podobne do cech charakteryzujących komórki owalne.

W toku kolejnych badań, przeprowadzonych przez Tee i wsp. [60], komórki obecne pomiędzy 13. a 21. dniem rozwoju wątroby szczura zanalizowano metodą immunocytochemiczną, wykorzystując do badań następujące białka markerowe: formę łożyskową transferazy glutationowej (PGST) oraz formę płodową kinazy pirogronianowej (M<sub>2</sub>-PK) – jako markery niedojrzałych hepatocytów wątroby embrionalnej, formę α (alfa) kinazy pirogronianowej (L-PK) i formę α (alfa) transferazy glutationowej (LGST) – jako markery hepatocytów dojrzałych, natomiast CK19 – jako marker komórek kanalików żółciowych [60]. Ponadto w komórkach zbadano ekspresję albuminy (ALB) [63].

Wykazano, że w 13. dniu rozwoju embrionu szczura komórki hepatoblastu cechuje obecność PGST, M<sub>2</sub>-PK oraz ALB, przy braku pozostałych markerów. Tian i wsp. [63] określili te komórki jako *oval-shaped cells*. Jednocześnie wykazano, że liczba tych komórek w trakcie rozwoju wątroby drastycznie maleje. W dojrzałym narządzie pozostają jedynie nieliczne. Zdaniem autorów te komórki są potomstwem komórek



macierzystych wątroby. W 15. dniu rozwoju, w komórkach wątroby pojawia się kolejny marker – forma L-PK, a pomiędzy 16. a 19. dniem – LGST. W 19. dniu rozwoju embrionu szczura, komórki wątroby charakteryzuje zatem obecność: PGST, M<sub>2</sub>-PK, ALB, L-PK i LGST. Jedynie dwa ostatnie markery występują w zróżnicowanych hepatocytach wątroby zwierząt dorosłych. Brak ekspresji CK19 w tych komórkach może potwierdzać hepatocytarny kierunek ich rozwoju. Z kolei komórki pierwotnych kanalików żółciowych, które w prawidłowej wątrobie szczura widoczne są od 18. dnia rozwoju, cechuje obecność: PGST, ALB i M<sub>2</sub>-PK, a od 19. dnia – ekspresja CK19. Jednocześnie ekspresja pozostałych markerów w tych komórkach stopniowo zanika tak, że w 19. dniu ujawniana jest sporadycznie, na bardzo niskim poziomie. Nikłą ekspresję albuminy obserwowano jednak w tych komórkach do 7. dnia po urodzeniu szczura [63]. Wydaje się, że proces dwukierunkowego różnicowania również w tym eksperymencie zaobserwowano około 15. dnia rozwoju embrionu.

Poszukiwania bipotencjalnych komórek rodzicielskich w wątrobie zwierząt, w celu ich analizy i poznania specyficznych antygenów, prowadzone są również metodami *in vitro* [55]. Wykazano, że jednym z rodzajów komórek, otrzymanych w efekcie hodowli epiblastów świni, są komórki oznaczone symbolem PICM-19. Obecnie sądzi się, że z epiblastu wywodzą się wszystkie trzy listki zarodkowe [7]. Talbot i wsp. [55] uważają, że komórki PICM-19 są ekwiwalentem embrionalnych, bipotencjalnych komórek wątroby. Przypominają one zarodkowe komórki wątroby świni z hodowli pierwotnej, ponieważ ujawniono w nich mRNA dla ALB oraz wykazano sekrecję białka do środowiska hodowli. Generalnie, komórki PICM-19 cechuje: duże, owalne jądro komórkowe, liczne owalne lub mocno wydłużone mitochondria, dobrze rozwinięta siateczka śródplazmatyczna zarówno szorstka, jak i gładka, aparat Golgiego, a ponadto obecność w ich wnętrzu wakuoli lipidowych i ziaren glikogenu.

Dalsza analiza komórek PICM-19 ujawniła w środowisku hodowli obecność trzech subpopulacji komórek. Do subpopulacji pierwszej zaliczono komórki stosunkowo duże, słabo zorganizowane, przypominające hepatocyty. O hepatocytarnym charakterze niektórych komórek PICM-19 świadczy zarówno możliwość indukcji cytochromu P-450 oraz ujawniana aktywność tego enzymu, jak i zdolność do transportu fluoresceiny do światła formowanych kanalików żółciowych. Do subpopulacji drugiej zaliczono komórki mniejsze, przypominające wyglądem komórki przewodów żółciowych, gdyż zorganizowane są one w struktury przewodowe. Ponadto wysoka aktywność GGT, ponad 19 razy wyższa niż w hepatocytach świni, sugeruje również cholangiocytarny typ komórek należących do drugiej grupy. Do trzeciej grupy zaliczono komórki wyróżniane jedynie na podstawie wyraźnie zarysowanego aparatu Golgiego, o innych niejednoznacznych cechach. Sądzi się, że ostatni typ komórek przypomina komórki sekrecyjne, odnajdywane w zewnątrzwątrobowych przewodach żółciowych.

Zdaniem autorów, o bipotencjalności komórek PICM-19 świadczy fakt, że są one zdolne do formowania – w warunkach hodowli – zarówno jednowarstwowych struktur, przypominających belecзки wątrobowe, jak i struktur wielowarstwowych, przypominających przewody żółciowe. Utrzymywane w hodowli przez ponad 2. lata nie tracą cechy bipotencjalności i nadal ujawniają sekrecję białek wątrobowo-specyficznych [55].

## VI. KOMÓRKI BIPOTENCJALNE W WĄTROBIE ZARODKOWEJ I PŁODOWEJ CZŁOWIEKA

Wyniki badań preparatów wątroby ludzkiej, przeprowadzone techniką immunocytochemiczną, sugerują obecność w wątrobie zarodka i płodu ludzkiego bipotencjalnych komórek, które wykazują cechy komórek należących do dwóch różnych szeregów rozwojowych [26].

Haruna i wsp. [26] zbadali komórki wątroby ludzkiej w trakcie rozwoju i wzrostu organizmu pod kątem obecności na terenie cytoplazmy: wimentyny, CK14, CK19 i antygeny specyficzne dla hepatocytów, oznaczonego symbolem HepPar1. Tkanki zanalizowano między 4. a 40. tygodniem życia płodowego, 4. miesiącem a 6. rokiem oraz między 43. a 65. rokiem życia. Wyrazem kolejnych etapów rozwoju komórek wątroby jest, zdaniem autorów, stopniowe ujawnienie w komórkach ekspresji nowych białek z jednoczesną utratą ekspresji białek markerowych, obecnych już wcześniej w komórce.

W 4. tygodniu rozwoju embrionalnego człowieka komórki zawiązka wątroby cechują jedynie dwa, spośród czterech zbadanych markerów, tj. CK19 oraz antygen HepPar1. Rozwój komórek wątroby w okresie między 8. a 14. tygodniem ciąży związany jest z pojawieniem się populacji komórek, w których cytoplazmie ujawniono dodatkowo obecność CK14. Sugeruje się, że ta właśnie populacja komórek ma cechy zarówno hepatocytów, tj. antygen HepPar1, jak i cechy dojrzałych komórek przewodów żółciowych, tj. CK19, oraz że nosi znamiona komórek bipotencjalnych, gdyż w około 15. tygodniu ciąży następuje proces różnicowania tych komórek w dwóch kierunkach, tzn. w kierunku linii hepatocytarnej i cholangiocytarnej.

Od 16. tygodnia ciąży, pierwszą z tych linii reprezentują kolejno: komórki wykazujące obecność CK14 i HepPar1 z jednoczesnym zanikiem ekspresji CK19, a następnie komórki wykazujące stabilną, bo sięgającą wieku dojrzałego, obecność tylko jednego z badanych antygenów, tj. białka HepPar1, przy nieobecności trzech pozostałych markerów. Drugi szereg rozwojowy reprezentują początkowo komórki, które charakteryzuje CK14 i CK19 oraz dodatkowo, jedynie przejściowo – wimentyna. W komórkach tych zanika antygen HepPar1. Następna, pojawiająca się w tym szeregu rozwojowym grupa komórek, ujawnia stabilną, bo sięgającą dojrzałego

okresu życia organizmu obecność CK19, przy braku w komórkach przewodów żółciowych wątroby zwierząt dorosłych wszystkich pozostałych białek markerowych [26].

Zdaniem autorów, komórki zdolne do dwukierunkowego różnicowania oraz ujawniające cechy zarówno hepatocytów, jak i cholangiocytów, zidentyfikowane między 8. a 14. tygodniem ciąży w wątrobie płodowej człowieka są odpowiednikiem bipotencjalnych komórek wykrytych u zwierząt, np. u szczura [26].

Szczególnie interesująca wydaje się obecność, w pierwotnych komórkach nabłonkowych wątroby markera komórek mezenchymatycznych – wimentyny, zwłaszcza że białko to ujawniono również w komórkach trzustki embrionu szczura. Przejściową ekspresję wimentyny wiąże się z aktywnością morfogenetyczną pierwotnych komórek [10]. Wykazano także, że komórki wątroby płodowej człowieka cechuje ekspresja markerów specyficznych dla krwiotwórczych komórek macierzystych [9, 21].

## VII. PIERWOTNE, NIEZRÓŻNICOWANE KOMÓRKI W WĄTROBIE OSOBNIKÓW DOROSŁYCH

Przypuszcza się, że liczba pierwotnych, nieodróżnicowanych komórek z okresu zarodkowego, tj. zarówno komórek macierzystych i być może także bipotencjalnych, w rozwoju organizmu stopniowo maleje. Germaine i wsp. [23] sugerują, że w 12. dniu rozwoju komórki te stanowią 70%, a w 18. dniu jedynie 20% wszystkich komórek wątroby szczura. Marceau [30] szacuje, że w wątrobie 2- i 14-dniowych noworodków szczura populacja komórek bipotencjalnych stanowi mniej niż 5% wszystkich komórek. Również Brill i wsp. [13] oceniają, że komórki ujawniające  $\alpha$ -fetoproteinę lub albuminę, obecne w wątrobie noworodków szczura, stanowią mniej niż 10% wszystkich komórek narządu. Jednocześnie od dawna przypuszczano, że w wątrobie dorosłych zwierząt i w wątrobie człowieka pozostaje niewielka liczebnie populacja pierwotnych, nieodróżnicowanych komórek okresu zarodkowego [28, 35, 49].

Wyniki badań przeprowadzonych w 1985 roku przez Petropulosa i wsp. [43, 44] ujawniły, że w wątrobie zwierząt dojrzałych obecne są komórki o cechach charakteryzujących komórki wątroby płodowej. W toku analizy porównawczej RNA, uzyskanego z komórek 20-dniowych embrionów szczura i z komórek wątroby zwierząt dorosłych, wykazano między nimi znaczne różnice. Wyrażają się one, z jednej strony, nieobecnością w komórkach embrionu takich RNA, które obecne są z kolei w komórkach zwierząt dorosłych (około 12%), a z drugiej strony, obecnością w komórkach embrionu pewnych RNA, które nieobecne są w komórkach zróżnicowanych. Fragmenty RNA, nieobecne w komórkach 20-dniowego zarodka, a obecne



w komórkach zwierząt dorosłych związane są, zdaniem autorów, z odmiennym fenotypem i funkcją komórek zróżnicowanych [43]. W dalszych badaniach wykazano, że fragmenty o długości 2,3 kp zasad, które ujawniono w komórkach płodowych, odpowiadają przede wszystkim mRNA AFP [44]. Ponadto wykazano, że omawiany mRNA, charakterystyczny dla komórek wątroby 20-dniowych embrionów szczura, obecny jest jednak w wątrobie zwierząt dorosłych w minimalnej ilości, jedynie we frakcji niezidentyfikowanych komórek nieparenchymalnych. W zróżnicowanych hepatocytach nie wykazano obecności tych fragmentów mRNA. Sugerowano, że komórki, w których ujawniono obecność mRNA AFP, stanowią, być może, populację pierwotnych komórek hepatoblastu, obecną także w wątrobie zwierząt dojrzałych. Nie zlokalizowano jednak wówczas w zraziku wątrobowym położenia komórek ujawniających markery okresu płodowego [44].

W kolejnych pracach Alpini i wsp. [4] wykazali, że w wątrobie prawidłowej dorosłych szczurów istnieje niewielka liczebnie grupa małych, bo znacznie mniejszych od hepatocytów, komórek nieparenchymalnych, których szczególną cechą było duże jądro komórkowe o owalnym kształcie. Komórki te przypominały komórki wątroby płodowej, gdyż ujawniono w nich zarówno obecność mRNA dla AFP, jak i mRNA dla ALB. Zlokalizowane były wyłącznie w strefie okołowrotnej. Również Sirica i wsp. [54] ujawnili w dojrzałej prawidłowej wątrobie szczura obecność małych komórek, sporadycznie wykazujących mRNA dla AFP, zlokalizowanych wyłącznie w sąsiedztwie kanalików żółcionośnych.

Komórek macierzystych poszukiwano w różnych subpopulacjach komórek nabłonkowych wątroby. Wielu autorów sądzi, że komórki rodzicielskie hepatocytów i cholangiocyty są spokrewnione z komórkami przewodów żółciowych i znajdują się w wątrobie zwierząt dorosłych w pobliżu kanalików żółcionośnych (kanaliki Heringa) [6, 72].

Zajicek i wsp. [72] uważają, że na komórki nabłonkowe przewodów żółciowych wątroby szczura składają się dwie różne pod względem funkcjonalnym grupy komórek. Pierwszą – zlokalizowaną w odległości około 200  $\mu\text{m}$  w obszarze wokół żyły wrotnej – stanowią komórki, określone w pracy jako komórki rodzicielskie, zdolne do proliferacji w odpowiedzi na różne bodźce; drugą – zlokalizowaną w trzeciej strefie zrazika – stanowią komórki o charakterze funkcjonalnym, o niskim potencjale proliferacyjnym, tj. zróżnicowane hepatocyty.

Wykazano, że w odpowiedzi na bromobenzen – czynnik, który wywołuje rozległą martwicę jedynie hepatocytów i to zlokalizowanych głównie w trzeciej strefie zrazika, a który nie uszkadza komórek nabłonkowych przewodów żółciowych, wzrost proliferacji dotyczy wyłącznie komórek zlokalizowanych w strefie, gdzie obecne są komórki rodzicielskie. Wzrost ten koreluje ze wzrostem proliferacji komórek nabłonkowych przewodów żółciowych. Jednocześnie zwrócono uwagę na fakt, że w sytuacji odwrotnej, tj. gdy uszkodzeniu ulegają jedynie komórki nabłonkowe przewodów żółciowych, a hepatocyty pozostają niezniszczone, do regeneracji utra-

conych komórek mobilizowana jest ta sama grupa komórek rodzicielskich. Świadczy to, zdaniem autorów, o obecności w wątrobie dorosłych szczurów komórek bipotencjalnych, które spokrewnione są z komórkami przewodów żółciowych. Komórki bipotencjalne zlokalizowano w strefie okołowrotnej zrazika [72]. Wyniki licznych prac potwierdzają te przypuszczenia [1, 2, 3, 42].

Należy jednocześnie nadmienić, że mechanizm regeneracji komórek trzeciej strefy zrazika, polegający, zdaniem autorów, na przepływie nowo formowanych, niedojrzałych komórek ze strefy, gdzie znajdują się komórki rodzicielskie, do strefy funkcjonalnej zrazika, budzi spore kontrowersje [11].

Podobnie Brill i wsp. [12, 13] uważają, że w gronku wątrobowym wątroby dorosłego szczura, w regionie triady wątrobowej, obecne są komórki o cechach bardzo pierwotnych, które jednocześnie charakteryzuje duży potencjał proliferacyjny. Komórki te określono terminem *small cells with oval-shaped nuclei*. Procesy ich podziału na komórki potomne rozpoczynają się w strefie okołowrotnej zrazika wątrobowego, natomiast procesy różnicowania i dojrzewania komórek odbywają się w regionie żyły środkowej. Pierwotne komórki wątroby dojrzałej są zdaniem Brilla i wsp. [13] podobne do komórek hepatoblastu. Scharakteryzowano je jako jednojądrowe, diploidalne, z dużą ilością lizosomów, o wyraźnie zaznaczonej autofluorescencji. Ponadto cechuje je ekspresja AFP i ALB [13].

Wyniki ostatnich badań również wskazują na obecność w wątrobie osobników dorosłych komórek wątroby embrionalnej. Początkowo Tee i wsp. [60] zasygnalizowali jedynie, że w prawidłowej wątrobie dorosłych szczurów, w otoczeniu przewodów żółciowych, obecne są nieliczne komórki kształtem przypominające komórki wątroby płodowej, które wykazują zdolność do inkorporacji radioaktywnej tymidyny. Wyniki kolejnych badań, przeprowadzonych przez Tian i wsp. [63], potwierdziły, że w wątrobie 5–8-tygodniowych szczurów, w strefie okołowrotnej zrazika, znajdują się nieliczne komórki, podobne do komórek hepatoblastu 13-dniowego embrionu. Komórki te określono terminem „komórki o owalnym kształcie” (ang. *oval shaped cells*) dla podkreślenia faktu, że zidentyfikowano je w wątrobie prawidłowej, i w celu odróżnienia ich od komórek owalnych proliferujących w wątrobie zwierząt podczas hepatokarcynogenezy eksperymentalnej. Cechuje je ekspresja albuminy oraz formy płodowej kinazy pirogronianowej ( $M_2$ -PK). W zróżnicowanych hepatocytach enzym ten występuje w formie alfa (L-PK) [63].

Badania komórek bipotencjalnych w wątrobie dojrzałej prowadzono również w warunkach *in vitro*.

Komórek macierzystych poszukiwano w populacji, tzw. „małych hepatocytów”. Terminem tym określono małe, jednojądrowe, diploidalne komórki, które pojawiały się w warunkach *in vitro*, w czasie hodowli zróżnicowanych, głównie dwujądrowych hepatocytów szczura. Początkowo przypuszczano, że właśnie one są komórkami macierzystymi, gdyż zaobserwowano, że tylko te komórki szybko proliferują i formują kolonie otoczone przez dwujądrowe [33]. W kolejnych badaniach wykazano,

że choć małe komórki ujawniają wysoki potencjał proliferacyjny, to jednak zarówno morfologicznie, immunofenotypowo, jak i funkcjonalnie przypominają hepatocyty [35]. Komórki te nie są w pełni zróżnicowanymi hepatocytami i dlatego nazwano je *committed progenitor cells* [36]. Liczne badania, które przeprowadzili Mitaka i wsp. [34–37], potwierdziły przypuszczenia o zróżnicowaniu hepatocytów pod względem zdolności tych komórek do przejścia podziałów komórkowych. Nie przyczyniły się one do odnalezienia w populacji hepatocytów komórek macierzystych wątroby.

Pomimo że „małe hepatocyty” cechuje wysoki potencjał proliferacyjny, jednak bardzo trudno utrzymać tę cechę przez dłuższy czas w warunkach *in vitro*. Dopiero niedawno Tateno i wsp. [56] opracowali nową metodę długoterminowej hodowli hepatocytów, które utrzymywane w warunkach *in vitro* wykazują zdolność do podziałów komórkowych przez cały czas trwania hodowli. Nowo opracowana metoda pozwoliła na zbadanie parenchymalnych komórek wątroby pod kątem obecności w tej grupie bipotencjalnych komórek rodzicielskich [57]. Komórki zbadano między 4. a 56. tygodniem życia szczurów. Wyizolowaną – w kolejnych tygodniach życia zwierząt – pulę komórek hepatocytarnych rozdzielano na dwie frakcje różniące się wielkością komórek. Pierwszą frakcję, zawierającą komórki największe, tj. w zakresie 500–1250  $\mu\text{m}^2$ , określano jako komórki parenchymalne wątroby, drugą frakcję, zawierającą komórki o rozmiarach w zakresie 180–750  $\mu\text{m}^2$  (około 55% powierzchni komórek frakcji pierwszej), określano jako frakcję tzw. „małych hepatocytów” (ang. *small hepatocytes*). Komórki drugiej frakcji cechowała obecność białek markerowych hepatocytów; np. albuminy, transferyny, CK8 i CK18. Nie stwierdzono w tej frakcji komórek ujawniających antygeny, jakie charakteryzują komórki nabłonkowe przewodów żółciowych. Komórki te nie prezentowały również CK14, która charakteryzuje komórki nabłonkowe wątroby płodowej.

Dalszej analizie poddano frakcję, którą, zdaniem autorów, stanowiły wyłącznie „małe hepatocyty”. Komórki te utrzymywano w odpowiednio dobranych warunkach środowiska tak, aby w warunkach *in vitro* mogły przechodzić więcej aniżeli kilka podziałów komórkowych i aby w efekcie mogły uformować kolonie. Wykazano, że zarówno zwierzęta kilku- (8–9), kilkunasto- (11–14), jak i kilkudziesięcioletnie (22, 52 i 56) zawierają we frakcji „małych hepatocytów” komórki o wyjątkowo wysokim potencjale proliferacyjnym. Komórki te nie ginęły w środowisku hodowli i przechodziły wiele rund podziałowych. Choć analizowaną frakcję „małych hepatocytów” stanowią zarówno komórki mono-, jak i dwujądrowe, to jednak na populację o największym potencjale proliferacyjnym składają się wyłącznie komórki jednojądrowe.

Od 7. dnia, w hodowli pojawiają się komórki prezentujące nowe cechy, których nie obserwowano wcześniej. Komórki ujawniają – nieobecna do tej pory – CK19, a od 10. dnia – CK7. Autorzy zwracają uwagę na fakt, że ekspresja cytokeratyn w omawianych komórkach jest identyczna z sekwencją ekspresji cytokeratyn w



wątrobie embrionalnej szczura. Jednocześnie od 10. dnia, w hodowli pojawiają się komórki, w których zanika ekspresja typowego dla hepatocytów markera, tj. albuminy, a w których zaczyna dominować ekspresja markerów specyficznych dla komórek nabłonkowych przewodów żółciowych. Zdaniem autorów, sugeruje to obecność w populacji „małych hepatocytów” bipotencjalnych komórek rodzicielskich. Szacunkowo stanowią one około 1% wszystkich komórek hodowli, natomiast w całej puli hepatocytów, wyizolowanych z perfundowanej roztworem kolagenazy wątroby 10-dniowych szczurów, ilość komórek o cechach odpowiadających bipotencjalnym komórkom rodzicielskim wynosi około 0,002%. Ponadto, niezwykle interesujący wydaje się fakt pojawienia się w 10. dniu wzrostu hodowli komórek ujawniających ekspresję nieobecnego wcześniej markera, tj. AFP. Być może, pojawienie się AFP wskazuje na przejście niewielkiej grupy komórek w formę przypominającą stadium blastyczne (*blast-like*) [57].

Wydaje się, że w populacji hepatocytów istnieje subpopulacja komórek o wysokim potencjale proliferacyjnym. Należy jednocześnie zaznaczyć, że zdaniem Sella [50] sprawą dyskusyjną jest to, czy komórki te mogą przechodzić proces transdiferencjacji, tj. odróżnicowania do form bardziej pierwotnych, o fenotypie *blast-like*. Także Overtuf [41] wykazał, że wysoki potencjał proliferacyjny cechuje subpopulację hepatocytów myszy. Sugeruje on jednak, że w obrębie tej grupy komórek nie można poszukiwać ani komórek bipotencjalnych, ani tym bardziej komórek macierzystych.

Wydaje się, że odpowiednikiem bipotencjalnych komórek wątroby prawidłowej są małe, diploidalne komórki oznaczone symbolem WB-F344, które wyizolowano z wątroby młodych, dojrzałych szczurów Fischer 344. Komórki te wykazują cechy komórek owalnych, co sugeruje, że nie stanowią one subpopulacji hepatocytów [25, 64]. Utrzymywane w warunkach hodowli wykazują zdolność do proliferacji [64]. Komórki WB-F344, transformowane *in vitro* za pomocą *N*-metylo-*N*-nitro-*N*-nitrozoguanidyny (linia oznaczona WB-5-11), a następnie wszczepione podskórnym lub dootrzewnowo myszom rozwijają u biorcy guzy klasyfikowane jako pierwotne nowotwory wątroby, tj. wątrobiak płodowy, rak i gruczolakorak wątrobowokomórkowy [65, 66]. Wykazano także, że komórki WB-F344 przetransplantowane do wątroby różnicują się w kierunku hepatocytów i integrują z komórkami otaczającej je parenchymy [14]. Zdaniem autorów wskazuje to na znaczącą rolę czynników matryksu zewnątrzkomórkowej w procesie różnicowania. Być może z tego względu w tym eksperymencie nie zaobserwowano procesu różnicowania komórek WB-F344 w kierunku cholangiocytów. W toku kolejnych badań wykazano, że komórki WB-F344 hodowane w medium o odpowiednio dobranym składzie, pod wpływem maślanu sodu, wykazują ekspresję aminotransferazy tyrozynowej, markera zróżnicowanych hepatocytów [15]. Wyniki badań wskazują na dużą plastyczność tej grupy komórek, co potwierdza ich pierwotny charakter. Dlatego też określa się je jako *stemlike cells* [14].

Wyniki wielu prac wskazują na to, że również w wątrobie prawidłowej ludzi dorosłych znajdują się nieliczne komórki o cechach zbliżonych do cech komórek rodzicielskich. Haruna i wsp. [26] wykazali, że w wątrobie, pochodzącej od osób w wieku od 45. do 65 lat, obecne są małe, komórki nabłonkowe o owalnym kształcie. Komórki te, zlokalizowane wyłącznie w strefie okołowrotnej, charakteryzuje ekspresja CK 19, a jednocześnie brak CK 14 i wimentyny. Autorzy zachowują jednak ostrożność w nazwaniu tych komórek rodzicielskimi, wskazując na konieczność przeprowadzenia dalszych badań. Jednocześnie wysuwają sugestię, że komórki te mogą stanowić komórki kanalików żółciowych bądź pozostałość komórek tzw. blaszki przewodowej (*ductal plate*) [26]. Terminem tym określa się komórki, które w wątrobie 14-tygodniowego płodu człowieka pojawiają się w zatoce wątrobowej i proliferują tworząc warstwę ulokowaną w regionie żyły wrotnej. W 14. tygodniu komórki te cechują: CK8 CK18 i CK19, a od 20 tygodnia CK7. Wydaje się, że struktura ta koresponduje z warstwą laminin otaczającą przewody żółciowe w dojrzalej wątrobie [20]. Jak wykazano, niektóre komórki blaszki przewodowej wątroby płodowej mają markery krwiotwórczych komórek macierzystych [Blakolmer 1995].

Komórki o cechach zbliżonych do cech komórek pierwotnych ujawniono także w chorobowo zmienionej wątrobie człowieka [16, 29, 45–48].

Jednocześnie wykazano, że pierwotne, nabłonkowe komórki wątroby człowieka stanowią heterogenną populację, na którą składają się zarówno komórki rodzicielskie, jak i ich komórki potomne. Wydaje się, że komórki potomne są bardziej zróżnicowane i mają cechy pośrednie między komórkami rodzicielskimi a hepatocytami lub cholangiocytami [45].

Również obecność komórek trzustki w wątrobie prawidłowej człowieka można wytłumaczyć istnieniem wielopotencjalnych komórek macierzystych [22]. Terada i wsp. [61] wykazali, że w wątrobie człowieka, zarówno prawidłowej jak i chorobowo zmienionej, pochodzącej od osób w wieku od 1 miesiąca do 84 lat, aż w 41 przypadkach na 1000 obecne są komórki części egzokryennej trzustki. Komórki przewodowe, pęcherzykowe i komórki przypominające komórki śródpęcherzykowe występują w formie skupisk o średnicy 250–900  $\mu\text{m}$ . Skupiska te znajdują się głównie w pobliżu wewnątrzwątrobowych przewodów żółciowych i przeplatają się z komórkami gruczołów okołożółciowych (ang. *intrahepatic peribiliary glands*). W toku dalszych badań ujawniono, że gruczoły okołożółciowe powstają z pierwotnych komórek hepatoblastu, zlokalizowanych w obszarze okołowrotnym [62]. Wydaje się, że komórki trzustki ujawnione w wątrobie prawidłowej człowieka również mogą wywodzić się z komórek hepatoblastu. Jest to jednak tylko pośredni dowód na istnienie wielopotencjalnych komórek macierzystych wątroby [22].

## VIII. UWAGI KOŃCOWE

W wątrobie dorosłych zwierząt i w wątrobie człowieka, w strefie okołowrotnej zrazika wykazano obecność pierwotnych, niezróżnicowanych komórek wielo lub/i bipotencjalnych, o cechach morfologicznych i immunofenotypowych zbliżonych do cech komórek, jakie ujawniono w wątrobie płodowej. Wyniki licznych prac wskazują, że komórki te są odpowiednikiem komórek macierzystych wątroby. Wydaje się, że są związane z najmniejszymi strukturami przewodów żółciowych. Jednak na podstawie badań wątroby prawidłowej, trudno jest precyzyjnie wskazać ich lokalizację, gdyż trudno powiedzieć, które z pierwotnych komórek wątroby osobników dorosłych są „prawdziwymi” komórkami macierzystymi (ang. *true stem cells*), a które stanowią ich potomstwo [2].

## PIŚMIENNICTWO

- [1]ALISON M.R, GOLDING M, SARRAF CE. Liver stem cells: when the going gets tough they get going. *Int J Exp Pathol* 1997; **78**: 365–381.
- [2]ALISON MR, GOLDING M, SARRAF CE, EDWARDS RJ, LALANI EN. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1182–1190.
- [3]ALISON MR, GOLDING M, SARRAF CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 1996; **29**: 373–402.
- [4]ALPINI G, ARAGONA E, DABEVA M, SALVI R, SHAFRITZ DA, TAVOLONI N. Distribution of albumin and  $\alpha$ -fetoprotein mRNAs in normal hyperplastic and preneoplastic rat liver. *Am J Pathol* 1992; **141**: 623–632.
- [5]ALPINI G, PHILIPS JO, La RUSSO NF. The biology of biliary epithelia. [w] Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB Schachter DA, Schafritz DA [red.] *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press Ltd 1994: 623–653.
- [6]ARBER N, ZAJICEK G. Streaming liver VI: Streaming intrahepatic bile ducts. *Liver* 1990; **10**: 205–208.
- [7]BARTEL H. Embriologia. Warszawa, PZWL 1995: 236–260.
- [8]BISGAARD HC, PARMELLE DC, DUNSFORD HA, SCHECHI S, THORGEIRSSON SS. Keratin 14 protein in cultured nonparenchymal rat hepatic epithelial cells: characterization of keratin 14 and keratin 19 as antigens for the commonly used mouse monoclonal antibody OV-6. *Mol Carcinog* 1993; **7**: 60–66.
- [9]BLAKOLMER K, JASKIEWICZ K, DUNSFORD HA, ROBSON SC. Hematopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology* 1995; **21**: 1510–1516.
- [10]BOUWENS L, De BLAY E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J Histochem and Cytochem* 1996; **44**: 943–951.
- [11]BRALET M-P, BRANCHEREAU S, BRECHOT CH, FERRY N. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am J Pathol* 1994; **144**: 896–905.
- [12]BRILL S, HOLST P, SIGAL S, ZVIBEL I, FIORINO A, OCHS A, SOMASUNDARAN U, REID LM. Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; **204**: 261–269.



- [13]BRILL S, SIGAL S, ZVIBEL I, HOLST P, FIORINO A, REID LM. Phenotype and regulation of hepatic progenitor cells versus mature liver cells. *Advanced Drug Delivery Rev* 1995; **17**: 273–277.
- [14]COLEMAN WB, WENNERBERG AE, SMITH GJ, GRISHAM JW. Regulation of the differentiation of diploid and some aneuploid rat liver epithelial (stemlike) cells by the hepatic microenvironment. *Am J Pathol* 1993; **142**: 1373–1382.
- [15]COLEMAN WB, SMITH GJ, GRISHAM JW. Development of dexamethasone-inducible tyrosine aminotransferase activity in WB-F344 rat liver epithelial stemlike cells cultured in the presence of sodium butyrate. *J Cell Phys* 1994; **161**: 463–469.
- [16]CROSBY HA, HUBSCHER S, FABRIS L, JOPLIN R, SELL S, KELLY D, STRAIN AJ. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* 1998; **152**: 771–779.
- [17]DESMET VJ. Introduction. [w] Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB Schachter DA, Schafritz DA [red.] *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press Ltd 1994: 3–14.
- [18]DUNSFORD AD, SELL S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatoma. *Cancer Res* 1989; **49**: 4887–4893.
- [19]FARIS RA, MONFILS BA, DUNSFORD HA, HIXON DC. Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules and carcinomas induced by the Resistant Hepatocyte model system. *Cancer Res* 1991; **51**: 1308–1317.
- [20]FRENCH SW. Cytoskeleton: Intermediate Filaments. [w] Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB Schachter DA, Schafritz DA, [red.] *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press Ltd 1994: 33–44.
- [21]FUJIO K, HU Z, EVARTS RP, MARSDEN ER, NIU CH, THORGEIRSSON SS. Coexpression of stem cell factor and c-kit in embryonic and adult liver. *Exp Cell Res* 1996; **224**: 243–250.
- [22]GERBER MA. Liver stem cells and development. *Lab Invest* 1993; **68**: 253–254.
- [23]GERMAIN L, BLOUIN M-J, MARCEAU N. Biliary epithelial and hepatocytic lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins  $\alpha$ -fetoprotein albumin and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 1988; **48**: 4909–4918.
- [24]GERMAIN L, NOEL M, GOURDEAU H, MARCEAU N. Promotion of growth and differentiation of ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res* 1988; **48**: 368–378.
- [25]GRISHAM JW, COLEMAN WB, SMITH GJ. Isolation culture and transplantation of rat hepatocytic precursor stem-like cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; **204**: 270–279.
- [26]HARUNA Y, SAITO K, SPAULDING S, NALESNIK MA, GERBER MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* 1996; **23**: 476–481.
- [27]HIXON DC, FARIS RA, THOKPSON NL. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiol* 1990; **58**: 65–77.
- [28]HIXON DC, ALLISON JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetylamide or ethionine in a choline deficient diet. *Cancer Res* 1985; **45**: 3750–3760.
- [29]HSIA CH, EVARTS RP, NAKATSUKASA H, MARSDEN ER, THORGEIRSSON SS. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocellular hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1992; **16**: 1327–1333.
- [30]MARCEAU N, BLOUIN M-J GERMAIN L, NOEL M. Role of different epithelial cell types in liver ontogenesis regeneration and neoplasia. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1989; **25**: 336–341.
- [31]MARCEAU N, GERMAIN L, GOYETTE R, NOEL M, GOURDEAU H. Cell of origin of distinct cultured rat liver epithelial cells as typed by cytokeratin and surface component selective expression. *Biochem Cell Biol* 1986; **64**: 788–802.

- [32]MARCEAU N. Biology of disease: cell lineages and differentiation programs in epidermal, urothelial and hepatic tissues and their neoplasms. *Lab Invest* 1990; **63**: 4–20.
- [33]MITAKA T, SATTTLER GA, SATTTLER GL, SARGENT LM, PITOT HC. Multiple cell cycles occur in rat hepatocytes cultured in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 1991; **13**: 21–30.
- [34]MITAKA T, MIKAMI M, SATTTLER GL, PITOT HC, MOCHIZUKI Y. Small cell colonies appear in the primary culture of adult rat hepatocytes in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 1992; **16**: 440–447
- [35]MITAKA T, SATTTLER GL, PITOT HC, MOCHIZUKI Y. Characteristics of small cell colonies developing in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1992; **62**: 329–335.
- [36]MITAKA T, NORIOCA K, SATTTLER GL, PITOT HC, MOCHIZUKI Y. Effect of age on the formation of small-cell colonies in cultures of primary rat hepatocytes. *Cancer Res* 1993; **53**: 3145–3148.
- [37]MITAKA T, NORIOKA K-I, NAKAMURA T, MOCHIZUKI Y. Effects of mitogens and co-mitogens on the formation of small-cell colonies in primary cultures of rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 1993; **157**: 461–468.
- [38]MOSKALEWSKI S. Wątroba i pęcherzyk żółciowy. [w] Histologia. Ostrowski K [red.] Warszawa PZWL, 1995: 662
- [39]NAGLE RB. Cytokeratin expression in carcinoma. *Biochem Mol Aspects Selected Cancer* 1994; **2**: 384–410.
- [40]NAKAMURA H, HIRATA K, YAMASHIRO K, HIRANUMA K, SHIBATA K, HIGASHI K, MORITA T, HIRANO H. Increase of hepatic mRNAs of profilin, actin and extracellular matrix proteins after carbon tetrachloride treatment and partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 568–573.
- [41]OVERTURF K, AL-DHALIMY M, OU CH-N, FINEGOLD M, GROMPE M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997; **151**: 1273–1280.
- [42]PETERSEN BE, ZAJAC VF, MICHALOPOULOS GK. Bile Ductular damage induced by methylene dianiline inhibits oval cells activation. *AM J Pathol* 1997; **151**: 905–909.
- [43]PETROPULOS CHJ LEMIRE JM, GOLDMAN D, FAUSTO N. Homology between rat liver populations during development regeneration and neoplasia. *Cancer Res* 1985/1; **45**: 5114–5121.
- [44]PETROPULOS CHJ, YASWEN P, PANZICA M, FAUSTO N. Cell lineages in liver carcinogenesis: possible clues from studies of the distribution of  $\alpha$ -fetoprotein RNA, sequences in cell populations isolated from normal regenerating and preneoplastic rat livers. *Cancer Res* 1985/2; **45**: 5762–5768.
- [45]ROSKAMS T, De VOS R, DESMET V. Undifferentiated progenitor cells in focal nodular hyperplasia of the liver. *Histopathol* 1996; **28**: 291–299.
- [46]RUCK P, XIAO J-C, KAISERLING E. Immunoreactivity of sinusoids in hepatoblastoma: an immunohistochemical study using lectin UEA-1 and antibodies against endothelium-associated antigens including CD 34. *Histopathol* 1995; **26**: 451–455.
- [47]RUCK P, XIAO JCH KAISERLING E. Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. *Am J Pathol* 1996; **148**: 321–329.
- [48]RUCK P, XIAO J-C, PIETSCH T, Von SCHWEINITZ D, KAISERLING E. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7 albumin and oval associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathol* 1997; **31**: 324–329.
- [49]SELL S. Is there a liver stem cell. *Cancer Res* 1990; **50**: 3811–3815
- [50]SELL S. Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocyte following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells* 1997; **15**: 378–385.

- [51]SELL S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 1998; **27**: 317–331.
- [52]SHABANA AH, KHETTAB R, SWAFMH, FOREST N, OUHAYOUN JP. A switch in cyokeratin expression and intermediate filament organization associated with epithelial stratification. *J Biol Buccale* 1992; **20**(1): 33–43.
- [53]SHIOJIRI N, LEMIRE JM, FAUSTO N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 1991; **51**: 2611–2620.
- [54]SIRICA AE. Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1996; **24**: 90–99.
- [55]TALBOT NC, CAPERNA TJ, LEBOW LT, MOSCIONI D, PURSEL VG, REXROAD SE. Ultrastructure enzymatic and transport properties of the PICM-19 bipotent liver cell line. *Exp Cell Res* 1996; **225**: 22–34.
- [56]TATENO C, YOSHIZATO K. Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 1996; **148**: 383–392.
- [57]TATENO C, YOSHIZATO K. Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. *Am J Pathol* 1996; **149**: 1593–1605.
- [58]TEE LBG, SMITH PGJ, YEOH GCT. Expression of alpha mu and pi class glutathione S-transferases in oval and ductal cells in liver of rats placed on a choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1992; **13**: 1879–1885.
- [59]TEE LBG, KIRILAK Y, HUANG W-H, MORGAN RH, YEOH GCT. Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2747–2756.
- [60]TEE LBG, KIRILAK Y, HUANG W-H, SMITH PGJ, MORGAN RH, YEOH GCT. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 251–259.
- [61]TERADA T, NAKANUMA Y, KAKITA A. Pathologic observations of intrahepatic peribiliary Glands in 1000 consecutive autopsy liver. *Gastroenterol* 1990; **98**: 1333–1337.
- [62]TERADA T, NAKANUMA Y. Development of human intrahepatic peribiliary glands. *Lab Invest* 1993; **68**: 261–269.
- [63]TIAN YW, SMITH PG, YEOH GC. The oval-shaped cell as a candidate for a liver stem cell in embryonic neonatal and precancerous liver: identification based on morphology and immunohistochemical staining for albumin and pyruvate kinase isoenzyme expression. *Histochem Cell Biol* 1997; **107**: 243–250.
- [64]TSAO MS, SMITH JD, NELSON KG, GRISHAM JW. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of oval cells. *Exp Cell Res* 1984; **154**: 38–52.
- [65]TSAO M-S, GRISHAM JW, NELSON KG. Clonal analysis of tumorigenicity and paratumorigenic phenotypes in rat liver epithelial cells chemically transformed *in vitro*. *Cancer Res* 1985; **45**: 5139–5144.
- [66]TSAO M-S, GRISHAM JW. Hepatocarcinomas, cholangiocarcinomas, and hepatoblastomas produced by chemically transformed cultured rat liver epithelial cells. *Am J Pathol* 1987; **127**: 168–181.
- [67]Van EYKEN P, SCIOT R, DESMET V. Intrahepatic bile duct development in the rat: a cyokeratin-immunohistochemical study. *Lab Invest* 1988; **59**: 52–59.
- [68]VASSY J, KRAEMER M, CHALUMEAU MT, FOUCHIER J. Development of fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Diff* 1988; **24**: 9–24.
- [69]WENNERBERG AE, NALESNIK MA, COLEMAN WB. Hepatocyte Parrafin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993; **143**: 1050–1054.



- [70]WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W. Propozycja polskiego mianownictwa w hematologii doświadczalnej. [w] Kawiak J., Osuchowska Z., Przełęcka A. [red] Ultrastruktura i funkcja komórki Tom 3 Komórki układu krwiotwórczego. część 1. Warszawa PWN 1989: 13–30.
- [71]YANG L, FARIS RA, HIXON DC. Characterization of a mature bile duct antigen expressed on a subpopulation of biliary ductular cells but absent from oval cells. *Hepatology* 1993; **18**: 357–366.
- [72]ZAJICEK G, SHAMIR R, NORDENBERG J, SIDY Y, ARBER N. Increased turnover of intrahepatic bile ducts induced by bromobenzene. *Digestive Diseases and Sciences* 1995; **10**: 730–733.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 27.07.1998 r,*

*Przyjęto: 12.11.1998 r.*

*Adres autora: 91-498 Łódź, ul. Studzińskiego 45 m. 16*



## KOMÓRKI MACIERZyste WĄTROBY I TRZUSTKI U ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA. CZĘŚĆ II

### STEM CELLS IN LIVER AND PANCREAS OF ANIMALS AND HUMANS. PART II

Małgorzata Tatiana MARSZAŁEK

Instytut Biochemii, Uniwersytet Łódzki

*Streszczenie:* Wyniki badań wskazują, że zarówno w wątrobie, jak i w trzustce dorosłych zwierząt znajdują się podobne komórki, o charakterze wielopotencjalnym i/lub bipotencjalnym, przypominające komórki wątroby embrionalnej. Sądzi się, że komórki te, nazwane komórkami owalnymi, są potomstwem komórek macierzystych. Komórki owalne odgrywają rolę nie tylko w rozwoju wątroby i trzustki, ale także w procesach regeneracyjnych i stanach nowotworowych obu narządów. Multipotencjalny charakter komórek owalnych zidentyfikowanych w trzustce, a także ich rola w histiogenezie gruczolakoraka przewodów trzustkowych potwierdzają sugerowane pokrewieństwo tych komórek z komórkami macierzystymi.

*Słowa kluczowe:* komórki macierzyste wątroby, rozwój wątroby, komórki owalne w wątrobie, komórki owalne w trzustce, rak.

*Summary:* Research results indicate that in the liver and pancreas of both animals and human there are similar multipotential and/or bipotential cells, which resemble liver embryonal cells. These findings suggest, that these cells, called oval cells, represent a progeny of the hepatic stem cell compartment. Oval cells play role not only in embryogenesis and fetal development but also in regenerating processes of liver and pancreas. These cells contribute also to the neoplastic transformation of both organs. Multipotency of oval cells of pancreas as well their role in histiogenesis of ductal type adenocarcinomas confirm closely relationship of this cells to stem cells.

*Key words:* liver stem cells, liver development, oval cells in liver, oval cells in pancreas, cancer.

## I. KONCEPCJA KOMÓREK MACIERZYSTYCH WĄTROBY

Od dawna przypuszczano, że w wątrobie prawidłowej dorosłych zwierząt obecne są pierwotne, niezróżnicowane komórki, które określano terminem: komórki ma-



cierzyste (ang. *stem cells*). Początkowo wskazywały na to jedynie wyniki badań wątroby patologicznej. Pierwsze sugestie na temat obecności komórek macierzystych w wątrobie poczynił w 1937 roku Kinosita, a następnie w 1952 roku Price i wsp. [cyt. wg poz. 39] na podstawie wyników badań hepatokarcynogenezy eksperymentalnej. W 1957 roku Popper i wsp. [cyt. wg poz. 60] zaobserwowali, że w efekcie 3–4-tygodniowej podaży karcynogenu, powodującego uszkodzenie mięszu wątroby, następuje wzmożona proliferacja komórek zlokalizowanych w pobliżu kanalików Heringa. Już wówczas uważano, że w wątrobie badanych zwierząt znajdują się niezidentyfikowane komórki, które w przypadku uszkodzenia hepatocytów umożliwiają odbudowę zniszczonego narządu, gdyż zachowują zdolność do wzmożonej proliferacji, a także do różnicowania zarówno w kierunku hepatocytów, jak i komórek nabłonkowych przewodów żółciowych (BDEs, ang. *bile duct epithelial cells*) – cholangiocyty [cyt. wg poz. 60]. W 1958 roku Wilson i Leduc [cyt. wg poz. 34, 71] również sugerowali obecność w wątrobie dorosłych myszy subpopulacji komórek niezróżnicowanych, o bardzo pierwotnych cechach, a jednocześnie zdolnych do dwukierunkowego różnicowania w przypadku uszkodzenia narządu karcynogenną dietą (ang. *indifferent cholangiole cells*). Twierdzili oni, że komórki takie zlokalizowane są w tzw. cholangiolach. Do niedawna, terminem tym określano kanaliki żółciowe łączące i przypuszczano, że łączą one kanaliki żółcionośne (kanaliki Heringa) z przewodnikami międzyzrazikowymi stanowiąc tzw. pośrednią drogę przepływu żółci. Obecnie przyjmuje się, że cholangiole są identyczne z kanalikami Heringa [40].

W latach 60. [cyt. wg poz. 24] na podstawie wyników badań hepatokarcynogenezy indukowanej związkami azowymi, wysunięto hipotezę, że zdolność do dwukierunkowego różnicowania cechuje także inne komórki wątroby, tzw. komórki owalne (ang. *oval cells*), które wykryto znacznie wcześniej [25]. Jednocześnie zaobserwowano, że komórki owalne, proliferujące w strefie okołowrotnej zrazika, wnikają w głąb parenchymy, przemieszczają się w stronę strefy centralnej zrazika i formują struktury rzekomo-kanalikowe, przypominające przewodniki żółcionośne. Wykazano, że ściany tych przewodów mają charakter hybrydowy, gdyż zbudowane są nie tylko z komórek owalnych, ale także z innych rodzajów komórek przypominających niedojrzałe cholangiocyty bądź hepatocyty. Wyniki badań sugerowały zatem bipotencjalny charakter komórek owalnych.

Początkowo głównym modelem badawczym proliferujących komórek owalnych hepatokarcynogenezy eksperymentalnej zaproponowany przez Solta i Farbera [65]. Podstawowe założenie tego modelu sprowadzało się do stwierdzenia, że w proces hepatokarcynogenezy zaangażowane mogą być tylko Nieliczne, zainicjowane hepatocyty, tj. te, które nabyły cechę oporności na czynniki karcynogenne (inicjatorem była *N,N*-dietylo-*N*-nitrozo-amina, DENA). W warunkach eksperymentu Solta-Farbera, gdy proliferację prawidłowych hepatocytów zahamowano toksyczną dawką *N*-acetylo-2-aminofluorenu (2-AAF), jedynymi proliferującymi komórkami powinny

być hepatocyty zainicjowane. Prawidłowe hepatocyty, choć stymulowane do proliferacji zabiegiem częściowej hepatektomii (PH, ang. *partial hepatectomy*) nie powinny przechodzić podziałów komórkowych. Wynik eksperymentu był jednak zaskakujący. Pierwszymi, proliferującymi komórkami były komórki owalne i komórki Ito [65, 66].

Z czasem do badań wprowadzono liczne modyfikacje modelu Solta-Farbera, określane w literaturze symbolem 2-AAF/PH, które polegały na ominięciu etapu inicjacji i/lub stosowaniu różnych dawek 2-AAF. W wątrobie zwierząt poddanych tej procedurze pierwsze zmiany komórkowe były podobne jak w przypadku zastosowania oryginalnej metody [2, 4, 20, 21, 27].

W toku kolejnych badań wykazano, że proliferacja komórek, także określanych terminem komórki owalne, następuje w przypadku uszkodzenia miększu wątroby nie tylko hepatokarcynogenami, ale także różnymi innymi czynnikami chemicznymi, które hamują lub opóźniają podziały komórkowe zróżnicowanych hepatocytów [36, 66]. Dlatego też sądzono, że zjawisko proliferacji komórek owalnych może stanowić alternatywną – wobec proliferacji typowej – formę regeneracji narządu, przebiegającą z zaangażowaniem komórek macierzystych lub komórek blisko z nimi spokrewnionych, za które uznawano komórki owalne.

Wyniki następnych badań wskazywały, że podczas hepatokarcynogenezy eksperymentalnej w wątrobie szczura obecne są także inne intensywnie proliferujące, małe komórki, które od komórek owalnych różnią się jedynie nieznacznie obecnością cech charakteryzujących hepatocyty [67]. Te komórki nazwano komórkami przejściowymi przewodów (ang. *transitional duct cells*), bowiem miały cechy pośrednie między hepatocytami a cholangiocytami. Sugerowano, że komórki te zlokalizowane są w kanalikach włosowatych żółciowych [67].

W toku dalszych badań wykazano, że podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą diety pozbawionej cholicy, a zawierającej 2-AAF, pierwszymi, intensywnie proliferującymi komórkami są jeszcze inne komórki, tzw. okołoprzewodnikowe (ang. *periductular cells*), a nie – jak wcześniej sugerowano – tzw. komórki przejściowe ani nie komórki kanalikowe zlokalizowane w kanalikach żółcionośnych (kanalikach Heringa). Komórki okołoprzewodnikowe ujawniono w tkance łącznej, poza ścianą kanalików żółcionośnych [58]. Komórki te były znacznie mniejsze od komórek przejściowych, nie tworzyły połączeń z hepatocytami, a także nie formowały w otaczającej je parenchymie struktur kanalikowych. Sell i Salman [58] zaproponowali, aby właśnie te komórki uznać za komórki macierzyste wątroby.

Jednocześnie wysunięto sugestię, że komórki owalne, których proliferacja w analizowanym modelu hepatokarcynogenezy następowała nieco później aniżeli w komórkach przejściowych, są komórkami potomnymi tych ostatnich bądź jeszcze innych komórek, spokrewnionych jednak z komórkami macierzystymi. Nie wykluczono zatem istnienia ogniwa pośredniego między komórkami macierzystymi a owalnymi, którym to ogniwem mogą być komórki przejściowe [58].

Z kolei Lenzi [37], na podstawie badań wątroby szczura podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą etioniny sugerował, że komórki owalne wywodzą się z komórek usadowionych w najmniejszych strukturach dróg żółciowych, choć nie sprecyzował, które to komórki. Nie wykluczył on jednak możliwości, że komórkami macierzystymi wątroby są komórki okołoprzewodzikowe (*periductular*).

W ten sposób powstawał zarys koncepcji zhierarchizowanego rozwoju wątrobowych komórek macierzystych. Jednocześnie pojawiło się pytanie: które z wymienionych komórek są „prawdziwymi” komórkami (ang. *true stem cells*), a które stanowią ich potomstwo, oraz jaką pozycję w tej hierarchii zajmują komórki owalne?

## II. KOMÓRKI OWALNE WĄTROBY

W literaturze naukowej często spotykamy się z próbą utożsamiania komórek owalnych z komórkami macierzystymi wątroby. Zarówno problem pochodzenia, jak i pokrewieństwa komórek owalnych z innymi komórkami, obecnymi w wątrobie, nie jest sprawą ostatecznie wyjaśnioną. Jedna grupa badaczy sugeruje, że komórki owalne są niezróżnicowanymi, niedojrzałymi cholangiocytami i stanowią wyłącznie jedną z licznych subpopulacji komórek wyściełających światło kanalików żółciowych (BDEs, ang. *bile duct epithelial cells*). W świetle tej teorii komórki owalne są prekursorami jedynie cholangiocytów, co eliminuje ich udział w takich procesach, jak powstawanie raka wątrobowokomórkowego (HCC ang. *hepatocellular carcinoma*) oraz raka przewodów żółciowych wewnątrzwątrobowych (CC, ang. *cholangiocarcinoma*). Z kolei inna grupa badaczy uważa, że podobieństwo komórek owalnych do komórek BDE nie jest jednak na tyle wyraźne, aby klasyfikować komórki owalne jako cholangiocyty, a różnice ujawnione pomiędzy tymi komórkami są na tyle ewidentne, aby traktować komórki owalne raczej jako odrębną grupę. Sugerują oni, że komórki owalne spokrewnione z populacją komórek macierzystych są ich komórkami potomnymi [5,18, 60].

Wyniki badań wskazują na ogromne zróżnicowanie w obrębie populacji określanej mianem „komórki owalne”. Wydaje się, że termin ten w literaturze naukowej jest stosowany dość nieprecyzyjnie i odnosi się do wielu różnych rodzajów spokrewnionych ze sobą pierwotnych komórek, których wspólną cechą jest duże jądro komórkowe o owalnym kształcie. Często spotykamy się też z próbą utożsamiania komórek owalnych z komórkami macierzystymi wątroby. Dlatego też podejmuje się próby ujednoczenia mianownictwa stosowanego w piśmiennictwie, a odnoszącego się do problematyki komórek macierzystych. Dabeva i wsp. [15] zaproponowali, aby komórki owalne określać terminem *facultative epithelial progenitor cells*, w odróżnieniu od embrionalnych komórek macierzystych, tj. ang. *primordial epithelial*



*stem cells*. Ostatnio Sell [62] zaproponował nowy sposób uprecyzjowania funkcjonującego mianownictwa. Zostanie on zaprezentowany w dalszej części pracy.

Wyniki licznych prac sugerują, że komórki owalne wykazują wiele cech wspólnych z pierwotnymi komórkami wątroby embrionalnej. Wskazuje na to ekspresja  $\alpha$ -fetoproteiny (AFP) i albuminy (ALB) wykazana w wielu, choć nie wszystkich, proliferujących komórkach owalnych [17, 20, 31, 57, 63, 67]. Także analiza porównawcza innych białek markerowych, które charakteryzują zarówno komórki wątroby płodowej, jak i komórki owalne, np. OC.2, OC.3, OV-6 (CK 14 i CK19), Hbd1, PGST, M<sub>2</sub>-PK, a także bipotencjalny charakter komórek owalnych, przejawiający się możliwością różnicowania ich w kierunku hepatocytów i cholangiocyty potwierdza tę tezę [4, 19, 20, 24, 33, 34, 70, 72].

Wykazane wzajemne podobieństwo tych dwóch grup komórek sugeruje ich bliskie pokrewieństwo. Dlatego też podobieństwo komórek owalnych do cholangiocyty, które również wywodzą się z komórek macierzystych (a bezpośrednio, może właśnie z komórek owalnych?), nie powinno zaskakiwać. Nie jest ono także równoznaczne z zaprzeczeniem teorii zakładającej możliwość różnicowania komórek owalnych w kierunku hepatocytów i cholangiocyty i nie wyklucza możliwości powstawania z komórek owalnych CC oraz HCC, zarówno typu anaplastycznego czy typu dobrze zróżnicowanego

Już dawno zwrócono uwagę, że wzmożona proliferacja komórek owalnych następuje podczas pierwszych etapów hepatokarcynogenezy eksperymentalnej indukowanej za pomocą jedynie takich czynników chemicznych, które hamują lub opóźniają proliferację hepatocytów. Z powodu szczególnych warunków środowiska, w których występuje zjawisko proliferacji komórek owalnych, wielu badaczy sądzi, że właśnie te komórki odpowiadają za odnowę uszkodzonego narządu. Sugeruje się, że komórki owalne, umiejscowione w strefie okołowrotnej zrazika, przechodzą podziały komórkowe, a następnie przemieszczają się w stronę żyły środkowej do strefy centralnej i różnicują, dając w efekcie hepatocyty lub cholangiocyty.

Z jednej strony, możliwość różnicowania komórek owalnych w kierunku hepatocytów tłumaczy ich udział w regeneracji narządu uszkodzonego przez czynniki chemiczne, z drugiej zaś angażuje je w histiogenezę pierwotnych nowotworów wątroby [5, 26, 21–24, 59–61]. Taka histiogeneza guza może mieć miejsce w przypadku akumulacji dostatecznej liczby mutacji w genomie komórek owalnych. O ile sam proces proliferacji nie musi być *per se* mutagenny, o tyle aktywna proliferacja tych komórek i procesy ich różnicowania na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy, mogą sprzyjać kolejnym wydarzeniom mutacyjnym. Problem ten nadal budzi jednak spore kontrowersje [30].

Potwierdzeniem sugerowanego, bliskiego związku wątrobowych komórek owalnych z komórkami macierzystymi może być obecność tych komórek w trzustce, organie mającym embriologicznie wspólne pochodzenie z wątrobą. Wydaje się,

że również i w trzustce mogą one być zaangażowane w powstawanie nowotworu, występującego jednak sporadycznie [35, 48–51].

### III. RÓŻNORODNOŚĆ PIERWOTNYCH KOMÓREK WĄTROBY W RÓŻNYCH STANACH PATOLOGICZNYCH – KOMÓRKI OWALNE A KOMÓRKI MACIERZYSTE

Wyniki prac wskazują, że niezróżnicowane, pierwotne komórki pojawiające się zarówno na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy, jak i w różnych stanach patologicznych, choć są bardzo różnorodne, to jednak łączy je pokrewieństwo.

Analizę zmian komórkowych następujących w wątrobie szczura podczas hepatokarcynogenezy indukowanej zgodnie z modelem Solta-Farbera przeprowadzili Novikoff i wsp. [43]. Wyniki badań ujawniły obecność kilku rodzajów pierwotnych komórek, w tym nowy ich rodzaj, którego nie opisano wcześniej.

Zaobserwowano, że w 2.–3. dniu po PH, w wątrobie szczura obecne są małe komórki, o średnicy 3–5  $\mu\text{m}$ , ulokowane u podstawy komórek nabłonkowych tworzących ściany nowo formowanych przewodów żółciowych – *duct like*. Komórki te nie miały połączenia ze światłem przewodu żółciowego i dlatego określono je terminem „komórki podstawowe” (ang. *duct basal cells*). Zidentyfikowane komórki, zlokalizowane w regionie wokół żyły wrotnej, przechodziły podziały komórkowe, o czym świadczy obecność białka PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) oraz fakt, że liczne komórki ułożone były parami. Znaczna była także proliferacja komórek tworzących nowe przewody żółciowe. Wyróżniono dwa rodzaje tych komórek: pierwszy, dominujący cechowało duże owalne jądro komórkowe z licznymi jąderkami, drugi – znacznie większe jądro komórkowe. Ekspresji PCNA nie zaobserwowano w zróżnicowanych hepatocytach, co potwierdza toksyczny wpływ 2-AAF na te komórki.

Od wymienionych rodzajów komórek przewodów żółciowych, komórki „podstawowe” (*basal cells*) różniły się brakiem ekspresji: CK19, antygeny O.C.2 komórek owalnych. Zidentyfikowane komórki zaliczono do form *blast-like*, gdyż cechowało je duże, owalne jądro komórkowe bez jąderek, z obwodowo rozmieszczoną chromatyną, a także brak cech wskazujących na zróżnicowanie tych komórek. Nie ujawniono bowiem obecności w cytoplazmie filamentów aktyny, a na powierzchni błony komórkowej mikrorzęsek, a także desmosomalnych połączeń z innymi komórkami.

Autorzy zachowują daleko idącą ostrożność w określeniu pozycji, jaką mogą zajmować komórki *blast-like basal cells* w hierarchii niezróżnicowanych komórek, pojawiających się na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy. Novikoff i wsp. [43] sugerowali, że komórki te mogą być odpowiednikiem wspomnianych już ko-

mórek okołoprzewodzikowych (*periductular*). Te zaobserwowano jednak, ich zdaniem, na nieco wcześniejszym etapie nowotworzenia. Przypuszczano zatem, że opisane komórki mogą stanowić ogniwo pośrednie pomiędzy komórkami macierzystymi a komórkami owalnymi, tj. tymi, które w swoich pierwszych badaniach opisał Farber [25].

Novikoff i wsp. [43] sugerowali także, że komórki owalne przechodzą proces stopniowego różnicowania, czego wyrazem jest pojawienie się w wątrobie szczura kolejnych dwóch grup komórek: komórki pierwszej wykazują pewne cechy cholangiocytozy, drugiej – hepatocytów. Te ostatnie komórki nazwano komórkami przejściowymi (ang. *transitional cells*). Cechuje je większe i bardziej okrągłe niż w cholangiocytozach jądro komórkowe z licznymi jąderkami; w obrębie cytoplazmy obserwuje się małe, sferyczne struktury o aktywności katalazowej, przypominające peroksosomy hepatocytów; na powierzchni błony komórkowej, od strony szczytowej (apikalnej), obecne są mikrorzęski, choć mniej liczne niż na cholangiocytozach. Komórki te łączą się z innymi komórkami za pomocą desmosomów. Autorzy przypuszczają, że opisane komórki są pierwszą, niedojrzałą formą hepatocytów, pojawiającą się podczas hepatokarcynogenezy indukowanej zgodnie z modelem Solta-Farbera. Podobne komórki, pojawiające się w wątrobie szczura podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą diety pozbawionej choliny, a zawierającej etioninę (*CDE diet*), zaobserwowali i opisali już wcześniej Novikoff i wsp. [42].

W świetle najnowszych badań wydaje się, że komórki „podstawowe” (*basal cells*), odkryte i opisane przez Novikoffa, są najbardziej pierwotną formą komórek zidentyfikowanych w wątrobie [62]. Czy one są komórkami macierzystymi? – pozostaje jednak do wyjaśnienia.

Wyniki ostatnich badań rozwoju embrionalnej wątroby szczura i wątroby szczura podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą diety z niedoborem choliny i ubogiej w etioninę (*CDE diet*), przeprowadzone przez Tee i wsp. [70] oraz Tian i wsp. [72], także wskazują, że komórki owalne mogą być komórkami potomnymi komórek rodzicielskich, które występują również w wątrobie zwierząt dorosłych. Wydaje się, że proliferujące komórki owalne przechodzą jednocześnie proces stopniowego dojrzewania, który stanowi rekapitulację rozwoju embrionalnego płodowych komórek wątroby. Wyrazem tego procesu jest pojawianie się w wątrobie badanych zwierząt kolejno różnych innych grup komórek, które – podobnie jak komórki owalne – także przypominają pierwotne komórki wątroby embrionalnej. Przypuszcza się, że są one potomstwem komórek owalnych. Cechuje je bardziej okrągłe niż w komórkach owalnych jądro komórkowe. Komórki te określono jako „podobne do komórek przewodowych” (ang. *duct-like cells*) [68, 69]. Cechy komórek owalnych i komórek *duct-like*, które proliferują w tym modelu hepatokarcynogenezy porównano z cechami komórek wątroby embrionalnej [70, 72].

Wyniki badań ujawniły, że komórkami proliferującymi najwcześniej i najliczniej są komórki owalne, zlokalizowane w strefie okołowrotnej zrazika wątrobowego.



Tee i wsp. [70] zidentyfikowali dwa rodzaje tych komórek. Pierwszy rodzaj cechują PGST i  $M_2$ PK – białka obecne w pierwotnych komórkach hepatoblastu 13-dniowego embrionu. Drugi rodzaj cechuje dodatkowo ekspresja markera cholangiocytołów – CK 19. Autorzy przypuszczają, że obydwie grupy komórek stanowią potomstwo bipotencjalnych komórek rodzicielskich. Jednocześnie wykazano, że proliferujące komórki owalne formują w wątrobie szczura pęcherzykowate struktury, przypominające pierwotne kanaliki żółciowe, które obserwowano w 18–19-dniowej wątrobie płodowej.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Tian i wsp. [72] potwierdziły, że w 3. dniu podawania diety CDE, pierwszymi proliferującymi komórkami są komórki owalne, które cechuje obecność ALB i  $M_2$ PK. Zdaniem autorów proliferujące komórki immunofenotypowo odpowiadają komórkom określanym jako *oval-shaped cells*, których obecność wykazano w hepatoblastie 13-dniowego embrionu szczura [72].

Komórki określane terminem *duct-like* pojawiają się w 3. tygodniu podawania karcynogennej diety CDE i formują w mięszu wątroby struktury przewodowe określane terminem *duct-like* – dla odróżnienia ich od istniejących wcześniej, prawidłowych przewodów żółciowych. W tej grupie wyróżniono trzy rodzaje komórek. Komórki te, oprócz markerów cholangiocytołów, tj. CK 19 i PGST, dodatkowo ujawniają ekspresję markerów hepatocytarnych, pojawiających się w 13. ( $M_2$ PK), 15. (L-PK) i między 16. a 19. dniem (L-GST) rozwoju wątroby szczura. I tak komórki pierwszego rodzaju, będące pod względem prezentowanych markerów, odpowiednikiem komórek wątroby 13-dniowego embrionu, cechuje obecność: CK 19, PGST i  $M_2$ PK; komórki rodzaju drugiego (odpowiednik komórek wątroby 15-dniowego embrionu) mają dodatkowo marker – L-PK, a trzeciego (odpowiednik komórek 16–19-dniowego embrionu) – jeszcze jeden marker – LGST [70]. Ponadto Tian i wsp. [72] wykazali zróżnicowanie pod względem ilości L-PK w obrębie komórek ujawniających ten enzym. Ich zdaniem niski poziom ekspresji tego białka odpowiada hepatocytom 15-dniowego embrionu szczura, wysoki – komórkom obecnym w 19. dniu rozwoju. Jednocześnie Tian i wsp. [72] wykazali, że w 2. tygodniu podawania diety CDE, również w komórkach prawidłowych przewodów żółciowych następuje podobny proces, tj. reekspresji markerów z okresu embrionalnego. Komórki te cechuje ponowna ekspresja albuminy i L-PK. Obydwa białka obecne są w komórkach przewodów żółciowych do 7. dnia po urodzeniu szczura. Ponadto wykazano, że po odstawieniu karcynogennej diety obydwie grupy komórek, tj. komórki owalne i *duct like*, mogą równoległe i równocześnie różnicować się w kierunku hepatocytów [70].

Wydaje się, że zmiany, które następują w proliferujących podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą diety CDE komórkach owalnych i w ich komórkach potomnych są podobne do zmian obserwowanych w komórkach – *oval-shaped cells* w czasie rozwoju wątroby [70]. Autorzy nie stawiają jednak

znaku równości między tymi dwoma rodzajami komórek. Sugerują jedynie, że komórki owalne, proliferujące na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy, wywodzą się z komórek *oval-shaped cells*, obecnych w wątrobie prawidłowej osobników dorosłych. Na podstawie przedstawionych wyników badań trudno ocenić, czy te dwa rodzaje komórek różnią się od siebie. Ewentualne różnice mogą dotyczyć stopnia ich zróżnicowania.

Wydaje się, że pierwotne komórki nabłonkowe, których obecność wykazano zarówno w prawidłowej, jak i chorobowo zmienionej wątrobie ludzkiej, także stanowią heterogenną populację. Roskams i wsp. [52] zaproponowali, aby zaklasyfikować je do trzech typów [52]. Pierwszy typ stanowią małe, niedojrzałe komórki o kształcie owalnym i owalnym jądrze komórkowym, nazwane komórkami progenitorowymi – rodzicielskimi. Na terenie ich cytoplazmy widoczna jest niewielka ilość organelli wewnątrzkomórkowych. Otoczone nieciągłą błoną podstawną, często towarzyszą hepatocytom, z którymi łączą się desmosomami. Analiza immunocytochemiczna wykazała, że komórki te cechuje obecność cytokeratyn CK19 i CK7 oraz antygenu OV-6, specyficznego dla komórek owalnych, rozpoznawanego przez przeciwciała skierowane przeciwko temu białku wyizolowanemu z komórek wątroby szczura. Sugeruje to, zdaniem autorów, wzajemne podobieństwo ludzkich i zwierzęcych komórek rodzicielskich. Drugi typ stanowią komórki określane jako *intermediate bile duct-like cells*. Mają cechy fenotypowe komórek typu pierwszego oraz dodatkowo, niektóre cechy specyficzne dla nabłonkowych komórek kanalików żółciowych, jak choćby palczaste wpuklenia błony komórkowej (ang., *interdigitations*). Komórki te, zlokalizowane w strukturach przewodów żółciowych, sąsiadują z cholangiocytami. Komórki trzeciego typu, występujące w pobliżu hepatocytów, charakteryzuje dodatkowo – oprócz cech komórek typu pierwszego – obecność światła włosowatego kanalika żółciowego. Te komórki określono jako *intermediate hepatocyte-like cells*. Autorzy sugerują, że wszystkie opisane komórki są ze sobą spokrewnione. Przypuszczają, że należące do ostatnich typów wywodzą się z komórek rodzicielskich, zaliczanych do pierwszej wymienionej grupy [52].

Z kolei Yavorkowki i wsp. [74] oraz Sell i wsp. [61] przeprowadzili analizę komórek proliferujących w wątrobie szczura po uszkodzeniu narządu alkoholem allilowym, który powoduje martwicę komórek położonych w strefie okołowrotnej zrazika. Zaobserwowali, że po uszkodzeniu wątroby, pierwsze, proliferujące komórki widoczne w 24. godzinie eksperymentu, zlokalizowane były w wewnątrzwrotnym (ang. *inraportal*). Komórki te są małe, mają duże, owalne jądro komórkowe bez jąderka, z obwodowo rozmieszczoną heterochromatyną. W obrębie cytoplazmy początkowo niewidoczne są żadne organella komórkowe. Słabo zaznaczoną siateczkę śródplazmatyczną można zaobserwować od 2. dnia procesu regeneracji. Opisane komórki określono jako komórki typu O [61, 74].

Od 3. dnia eksperymentu w uszkodzonej strefie zrazika pojawiają się kolejno inne rodzaje komórek, które zaklasyfikowano do trzech typów. Komórki typu I,

zlokalizowane w przestrzeni zatokowej strefy okołowrotnej zrazika, także są komórkami pierwotnymi. Cechuje je duże owalne jądro komórkowe, z obwodowo położonymi nielicznymi jąderkami i obwodowo rozproszoną heterochromatyną. W obrębie cytoplazmy widoczne są: nieliczne mitochondria, lizosomy i tonofilamenty, słabo wykształcony aparat Golgiego oraz siateczka śródplazmatyczna zarysowana nieco wyraźniej niż w komórkach typu O. Na błonie komórkowej znajdują się słabo rozwinięte mikrorzęski. Komórki łączą się wzajemnie ze sobą za pomocą desmosomów. Wydaje się, że z komórek typu I wywodzą się komórki typu II i III.

Komórki typu II, tzw. „podobne do komórek przewodów” (ang. *duct-like cells*) ulokowane są u podstawy nowoformowanych prawidłowych przewodów żółciowych. Cechuje je owalne lub okrągłe jądro komórkowe z niewielką ilością heterochromatyny i centralnie położonymi nielicznymi jąderkami. W obrębie cytoplazmy obserwuje się mitochondria, nieliczne lizosomy, słabo wykształcony aparat Golgiego i dobrze widoczną szorstką siateczkę śródplazmatyczną oraz liczne tonofilamenty. Na błonie komórkowej, w części szczytowej komórki, widoczne są mikrorzęski. Proliferyjące komórki typu II zaobserwowano wyłącznie w obrębie komórek przewodów żółciowych, z którymi łączą się desmosomami. Sell [61] zwraca uwagę na fakt, że w rozważanym typie regeneracji proliferujące komórki typu II nie formują struktur rzekomo-kanalikowych, obserwowanych w wątrobie zwierząt podczas hepatokarcynogenezy eksperymentalnej, a także nie uczestniczą w odbudowie zniszczonych hepatocytów. Nie wyklucza to jednak, że podobnie jak komórki typu I, zachowują cechę bipotencjalności, która nie jest jednak ujawniana w warunkach tego eksperymentu.

Komórki rodzicielskie hepatocytów typu III – określane jako: „komórki podobne do hepatocytów” (ang. *hepatocyte-like cells*) – są bezpośrednim potomstwem komórek typu I. W obrębie komórek typu III wyróżniono dwa podtypy: komórki „odnawiające” (ang. *restitutive*) i komórki „przejściowe” (ang. *transitional*), które układają się w blaszki wątrobowe. Wymienione podtypy komórek reprezentują kolejne stopnie zróżnicowania dojrzewających hepatocytów, i od 3. dnia po uszkodzeniu stanowią 90% komórek obszaru nekrotycznego. Oba rodzaje komórek cechuje stosunkowo duże jądro komórkowe o kształcie okrągłym lub nieregularnym, zawierające liczne jąderka oraz nierównomiernie rozproszoną heterochromatynę. Ponadto w komórkach stwierdza się szorstką siateczkę śródplazmatyczną lepiej rozwiniętą niż w komórkach typu II, liczne tonofibrylle oraz mikrorzęski zlokalizowane na błonie komórkowej części lateralnej komórki (*lateral*). Starsze formy komórek typu II, w porównaniu z młodszymi, cechuje większa liczba mitochondriów i lizosomów oraz lepiej wykształcony aparat Golgiego. Z komórek typu III powstają dojrzałe, zróżnicowane hepatocyty.



Na podstawie przeprowadzonej analizy Sell [61] sugeruje, że w omawianym modelu, w proces regeneracji wątroby zaangażowane są „prawdziwe” komórki macierzyste, które określił jako komórki typu O.

Sądzi on również, że w zależności od rodzaju uszkodzenia komórek wątroby, w proces regeneracji tego narządu zaangażowane mogą być różne typy komórek pierwotnych, zróżnicowanych w różnym stopniu. I tak w proces regeneracji wątroby występujący w różnych modelach hepatokarcynogenezy, np. w modelu Solta-Farbera, a także po uszkodzeniu narządu galaktozaminą, zaangażowane są zarówno „prawdziwe komórki macierzyste” określone przez niego jako typ O, jak i ich komórki potomne, tj. typu I, II i III. W różnych modelach liczebnie dominują jednak różne typy tych komórek. Odpowiedź komórek typu O zaobserwowano także podczas regeneracji wątroby po uszkodzeniu alkoholem allilowym, choć w tym przypadku wykazano bezpośrednio różnicowanie komórek typu I do typu III.

Jednocześnie Sell [62] zwraca uwagę na konieczność odróżnienia kilku rodzajów w obrębie grupy: „komórki owalne”. Zwłaszcza jest to konieczne w odniesieniu do komórek proliferujących podczas regeneracji w różnych stanach patologicznych oraz do komórek proliferujących podczas hepatokarcynogenezy eksperymentalnej. Na pierwszych etapach hepatokarcynogenezy w modelu Solta-Farbera widoczna jest najpierw proliferacja nielicznych komórek okołoprzewodzikowych (ang. *periductular*), nieco później proliferacja komórek owalnych rozprzestrzeniających się w kierunku strefy centralnej zrazika. Bardzo często komórki te formują kanaliki rzekome, które mogą jednak łączyć się z obecnymi w wątrobie prawidłowej kanalikami żółciowymi. Proliferujące komórki tworzą połączenia z hepatocytami i innymi komórkami owalnymi. Mogą różnicować się w kierunku cholangiocytozy (odpowiednik komórek typu II) i w kierunku hepatocytów (odpowiednik komórek typu III) oraz uczestniczyć w histiogenezie HCC i CC. Sell [62] uważa zatem, że odpowiednikiem komórek owalnych, proliferujących podczas hepatokarcynogenezy są komórki określone przez niego jako typu I i II i, być może formy pośrednie pomiędzy nimi. Jednocześnie przypuszcza, że komórki typu II zachowują bipotencjalny charakter. Choć w przypadku regeneracji wątroby uszkodzonej alkoholem allilowym cecha ta nie występuje, to jednak w czasie hepatokarcynogenezy jest ujawniana i dlatego proliferujące komórki powinny być odróżnione od komórek typu II.

Sell [62] uważa także, że komórki okołoprzewodzikowe stanowią potomstwo komórek typu O, ulokowanych w kanalikach żółciowych w obszarze wewnątrz-wrotnym (*intraportal*). Komórki typu O są przypuszczalnie odpowiednikiem komórek *basal cells* odkrytych i opisanych przez Novikoffa [43, 62].

Również wyniki badań nowotworu zawiązków wątroby – wątrobiaka płodowego (*hepatoblastoma*) potwierdziły obecność w wątrobie ludzkiej populacji komórek macierzystych lub/i rodzicielskich bądź ich komórek potomnych [53, 54]. Wątrobiak płodowy należy do stosunkowo rzadkich, pierwotnych guzów wątrobowokomór-

kowych. Najczęściej wykrywany jest u dzieci, natomiast sporadycznie u dorosłych [6, 13, 73]. W wątrobie pacjentów w wieku od 4. miesięcy do 5. lat wykazano istnienie kilku typów tego nowotworu [54]. Nowotwór określany mianem *small cell hepatoblastoma* ma charakter guza anaplastycznego i uformowany jest z bardzo małych komórek nabłonkowych (SEC, ang. *small epithelial cells*), sporadycznie zorganizowanych w pierwotne struktury przewodowe. Komórki guza charakteryzuje wysoki potencjał proliferacyjny i obecność CK19, CK18, CK8 i CK7. Kolejny, zidentyfikowany typ guza ma charakter nowotworu mieszanego, gdyż budują go dwa rodzaje komórek, które tworzą zmiany określane jako obszar o charakterze zarodkowym i obszar o charakterze płodowym. Komórki obszaru zarodkowego również są małe; cechuje je: zasadochłonna cytoplazma, wysoki stosunek jądro-cytoplazmatyczny, znaczny pleomorfizm jąder komórkowych i – podobnie jak komórki budujące *small cell hepatoblastoma* – wysoka aktywność mitotyczna. Wiele komórek tego obszaru ma: CK19, CK18 i CK8, znacznie mniej – CK7. Komórki obszaru o charakterze płodowym są znacznie większe, mogą być zorganizowane w beleczyki bądź gniazda lub skupiska, mają jasną cytoplazmę, a ich jądra komórkowe wykazują pleomorfizm jedynie sporadycznie. Liczne komórki ujawniają obecność CK 19, niewielka ilość komórek – CK8, a ekspresja CK7 zanika zupełnie.

Autorzy sugerują, że komórki nowotworowe, zidentyfikowane w różnych subtypach guza, wywodzą się z pierwotnych komórek rodzicielskich wątroby i z ich komórek potomnych, które przestały się różnicować w czasie rozwoju płodowego. Wydaje się, że komórki guza o typie mieszanym mogą wywodzić się nie z bipotencjalnych komórek rodzicielskich, ale z bardziej pierwotnych, wielopotencjalnych komórek wątroby płodowej [54]. Wykazano bowiem, że nieliczne komórki – *small cell hepatoblastoma* cechuje ekspresja białka CD-34 [53].

Ruck i wsp. [54] zwracają uwagę na fakt, że transformowane komórki SEC, zidentyfikowane w wątrobiaku płodowym, pod względem morfologicznym przypominają komórki odnalezione w nienowotworowych stanach patologicznych wątroby, takich jak: przewlekła reakcja przewodowa (ang. *chronic ductular reaction*) i guzkowa ogniskowa hiperplazja (ang. *focal nodular hyperplasia*) [16, 52, 55].

W kolejnych badaniach potwierdzono, że komórki SEC, oprócz markerów specyficznych dla komórek owalnych, np. OV-1 i OV-6, ujawniają także ekspresję markera hepatocytów, tj. albuminy, i markera cholangiocytów, tj. CK7 [55]. Zdaniem autorów, komórki SEC zarówno pod względem morfologicznym, jak i immunofenotypowym przypominają komórki owalne wątroby zwierząt [54, 55].

W świetle licznych badań wydaje się, że komórki owalne, zachowujące wiele cech: morfologicznych, fenotypowych i funkcjonalnych komórek macierzystych, mogą być ich komórkami potomnymi [1–4, 32]. Wykazano, że komórki owalne, proliferujące w odpowiedzi na uszkodzenie wątroby czynnikami hamującymi proliferację hepatocytów, cechuje ekspresja białek specyficznych dla krwiotwórczych komórek macierzystych: c-kit, CD34 i Thy-1 (antygen theta) [27, 44, 45]. Istotny

jest również fakt, że transkrypty białka c-kit i CD34 obserwowano w komórkach przed pojawieniem się AFP. W prawidłowej wątrobie szczura ujawniono niewielką ilość transkryptów białka CD34 w populacji nabłonkowych komórek przewodów żółciowych, co – zdaniem autorów – potwierdza sugerowany związek komórek rodzicielskich i komórek owalnych z tą populacją komórek.

W komórkach owalnych, aktywowanych do wzmożonej proliferacji podażą 2-AAF i zabiegiem PH lub podażą galaktozaminy wykazano jednoczesną ekspresję białka c-kit i jego liganda – czynnika wzrostu komórek macierzystych (SCF, ang. *stem cell factor*). Ekspresję obu białek ujawniono także w nielicznych komórkach przewodów żółciowych wątroby prawidłowej osobników dorosłych [28]. Ponadto zwrócono uwagę, że ekspresji białka CD34 w proliferujących komórkach owalnych towarzyszy wzrost ekspresji innego białka – L-selektyny, obserwowany jedynie we frakcji komórek nieparenchymalnych wątroby. Podobny wzór ekspresji tych białek ujawniono w czasie hemopoezy, a ich interakcja – być może – odgrywa rolę w procesie osiedlenia się komórek w mikrośrodoisku krwiotwórczym szpiku kostnego [44]. Z kolei przypuszcza się, że antygen Thy-1 odgrywa rolę w procesach adhezji komórek i że jest zaangażowany w mechanizmy ich rozpoznawania. Dlatego też autorzy sugerują, że obecność antygeny na komórkach owalnych może warunkować ich interakcję z komórkami Ito, które – jak wykazano – w czasie wzmożonej proliferacji komórek owalnych lokują się w ich bliskim sąsiedztwie [45].

#### IV. KOMÓRKI OWALNE W TRZUSTCE

Wyniki badań wskazują, że zarówno w wątrobie, jak i w trzustce znajdują się podobne komórki prekursorowe o charakterze wielopotencjalnym, ponieważ organy te mają wspólne embriologiczne pochodzenie. Rozwijają się z komórek ogonowego odcinka przedniego, zlokalizowanych w tym samym obszarze zwanym pierścieniem wątrobowo-trzustkowym (ang. *hepatopancreatic ring*) [8, 10, 11]. Wydaje się, że trzustkowe komórki macierzyste lub ich komórki potomne (stanowiące w trzustce funkcjonalny ekwiwalent komórek macierzystych), podobnie jak komórki wątrobowe, są aktywne nie tylko podczas życia embrionalnego, ale funkcjonują także u organizmów dojrzałych i odgrywają rolę w procesach regeneracji komórek endokrynych i egzokrynych [11].

Wyniki licznych prac wskazują, że w trzustce organizmów dojrzałych wysoki potencjał proliferacyjny cechuje komórki nabłonkowe przewodów trzustkowych i komórki owalne. Wydaje się, że w przypadku komórek nabłonkowych przewodów trzustki jest to uwarunkowane m.in. wysokim poziomem ekspresji antyapoptotycznego białka bcl-2. Wysoki poziom ekspresji tego białka ujawniono także w komórkach trzustki 15-dniowego embrionu [10, 11]. Wykazano, że u osobników



dorosłych komórki nabłonkowe przewodów trzustkowych nie uczestniczą w fizjologicznych procesach odnowy komórkowej, a jedynie w procesach regeneracyjnych zarówno części endokryennej, jak i egzokryennej. Trudno jednak powiedzieć, czy komórki te można traktować jako potomne formy „drzemiące” płodowych komórek macierzystych [9].

Komórkami „drzemiącymi” w trzustce są z pewnością komórki owalne. Już w latach 80. wykazano, że w przypadku rozległej martwicy mięszu trzustki (typ II martwicy), gdy zniszczeniu uległa znaczna część komórek pęcherzykowych (około 90%), komórki owalne mogą różnicować się w kierunku komórek nabłonkowych przewodów trzustkowych i hepatocytów. Zaobserwowano, że komórki nabłonkowe przewodów trzustkowych również różnicują się w kierunku hepatocytów. Obie grupy komórek nie różnicują się jednak w kierunku komórek utraconych, tj. komórek pęcherzykowych trzustki [35, 48–51]. Dlatego też, zdaniem Rao i wsp. [48], proces ten nie może być rozpatrywany jako rekapitulacja rozwoju komórek w okresie embrionalnym.

Martwicę typu II wywołuje się eksperymentalnie za pomocą diety zawierającej nietoksyczny czynnik chelatujący miedź – trien (czterochlorek trójetylenoczteroaminy, ang. *triethylenetetraamine tetrahydrochloride*), przez co dieta staje się uboższa w ten pierwiastek (CuD, ang. *copper-deficient diet*). Po pięciu tygodniach podawania tej diety, w uszkodzonej tkance obserwuje się – początkowo proliferację komórek zawierających duże, owalne lub wydłużone jądro komórkowe, a nieco później – formowanie przez te komórki struktur rzekomo-kanalikowych. Komórki proliferujące w trzustce także określono terminem: komórki owalne. Po 8. tygodniach eksperymentu, zwierzętom przywraca się podaż diety prawidłowej. W 16. tygodniu, w mięszu trzustki widoczne są liczne hepatocyty, które stanowią do 60% jej masy. Hepatocyty obecne w trzustce, pod względem fenotypowym podobne są do hepatocytów budujących wątrobę [48]. Cechuje je także ekspresja albuminy [46, 47, 56]. Podobne zmiany zaobserwowano także podczas hepatokarcynogenezy indukowanej za pomocą karcynogennej diety ubogiej w metioninę lub diety pozbawionej choliny, a wzbogaconej w etioninę (CDE) [34, 38, 46, 56].

Wyniki badań wskazują, że hepatocyty trzustkowe (ang. *pancreas hepatocytes*) wywodzą się z komórek nabłonkowych przewodów trzustkowych, a także z komórek leżących śródmięszkowo, tj. wokół przewodzików trzustkowych, i dlatego określanych jako „okołoprzewodzikowe” (*periductular*). Obydwie grupy komórek charakteryzuje duże, owalne jądro komórkowe, obecność antygenów komórek owalnych, tj. OC.2 i OC.3, przy czym komórki pierwszego rodzaju ujawniają ekspresję GGT. Obecnie trudno precyzyjnie wskazać, które z komórek trzustki reprezentują komórki macierzyste [14, 34, 48].

Komórki owalne, których proliferację obserwuje się na wczesnym etapie procesu regeneracji trzustki, wykazują cechy podobne do cech komórek owalnych proliferujących w wątrobie.

Stwierdzono, że na początkowym etapie proliferacji komórek owalnych w trzustce, pojawia się w nich czynnik wzrostowy komórek macierzystych. Sugeruje się, że czynnik ten, podobnie jak w przypadku komórek owalnych wątroby, może odgrywać rolę także w procesach proliferacji i różnicowania komórek owalnych trzustki [50].

W 5. tygodniu podawania diety ubogiej w miedź, na wczesnym etapie regeneracji trzustki, tj. zanim staje się możliwa identyfikacja pierwszych hepatocytów, w proliferujących komórkach owalnych ujawniono, stosując metodę hybrydyzacji *in situ*, obecność mRNA dla  $\alpha$ -fetoproteiny i albuminy [48]. W toku dalszych badań wykazano, że w 6. tygodniu eksperymentu w komórkach owalnych trzustki pojawia się mRNA  $\alpha_1$ -antytrypsyny ( $\alpha_1$ -AT), a w 8. mRNA glukozo-6-fosfatazy (G-6-P) [15]. Zdaniem Dabeva i wsp. [15], kolejność ekspresji wymienionych białek wskazuje, że komórki owalne trzustki w początkowym okresie proliferacji przechodzą proces różnicowania podobny do procesu obserwowanego w komórkach wątroby płodowej. Wydaje się, że proces ten zostaje jednak zatrzymany na pewnym etapie i różnicujące się komórki owalne trzustki nie stają się w pełni dojrzałymi hepatocytami. Świadczy o tym brak ekspresji genu aminotransferazy tyrozynowej i dehydratazy serynowej i jedynie słaba ekspresja genu *mdr 1b*. Geny te są aktywne w komórkach wątroby: w hepatocytach – w okresie postnatalnym, a w proliferujących komórkach owalnych – na etapie ich różnicowania w kierunku hepatocytów [15].

Dabeva i wsp. [15] wysunęli sugestię, że uwarunkowane jest to różnicami matriks zewnątrzkomórkowej wątroby i trzustki, co może mieć znaczący wpływ na ekspresję czynników transkrypcyjnych. Wyniki analizy porównawczej ekspresji czynników transkrypcyjnych w komórkach owalnych trzustki i w komórkach owalnych wątroby, indukowanych do proliferacji za pomocą galaktozaminy, przeprowadzone przez Dabeva i wsp. [15] potwierdziły to przypuszczenie.

Pierwszym czynnikiem transkrypcyjnym, którego mRNA wykryto w komórkach owalnych proliferujących zarówno w trzustce, jak i w wątrobie jest C/EBP $\delta$  – białko wiążące się z sekwencją wzmacniającą CCAAT (ang. *CCAAT/enhancer binding protein delta*). Wydaje się, że czynnik ten odpowiada za aktywację komórek owalnych do proliferacji [15]. Kolejne czynniki, tj. HNF-3 $\beta$ , HNF-3 $\gamma$  i C/EBP $\beta$ , obecne w komórkach owalnych proliferujących w trzustce i w wątrobie, odpowiadają przypuszczalnie za ukierunkowanie procesu różnicowania komórek owalnych.

Z kolei różnicowanie komórek owalnych w kierunku hepatocytów trzustkowych, manifestujące się obecnością  $\alpha$ -fetoproteiny i wątrobowo-specyficznego markera – albuminy i  $\alpha_1$ -antytrypsyny, jest poprzedzone w czasie ekspresją mRNA dla czynników transkrypcyjnych: C/EBP $\alpha$  i HNF-1 $\alpha$  (ang. *hepatocyte nuclear factor*), które przypuszczalnie warunkują ekspresję wymienionych białek. W sekwencjach promotorowych genów AFP, ALB i  $\alpha_1$ -AT zlokalizowane są miejsca wiązania C/EBP $\alpha$  i HNF-1 $\alpha$  [15, 50].

W komórkach owalnych trzustki nie wykazano natomiast ekspresji HNF-3 $\alpha$  [15, 50]. Trudno powiedzieć, czy ekspresja wymienionych białek nie wymaga obecności

tego czynnika, czy poziom jego ekspresji jest minimalny i dlatego trudny do wykrycia. Ekspresję tego białka wykazano w komórkach wątroby płodowej, w komórkach owalnych wątroby, proliferujących po podaniu 2-AAF i wykonaniu zabiegu PH, a także w komórkach owalnych wątroby, proliferujących po podaniu galaktozaminy [7, 15, 41]. Czynniki ten jest nieobecny w komórkach trzustki prawidłowej. Dabeva i wsp. [15] sugerują też, że brak ekspresji HNF-3 $\alpha$  w komórkach owalnych trzustki spowodowany jest innym składem matriks zewnątrzkomórkowej w wątrobie i w trzustce. Ekspresja tego czynnika jest bowiem ściśle kontrolowana przez czynniki matriks zewnątrzkomórkowej. Możliwe, że brak indukcji ekspresji HNF-3 odpowiada za zatrzymanie procesu różnicowania trzustkowych komórek owalnych, co manifestuje się z kolei różnicami w ekspresji białek wątrobowo-specyficznych [15]. Potwierdza to także wynik badania ekspresji HNF-4: w proliferujących komórkach owalnych trzustki – jest minimalna, w komórkach trzustki prawidłowej – obserwowana jest jedynie w komórkach części endokrynej, a wykazano ją w komórkach wątroby płodowej i w komórkach owalnych wątroby, których proliferację stymulowano za pomocą galaktozaminy bądź 2-AAF/PH [15, 41]. Przypuszcza się, że czynnik ten odpowiada za utrzymanie cech fenotypowych dojrzałych hepatocytów [15, 41].

Wykazano także, że komórki owalne trzustki, podobnie jak komórki owalne wątroby, cechuje brak ekspresji GGT, obecność antygenów OC.2, OC.3, OV.6 i ekspresja receptora MET [19, 33-35]. Wyniki badań wskazują, że proces formowania dobrze rozwiniętych – bo z wyraźnie zaznaczonym światłem, struktur przewodowych przez komórki owalne trzustki uwarunkowany jest działaniem czynnika wzrostu hepatocytów (HGF/SF, ang. *hepatocyte growth factor/scater factor*). Wydaje się, że czynnik ten odpowiada także za proces migracji komórek owalnych obserwowany w warunkach *in vitro* [35].

Problem, które z wymienionych na wstępie komórek trzustki stanowią populację komórek macierzystych trzustki: czy komórki nabłonkowe przewodów trzustkowych, czy komórki owalne? – nie został jeszcze ostatecznie rozstrzygnięty, choć wyniki ostatnich badań wskazują na komórki owalne. Wydaje się, że właśnie one pełnią rolę rodzicielską (progenitorową) również wobec komórek nabłonkowych przewodów trzustki [50].

O wielopotentjalnym charakterze komórek owalnych trzustki świadczy także ich udział w histiogenezie gruczolakoraka przewodów trzustkowych. Komórki owalne, które aktywowano do wzmożonej proliferacji za pomocą diety ubogiej w miedź, wyizolowane z trzustki, a następnie utrzymywane w warunkach *in vitro*, po 13. pasażu wykazują spontaniczną transformację. Wszczepione podskórnio lub dootrzewnowo myszom pozbawionym grasicy rozwijają dobrze zróżnicowany typ gruczolakoraka przewodów trzustkowych [35, 51]



## V. UWAGI KOŃCOWE

Przypuszcza się, że komórki owalne odgrywają rolę nie tylko w rozwoju wątroby i trzustki, ale także w procesach regeneracyjnych obu narządów. Zdaniem wielu badaczy, aktywna proliferacja komórek owalnych, obserwowana w sytuacji rozległego uszkodzenia mięszu wątroby, spowodowanego przez czynniki chemiczne, które uniemożliwiają regenerację narządu w efekcie procesu proliferacji hepatocytów, pozwala przypuszczać, że komórki owalne stanowią w wątrobie populację komórek tzw. „drzemiących”. Możliwość różnicowania komórek owalnych w kierunku hepatocytów może tłumaczyć ich udział w procesie regeneracji wątroby. Dlatego też wydaje się, że komórki owalne, aktywowane wyłącznie w tak szczególnych okolicznościach, są związane z populacją komórek macierzystych. Również miejsce występowania proliferujących komórek owalnych w strefie okołowrotnej pokrywa się z lokalizacją komórek wymienianych jako przypuszczalne komórki macierzyste. Do wyjaśnienia pozostaje jednak zarówno problem podobieństwa komórek owalnych do innych wymienionych rodzajów komórek, jak i problem ich wzajemnego pokrewieństwa, gdyż – być może – liczne komórki nazywane macierzystymi różnią się jedynie stopniem zróżnicowania [12, 64,70, ].

Multipotencjalny charakter komórek owalnych zidentyfikowanych w trzustce, a także ich rola w histogenezie gruczołakoraka przewodów trzustkowych potwierdzają przypuszczenie, że komórki te spokrewnione są z komórkami macierzystym. Być może w trzustce one właśnie stanowią odpowiednik komórek macierzystych. Na przestrzeni ostatnich lat komórki owalne budzą ogromne zainteresowanie m.in. ze względu na możliwość wykorzystania ich do leczenia wielu schorzeń metabolicznych wątroby metodą terapii genowej [3, 29].

## PIŚMIENNICTWO

- [1]ALISON MR, GOLDING M, SARRAF CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 1996; **29**: 373–402.
- [2]ALISON MR, GOLDING M, SARRAF CE, EDWARDS RJ, LALANI EN. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1182–1190.
- [3]ALISON MR, GOLDING M, SARRAF CE. Liver stem cells: when the going gets tough they get going. *Int J Exp Pathol* 1997; **78**: 365–381.
- [4]ALISON MR, GOLDING M, LALANI EN, NAGY P, THORGEIRSSON S, SARRAF CE. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol* 1997; **26**: 343–352.
- [5]ALPINI G, PHILIPS JO, LA RUSSO NF. [w] Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB Schachter DA, Schafritz DA [red.] The Liver: Biology and Pathobiology. New York: Raven Press Ltd 1994: 623–653.

- [6]BANNASCH P. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes. [w] Boyer JL, Ockner RK. [red] Progress in liver diseases. WB Saunders Company 1996: 161–197.
- [7]BISGAARD HC, NAGY P, SANTONI-RUGIU E, THORGEIRSSON SS. Proliferation, Apoptosis, and induction of hepatic transcription factors are characteristics of the early response of biliary epithelial (oval) cells to chemical carcinogens. *Hepatology* 1996; **23**: 62–70.
- [8]BOCK P, ABDEL-MONHEIM M, EGERBACHER M. Development of pancreas. *Microscopy Research and Technique* 1997; **37**: 374–383.
- [9]BOUWENS L, BRALET F, HEIMBERG H. Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 *in vivo* and after isolation and culture. *J Histochem and Cytochem* 1995; **43**: 245–253.
- [10]BOUWENS L, De BLAY E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J Histochem Cytochem* 1996; **44**: 943–951.
- [11]BOUWENS L, KLOPPEL G. Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arch* 1996; **427**: 553–560.
- [12]BRILL S, SIGAL S, ZVIBEL I, HOLST P, FIORINO A, REID LM. Phenotype and regulation of hepatic progenitor cells versus mature liver cells. *Advanced Drug Delivery Rev* 1995; **17**: 273–277
- [13]CARRIAGA MT, HENSON DF. Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer* (Supplement) 1995; **75**: 171–190.
- [14]CHEN J, TSAO M, DUGUID WP. Hepatic differentiation of cultured rat pancreatic ductal epithelial cells after *in vivo* implantation. *Am J Pathol* 1995; **147**: 707–717.
- [15]DABEVA M, HURSTON E, SCHAFRITZ DA. Transcription factor and liver-specific mRNA expression in facultative epithelial progenitor cells of liver and pancreas. *Am J Pathol* 1995; **147**: 1633–1648.
- [16]De VOS R, DESMET V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 1992; **140**: 1441–1450.
- [17]DEMPO K, CHISAKA N, YOSHIDA Y, KANEKO A, ONOE T. Immunofluorescent study on  $\alpha$ -fetoprotein-producing cells in the early stage of 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene carcinogenesis. *Cancer Res* 1975; **35**: 1282–1287.
- [18]DESMET VJ. Introduction. [w] Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB Schachter DA, Schafritz DA. [red.] The Liver: Biology and Pathobiology. New York: Raven Press Ltd 1994: 3–14.
- [19]DUNSFORD AD, SELL S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatoma. *Cancer Res* 1989; **49**: 4887–4893.
- [20]EVARTS RP, NAGY P, MARSDEN E, THORGEIRSSON SS. *In situ* hybridization studies on expression of albumin and  $\alpha$ -fetoprotein during the early stage of neoplastic transformation in rat liver. *Cancer Res* 1987; **47**, 5469–5475.
- [21]EVARTS RP, NAGY P, MARSDEN E, THORGEIRSSON SS. A precursor - product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; **8**, 1737–1740.
- [22]EVARTS RP, NAGY P, NAKATSUKASA H, MARSDEN E, THORGEIRSSON SS. *In vivo* differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 1989; **49**, 1541–1547.
- [23]EVARTS RP, NAKATSUKASA H, MARSDEN ER, HSIA CH, DUNSFORD HA, THORGEIRSSON SS. Cellular and molecular changes in the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Cancer Res* 1990; **50**: 3439–3444.
- [24]EVARTS RP, ZONGYI HU, NOBUHIKO OMORI, MASAKO OMORI, MARSDEN ER, THORGEIRSSON SS. Precursor - product relationship between oval cells and hepatocytes:

- comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 2143–2151.
- [25]FARBER E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3<sup>1</sup>-methyl-4-dimethylamioazobenzene. *Cancer Res* 1956; **16**: 142–148.
- [26]FARBER E. The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim Biophys Acta* 1980; **605**: 149–166.
- [27]FUJIO K, EVARTS RP, HU Z, MARSDEN ER, THORGEIRSSON SS. Expression on stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* 1994; **70**: 511–516.
- [28]FUJIO K, HU Z, EVARTS RP, MARSDEN ER, NIU CH, THORGEIRSSON SS. Coexpression of stem cell factor and c-kit in embryonic and adult liver. *Exp Cell Res* 1996; **224**: 243–250.
- [29]GERBER MA. Liver stem cells and development. *Lab Invest* 1993; **68**: 253–254.
- [30]GERLYNG P, GROTMOL T, STOKKE T, ERIKSTEIN B, SEGLEN PO. Flow cytometric investigation of a possible precursor-product relationship between oval cells and parenchymal cells in the rat liver. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 53–59.
- [31]GERMAIN L, NOEL M, GOURDEAU H, MARCEAU N. Promotion of growth and differentiation of ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res* 1988; **48**: 368–378.
- [32]GOLDING M, SARRAF C, LALANI EN, ALISON MR. Reactive biliary epithelium: the product of a pluripotential stem cell compartment? *Human Pathol* 1996; **27**: 872–884.
- [33]HIXON DC, ALLISON JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline deficient diet. *Cancer Res* 1985; **45**: 3750–3760.
- [34]HIXON DC, FARIS RA, THOKPSON NL. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiol* 1990; **58**: 65–77.
- [35]JEFFERS M, RAO SM, RULONG S, REDDY JK, SUBBARO V, HUDSON E, WOUDE GFV, RESAU JH. Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor-Met Signaling Induces Proliferation, Migration, and Morphogenesis of pancreatic oval cells. *Cell Growth & Diff* 1996; **7**: 1805–1813.
- [36]LEMIRE JM, SHIOJIRI N, FAUSTO N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991; **139**: 535–547.
- [37]LENZI R, LIU MH, TARSETTI F, SLOTT PA, ALPINI G, ZHAI WR, PARONETTO F, LENZEN R, TAVOLONI N. Histiogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. *Lab Invest* 1992; **66**: 390–402.
- [38]MAKINO T, USUDA N, RAO S, REDDY JK, SCARPELLI DG. Transdifferentiation of ductular cells into hepatocytes in regenerating hamster pancreas. *Lab Invest* 1990; **62**: 552–561.
- [39]MITAKA T, SATTTLER GL, PITOT HC, MOCHIZUKI Y. Characteristics of small cell colonies developing in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1992; **62**: 329–335.
- [40]MOSKALEWSKI S. Wątroba i pęcherzyk żółciowy. [w] Histologia. Ostrowski K [red] PZWL, Warszawa 1995: 662.
- [41]NAGY P, BISGAARD C, YHORGEIRSSON SS. Expression of hepatic transcription factors during development and oval cell differentiation. *J Cell Biol* 1994; **126**: 223–233.
- [42]NOVIKOFF PM, IKEDA T, HIXON DC, YAM A. Characterization of and interactions between bile ductule cells and hepatocytes in early stages of rat hepatocarcinogenesis induced by etionine. *Am J Pathol* 1991; **139**: 1351–1368.
- [43]NOVIKOFF PP, YAM A, OIKAWA I. Blast-like cell compartment in carcinogen-induced proliferating bile ductules. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1473–1492.
- [44]OMORI N, OMORI M, EVARTS RP, TERAMOTO T, MILLER MJ, HOANG TN, THORGEIRSSON SS. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult. *Hepatology* 1997; **26**: 720–727.



- [45]PETERSEN BE, GREENBERGER JS, MICHALOPOULOS GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 1998; **27**: 433–445.
- [46]RAO MS, SUBBARO V, REDDY JK. Induction of hepatocytes in the pancreas of copper-depleted rats following copper repletion. *Cell Diff* 1986; **18**, 109–117.
- [47]RAO MS, DWIVEDI RS, SUBBARAO V, USMAN MI, SCARPELLI DG, NEMALI MR, YELANDI A, THANGADA S, KUMAR S, REDDY JK. Almost total conversion of pancreas to liver in the adult rat: a reliable model to study transdifferentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156**: 131–136.
- [48]RAO MS, DWIEDIRS, YELANDI AV, SUBBARAO V, TAN X, USMAN MI, THANGADA S, NEMALI MR, KUMAR S, SCARPELLI DG, REDDY JK. Role of periductal and ductular epithelial cells of the adult rat pancreas in pancreatic hepatocyte lineage. *Am J Pathol* 1989; **134**, 1069–1086.
- [49]RAO MS, YELANDI AV, REDDY JK. Differentiation and cell proliferation patterns in rat exocrine pancreas: role of type I and type II injury. *Pathobiology* 1990; **58**: 37–43.
- [50]RAO MS, YUKAWA M, OMORI M, THORGEIRSSON SS, REDDY JK. Expression of transcription factors and stem cell factor precedes hepatocyte differentiation in rat pancreas. *Gene Expression* 1996; **6**, 15–22.
- [51]RAO MS, PAN J, SUBBARO V, REDDY JK. Spontaneously transformed rat pancreatic epithelial oval cells give rise to ductal type adenocarcinomas. *Int J Oncol* 1996; **9**: 235–239.
- [52]ROSKAMS T, De VOS R, DESMET V. Undifferentiated progenitor cells in focal nodular hyperplasia of the liver. *Histopathology* 1996; **28**: 291–299.
- [53]RUCK P, XIAO J-C, KAISERLING E. Immunoreactivity of sinusoids in hepatoblastoma: an immunohistochemical study using lectin UEA-1 and antibodies against endothelium-associated antigens, including CD34. *Histopathol* 1995; **26**: 451–455.
- [54]RUCK P, XIAO JCH, KAISERLING E. Small epithelial cells and the histiogenesis of hepatoblastoma. *Am J Pathology* 1996; **148**: 321–329.
- [55]RUCK P, XIAO J-C, PIETSCH T, von SCHWEINITZ D, KAISERLING E. Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathol* 1997; **31**: 324–329.
- [56]SCARPELLI DG, RAO MS. Differentiation of regenerating pancreatic cells into hepatocyte-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 2577–2581.
- [57]SELL S. Distribution of  $\alpha$ -fetoprotein and albumin-containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of *N*-2-fluorenylacetamide. *Cancer Res* 1978; **38**: 3107–3113.
- [58]SELL S, SALMAN J. Light- and electronmicroscopic autoradiographic analysis of proliferating cells during the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat induced by feeding *N*-2-fluorenylacetamide in a choline deficient diet. *Am J Pathol* 1984; **114**: 287–300.
- [59]SELL S, DUNSFORD HA. Evidence for the stem cell origin of hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *Am J Pathol* 1989; **134**: 1347–1363.
- [60]SELL S. Is there a liver stem cell. *Cancer Res* 1990; **50**: 3811–3815.
- [61]SELL S. Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocyte following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells* 1997; **15**: 378–385.
- [62]SELL S. Comparison of liver progenitor cells in human atypical ductular reactions with those seen in experimental models of liver injury. *Hepatology* 1998; **27**: 317–331.
- [63]SHINOZOUKA H, LOMBARDI B, SELL S, IAMMARINO RM. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res* 1978; **35**: 1092–1098.
- [64]SIRICA AE. Biliary proliferation and adaptation in furan-induced rat liver injury and carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1996; **24**, 90–99.
- [65]SOLT D, FARBER E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature* 1976; **263**: 702–703.

- [66]SOLT DB, MEDLINE A, FARBER E. Rapid emergence of carcinogen-induced hyperplastic lesions in a new model for the sequential analysis of liver carcinogenesis. *Am J Pathol* 1977; **88**: 595–610.
- [67]TCHIPYSHEVA TA, GUELSTEIN VI, BANNIKOV GA.  $\alpha$ -fetoprotein containing cells in the early stages of liver carcinogenesis induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene and N-2-acetylaminofluorene. *Intern J Cancer* 1977; **20**, 388–393.
- [68]TEE LBG, SMITH PGJ, YEOH GCT. Expression of alpha, mu and pi class glutathione S-transferases in oval and ductal cells in liver of rats placed on a choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1992; **13**: 1879–1885.
- [69]TEE LBG, KIRILAK Y, HUANG W-H, MORGAN RH, YEOH GCT Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient ethionine-supplemented diet. *Carcinogenesis* 1994; **15**: 2747–2756.
- [70]TEE LBG, KIRILAK Y, HUANG W-H, SMITH PGJ, MORGAN RH, YEOH GCT. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 1996; **17**: 251–259.
- [71]THORGEIRSSON SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* 1993; **142**: 1331–1334.
- [72]TIAN YW, SMITH PG, YEOH GC. The oval-shaped cell as a candidate for a liver stem cell in embryonic, neonatal and precancerous liver: identification based on morphology and immunohistochemical staining for albumin and pyruvate kinase isoenzyme expression. *Histochem Cell Biol* 1997; **107**: 243–250.
- [73]YANO H, IEMURA A, HARAMAKI M, MOMOSAKI S, OGASAWARA S, HIGAKI K, KOJIRO M. A human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell line KMCH-2 that shows features of hepatocellular or cholangiocarcinoma under different growth conditions. *J Hepatol* 1996; **24**: 413–422.
- [74]YAVORKOVSKY L, LAI E, ILIC Z, SELL S. Participation of small intra portal „stem” cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* 1995; **21**: 1702–1712.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 27.07.1998 r,*

*Przyjęto: 12.11.1998 r.*

*Adres autora: 91-498 Łódź, ul. Studzińskiego 45 m. 16*





## ROLA NIEKTÓRYCH RECEPTORÓW I SZLAKÓW TRANSDUKCJI SYGNAŁU W PRAKTYWACJI NEUTROFIŁA PRZEZ TNF- $\alpha$ \*

### ROLE OF SOME RECEPTORS AND SIGNAL TRANSDUCTION WAYS IN TNF- $\alpha$ -PRIMING OF NEUTROPHIL

Jarosław PAŚNIK\*, Piotr BUKOWSKI\*, Robert PIETRUSZYŃSKI\*\*

\*Zakład Patofizjologii i \*\*Zakład Immunologii Klinicznej  
Katedry Nauk Patofizjologicznych Wojskowej Akademii Medycznej, Łódź

*Streszczenie:* Neutrofile są pierwszymi komórkami docierającymi do tkanek w odpowiedzi na czynnik zapalny. Działają ochronnie; chociaż uwalnianie wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i rodników tlenowych może prowadzić do uszkodzenia tkanek. Nadreaktywność neutrofilii może zależeć od nadmiernej ich praktywacji w odpowiedzi na małe stężenia czynników zapalnych (praktywatorów). Praktywacja przez TNF- $\alpha$  zwiększa odpowiedź neutrofilii na następny czynnik aktywujący przez zwiększenie adhezji, wybuchu oddechowego i degranulacji. Mechanizm zjawiska praktywacji nie jest jeszcze poznany. Praktywacja neutrofila może być indukowana w wyniku reakcji ligandu (praktywatora) ze swoistym receptorem. Połączenie się specyficznego receptora z ligandem rozpoczyna kaskadę biochemicznych zjawisk powodującą przenoszenie sygnału i doprowadzającą do odpowiedzi komórki. W niniejszej pracy dokonano przeglądu danych na temat współzależności między receptorami i przekaźnikami informacji doprowadzającymi do odpowiedzi praktywowanej komórki.

*Słowa kluczowe:* neutrofile, TNF- $\alpha$ , praktywacja, molekuly adhezyjne, kinazy tyrozynowe, kinaza białkowa C, przenoszenie sygnału.

*Summary:* Neutrophils are the first cells that migrate into tissues in response to invading pathogens. These cells are protective, but extracellular release of proteolytic enzymes and oxygen radicals may lead to tissue destruction. Neutrophil hyperactivity may depend on abnormal priming of the cells in response to low concentrations of inflammatory mediators (primers). TNF- $\alpha$ -mediated priming enhances the neutrophils' ability to respond to a secondary agonist, with increased adhesion, respiratory burst, and degranulation. The mechanisms involved in neutrophil priming are unknown. Neutrophil preactivation can be triggered by ligands (primers) for specific membrane receptors. Occupancy of specific receptors

begins the neutrophils' response which is propagated and amplified by a biochemical cascade of transduction reactions. In our review some of the relationship between these transduction events and the specific receptor system are briefly considered.

*Key words:* neutrophils, TNF- $\alpha$ , priming, adhesion molecule, tyrosine kinases, protein kinase C, signal transduction.

## WSTĘP

Neutrofil pełni szczególnie ważną rolę we wczesnej odpowiedzi na inwazję mikroorganizmów w ustroju. Jest pierwszą komórką przybywającą do miejsca toczącego się zapalenia. Tworzy „oddział szybkiego reagowania”, który jako pierwszy stawia czoło cząstkom inwazyjnym [79]. Neutrofil ma umiejętność wykrywania gradientu chemotaktycznego, może adherować do powierzchni komórek endotelialnych, migrować z krążenia do tkanek objętych procesem zapalnym, rozpoznawać i fagocytować cząstki uprzednio opsonizowane. Po aktywacji jest zdolny do destrukcji pochłoniętego materiału, degranulacji i uwalniania zawartości ziarnistości wewnątrzkomórkowych i produktów metabolizmu tlenowego oraz do wyzwiania tlenowych i pozatlenowych mechanizmów zabijania mikroorganizmów [67].

Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że odpowiedź neutrofila na czynniki stymulujące jest zdecydowanie większa po uprzedniej preaktywacji tej komórki z takimi czynnikami, jak: TNF- $\alpha$ , LPS, PAF, LTB<sub>4</sub> i inne metabolity kwasu arachidonowego, a także czynniki wzrostowe: GM-CSF, G-CSF oraz IL-8 [28, 32]. Zjawisko, w którym dany czynnik – zwykle działający w bardzo małych dawkach – zwiększa odpowiedź funkcjonalną neutrofila na następny, swoisty czynnik stymulujący, nosi miano preaktywacji (od ang. *priming*) [11, 28]. W rezultacie preaktywacji, zwanej także uzbrajaniem, neutrofile preaktywowane na przykład z TNF- $\alpha$  wykazują wzmożoną wielokierunkową odpowiedź na peptyd chemotaktyczny (fMLP). Badania wielu autorów potwierdziły, że neutrofil preaktywowany przez TNF- $\alpha$ , a następnie stymulowany fMLP charakteryzował się zdecydowanie większym wybuchem oddechowym, większą ekspresją cząsteczek adhezyjnych, wzmożonym uwalnianiem ziarnistości i wzmożoną fagocytozą w porównaniu do neutrofila nie poddanego preaktywacji [5, 11, 27].

Zjawisko preaktywacji neutrofilu przez TNF- $\alpha$  jest korzystne ze względu na potencjalnie większe właściwości bójcze tych komórek w stosunku do bakterii, pasożytów, grzybów itp. [30, 79]. Jednocześnie zaburzenia w autokontroli tego procesu mogą prowadzić do destrukcji tkanek obwodowych przez neutrofile preaktywowane po zadziałaniu swoistego stymulatora [4, 42]. Dlatego istotne wydaje się poznanie mechanizmów tego zjawiska, a także poszukiwanie metod jego regulacji.

W dalszej części pracy przeanalizowano doniesienia dotyczące roli niektórych receptorów neutrofilii i szlaków transdukcji sygnału w zjawisku preaktywacji komórki przez TNF- $\alpha$ .

## ROLA NIEKTÓRYCH RECEPTORÓW NEUTROFIŁI

### Receptor dla fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaniny)

Czynniki chemotaktyczne, takie jak n-formylowane oligopeptydy, aktywują chemotaksję neutrofilii. Wpływają także stymulująco na inne funkcje tych komórek: degranulację, wybuch oddechowy czy też adhezję i adherencję. Neutrofile mają specyficzne dla tych oligopeptydów receptory. Połączenie fMLP z receptorem na neutrofilu prowadzi do zmian w cytoskieletu komórki i jej elementów kurczliwych. Ostatecznym efektem zmian rozmieszczenia receptorów i zmian kształtu komórki jest jej gotowość do chemotaksji czy też adherencji [67].

Receptory dla peptydu chemotaktycznego – fMLP wydają się odgrywać istotną rolę w mechanizmie preaktywacji. Są to integralne glikoproteiny błony komórkowej o masie cząsteczkowej 50–70 kDa [2, 62]. Jednym z możliwych mechanizmów zjawiska preaktywacji jest mobilizacja receptorów dla fMLP na powierzchni komórki. Receptory te na neutrofilach mogą występować przynajmniej w dwóch, a według niektórych autorów w trzech stanach, różniących się powinowactwem do ligandu [2, 82]. W zależności od stanu pobudzenia komórki dominuje jeden z typów receptora, który może przechodzić w inny [82]. Połączenie fMLP z receptorem na neutrofilu wzbudza jego odpowiedź: nasila adhezję, chemotaksję, degranulację i produkcję wolnych rodników tlenowych [40, 62]. Prawdopodobnie poszczególne typy receptorów dla czynnika chemotaktycznego odpowiadają za konkretne funkcje neutrofila. Jeden z podtypów tego receptora pośredniczy w oddziaływaniu ze składowymi szkieletu komórki i zdaniem niektórych autorów ma największe znaczenie dla aktywności lokomocyjnych neutrofila [77, 82]. W warunkach eksperymentalnych fMLP w niskich stężeniach ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  M) bardziej wpływa na odpowiedź chemotaktyczną granulocytów, natomiast w stężeniach wyższych ( $>10^{-6}$  M) „przełącza się” na aktywację wybuchu oddechowego i degranulacji [64, 82]. Paradoksalny efekt zablokowania chemotaksji przy wysokich stężeniach peptydu chemotaktycznego tłumaczy się topografią wiązań ligandu z receptorem. Stwierdzono, że fMLP w niskich stężeniach wiąże się jedynie z receptorami na „przednim” biegunie komórki, natomiast ten sam peptyd w wysokich stężeniach wiąże się równomiernie z receptorami na całej powierzchni komórki [44]. Rezultatem równomiernego wysycenia receptorów po zastosowaniu wysokich dawek fMLP jest wzmożona aktywacja wybuchu tlenowego i niewielki wpływ chemoatraktantu na aktywność lokomocyjną neutrofilii. Niskie stężenia peptydu chemotaktycznego prowadzą do redystrybucji receptorów



dla fMLP na jednym biegunie komórki i do wzrostu chemotaksji. W badaniach opublikowanych ostatnio wykazano, że aktywacja neutrofilów przez fMLP w niskich stężeniach prowadzi do analogicznych zmian rozmieszczenia cząsteczek adhezyjnych CD18 [29]. Zdaniem autorów, przesunięcie tych cząsteczek na jeden z biegunów komórki jest charakterystyczne dla komórek preaktywowanych – zdolnych do wzmożonej odpowiedzi na następny czynnik stymulujący. Słuszność takiej hipotezy mogą potwierdzić wcześniejsze badania, w których wykazano, że niskie dawki fMLP mogą działać jak czynniki preaktywujące [46].

Wyniki badań innych autorów potwierdzają, że działanie fMLP zależne jest od liczby specyficznych dla niego receptorów na powierzchni komórki. McLeish i współpracownicy [53] wykazali, że preaktywacja neutrofilów przez TNF- $\alpha$  prowadziła do trzykrotnego wzrostu liczby receptorów dla fMLP na pojedynczej komórce. Towarzyszył temu wzrost ekspresji podjednostek  $\alpha_{i2}$  i  $\alpha_{i3}$  białek G, związanych z receptorami dla chemoatraktantu na preaktywowanych neutrofilach. Zdaniem tych autorów, preaktywacja neutrofilów przez TNF- $\alpha$  zależna jest od pobudzenia receptorów dla fMLP, natomiast dla właściwego jej przebiegu niezbędne są klasyczne drogi przenoszenia sygnału z udziałem białek G.

### Receptory dla TNF- $\alpha$

Dyskutowana jest rola receptorów dla TNF- $\alpha$  w zjawisku *priming*. Efekt działania biologicznego TNF- $\alpha$  zależny jest od łączenia się tego czynnika ze specyficznymi receptorami obecnymi na neutrofilach. TNF- $\alpha$  wiąże się z dwoma typami receptorów o masach cząsteczkowych 55 kDa i 75 kDa; określanymi jako p55 (TNFR typ I, TNFR $\alpha$ ) oraz p75 (TNFR typ II, TNFR $\beta$ ) [7]. Oba typy receptorów są glikoproteinami. Wykazano duże podobieństwo sekwencji aminokwasowej obu receptorów [7]. Niewiele wiadomo natomiast na temat ich znaczenia biologicznego. Możliwy jest różny mechanizm transdukcji sygnału za pośrednictwem obu receptorów, co może sugerować, że biologiczna funkcja obu typów receptorów jest odmienna [69]. W badaniach Della Bianca i współpracownicy wykazano, że oba typy receptorów uczestniczą w procesie fagocytozy. Podczas gdy do przenoszenia sygnału konieczny jest receptor p55, to za właściwe łączenie swojego ligandu z tym receptorem odpowiedzialny jest receptor p75 [17]. Menegazzi i współpracownicy [54] potwierdzili udział obu typów receptorów w wybuchu tlenowym. Opisano decydującą rolę receptora p55 w indukowanym przez TNF- $\alpha$  zwiększeniu ekspresji receptorów integrynowych na neutrofilach [57].

Działanie preaktywujące TNF- $\alpha$  na neutrofile skłoniło badaczy do określenia roli obu typów receptorów w zjawisku *priming*. W badaniach Niwa i współpracownicy wykazano, że zmniejszeniu zdolności wiązania ligandów przez receptory dla TNF- $\alpha$  na neutrofilach tkankowych towarzyszyło zmniejszenie efektów preaktywacji [59]. Richter i współpracownicy stwierdzili, że oba typy receptorów uczestniczą w indukowanej

przez TNF- $\alpha$  syntezie reaktywnych form tlenu przez adherujące neutrofile [65]. Balazovich i współpr. porównywali wpływ przeciwciał przeciw receptorom p75 i p55 na uwalnianie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez ludzkie neutrofile stymulowane przez fMLP [6]. Największe zahamowanie obserwowano po zastosowaniu jednocześnie obu przeciwciał. W najnowszych badaniach Zeman i współpr. wykazali, że zastosowanie przeciwciała Htr-9, będącego swoistym agonistą receptora p55 i naśladującego działanie TNF- $\alpha$ , znacznie zwiększało chemiluminescencję neutrofilów stymulowanych przez fMLP [81]. Inne przeciwciało MR-2, wykazujące działanie agonistyczne na receptor p75, zmniejszało spoczynkową i stymulowaną fMLP chemiluminescencję neutrofilów, a także wpływało hamująco na efekt działania TNF- $\alpha$  i agonisty receptora p55. Wyniki tych badań wydają się sugerować, że w mechanizmie preaktywacji neutrofilów przez TNF- $\alpha$  szczególnie istotny jest receptor p55. Obserwacje te może potwierdzać fakt, że TNF- $\alpha$  indukuje internalizację tego receptora w neutrofilach [60]. Z drugiej strony obserwowane przez Porteu i współpr. selektywne złuszczenie receptora p75 pod wpływem TNF- $\alpha$  może świadczyć o roli także tego receptora [61]. Złuszczonego receptora może bowiem przez kompetycyjne blokowanie wiązania TNF- $\alpha$  z receptorami komórkowymi, osłabiać efekt biologicznego działania tego czynnika. Ward i współpr. wykazali, że zdolność TNF- $\alpha$  do wzmacniania wybuchu oddechowego neutrofilów stymulowanych fMLP zmniejsza się w miarę wzrostu stężenia rozpuszczalnych form receptora p75 w osoczu krwi obwodowej [74, 75]. Takie protekcyjne działanie złuszczonego receptora p75 może zapobiegać nie kontrolowanej reakcji neutrofilów na TNF- $\alpha$ . Receptor ten może więc odgrywać rolę regulacyjną w zjawisku preaktywacji. Brak działania ochronnego może nieść określone skutki kliniczne, może na przykład przyczyniać się do wystąpienia chorób autoimmunizacyjnych [4, 74, 75].

### Receptory integrynowe

W wyniku preaktywacji neutrofila przez TNF- $\alpha$  dochodzi do wzmożonej jego odpowiedzi na bodziec stymulujący: zwiększonej adhezji do komórek endotelialnych, diapedezy i fagocytozy czy też wybuchu tlenowego. Do spełnienia tych funkcji potrzebna jest ekspresja na powierzchni komórki receptorów integrynowych [67, 81].

Integryny są glikoproteinami. Cząstki te składają się z dwóch niekowalencyjnie połączonych heterodimerów  $\alpha\beta$ . Dotąd poznano 14 odmiennych podjednostek  $\alpha$  i 8 podjednostek  $\beta$  mogących teoretycznie tworzyć około 100 heterodimerów. Na ludzkich neutrofilach zidentyfikowano 3 integryny, ich wspólną cechą jest łańcuch  $\beta_2$  [50].

LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2; CD11a/CD18) wykazuje ekspresję na monocytach, makrofagach; jego agonistami na komórkach tarczowych są ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3. Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2; CD11b/CD18, CR3) jest obecny na monocytach i granulocytach; rozpoznaje

wiele egzogennych i endogennych substancji, takich jak: iC3b (fragment powstający po aktywacji dopełniacza drogą klasyczną lub alternatywną), ICAM-1, fibrynogen, zymosan, *E. coli* p150,90 ( $\alpha X\beta 2$ , CD11c/CD18, CR4) wykazuje ekspresję na makrofagach, monocytach, granulocytach, aktywowanych komórkach B i niektórych populacjach komórek T; jego agonistami są ICAM-1, ICAM-2 i ICAM-3 [37, 9].

Receptory integrynowe występują na powierzchni granulocyta w dużych ilościach. Pobudzenie neutrofilii przez fMLP, PMA, C5a, IL-8, czy też PAF powoduje szybki i znaczny wzrost ekspresji tych receptorów (zwłaszcza CD11b i CD11c) na powierzchni komórek. W spoczynkowych komórkach stwierdza się około 6–7 tysięcy molekuł kompleksu CD11/CD18, a po stymulacji liczba ta zwiększa się często kilkudziesięciokrotnie [20, 78].

Receptorom integrynowym szczególne znaczenie przypisuje się w procesie adhezji neutrofilii do komórek endotelialnych [9,78]. Podkreślany jest także ich udział w produkcji rodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru przez neutrofile, w chemotaksji i reakcji ADCC, a także w procesie fagocytozy [9, 78]. Jak wykazano w ostatnich badaniach, nie wykluczony jest także udział cząstek adhezyjnych w apoptozie neutrofilii [73].

Receptory integrynowe zlokalizowano w ziarnistościach azurofilnych i specyficznych [3, 12]. Preaktywacja neutrofilii przez TNF- $\alpha$  doprowadza do przesunięcia tych ziarnistości w kierunku powierzchni komórki [13]. Wykazano, że preaktywacja neutrofilii przez TNF- $\alpha$  zwiększa liczbę poszczególnych adhezyn (LFA-1, CR3, gp150, 90) na ich powierzchni, zwiększa adhezję do komórek endotelialnych i do powierzchni biologicznych Gamble i wspólr. [31].

Czy możliwy jest udział cząsteczek adhezyjnych w preaktywacji komórek przez TNF- $\alpha$ ? Wiele wcześniejszych doniesień może świadczyć o kooperacji czynnika preaktywującego (TNF- $\alpha$ ) i kompleksu adhezyjnego w regulacji tego zjawiska. W komórkach izolowanych od osób z zespołem LAD (od ang. *leukocyte adhesion deficiency*), w których brak jest receptorów  $\beta_2$ , nie obserwowano efektu wzmocnienia wybuchu tlenowego pod wpływem preaktywacji przez TNF- $\alpha$  [72]. Komórki adherujące do powierzchni biologicznych w warunkach eksperymentalnych reagują odmiennie na bodźce, w porównaniu do komórek zawieszonych w płynie doświadczalnym [45, 63]. Wybuch tlenowy adherujących neutrofilii, uprzednio preaktywowanych przez TNF- $\alpha$  jest zdecydowanie wyższy w porównaniu do komórek zawieszonych w medium doświadczalnym [6, 16].

W komórkach spoczynkowych duże ilości cząsteczek adhezyjnych magazynowane są w ziarnistościach specyficznych i azurofilnych; gdzie obecne są także składowe NADPH-oksydazy – enzymu odpowiedzialnego za wybuch oddechowy neutrofilii [68]. Po stymulacji neutrofilii, preaktywowanych uprzednio przez TNF- $\alpha$  obserwuje się wzmożoną degranulację i wybuch tlenowy [13, 19, 80]. W sposób dotychczas niewyjaśniony *priming* ułatwia degranulację ziarnistości neutrofilii i zwiększa uwal-



nianie czynników istotnych dla jego funkcji, takich jak: receptory integrynowe czy też składowe NADPH-oksydazy.

Modelem doświadczalnym do badania funkcji cząsteczek adhezyjnych jest technika ich krzyżowego wiązania (od ang. *cross-linking*). Polega na łączeniu receptorów na komórkach, preinkubowanych z awidyną, z ligandem za pomocą przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z biotyną. Użycie przeciwciała podstawowego sprzężonego z biotyną i awidyny znakowanej fluorochromem zapewnia wysoką czułość pomiaru [45]. Taki typ łączenia receptora naśladuje naturalne interakcje ligand-receptor i indukuje aktywację cząsteczek adhezyjnych [45]. Wiązanie receptorów adhezyjnych za pomocą techniki *cross-linking* prowadzi w neutrofilach do wzrostu uwalniania wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ , degranulacji ziarnistości azurofilnych, polimeryzacji aktyny, uwalniania LTB<sub>4</sub> i nieznacznego wzrostu chemiluminescencji [45]. Krzyżowe wiązanie łańcucha  $\beta$  kompleksu CD11/CD18 zwiększa efekt praktywacji przez TNF- $\alpha$  mierzony np. poziomem wybuchu tlenowego [37]. Ostatnie doniesienia wskazują, że aktywacja receptora CD18 na neutrofilach *per se* wywołuje zjawisko ich praktywacji [45]. O roli receptorów integrynowych w procesie praktywacji mogą świadczyć także wyniki prac Kowanko i Ferrante [41, 42]. Wykazali oni, że zablokowanie cząsteczek adhezyjnych CD11a i CD11b zmniejsza degenerację chrząstek stawowych przez obecne w jamach stawowych neutrofile praktywowane przez TNF- $\alpha$ . Praktywacja neutrofilów przez TNF- $\alpha$  aktywuje kinazy tyrozynowe i seryno-treoninowe, a w konsekwencji prowadzi do fosforylacji odpowiednich białek [15, 33]. Wykazano, że tempo fosforylacji białek tyrozynowych w komórkach, praktywowanych przez TNF- $\alpha$ , zwiększa się po związaniu receptora CD18 z ligandem [22]. W innych badaniach potwierdzono, że do wzbudzenia kinazy tyrozynowej w komórkach praktywowanych konieczny jest sygnał z receptorów  $\beta_2$  integrynowych, w szczególności Mac-1 [63].

W świetle tych doniesień wydaje się, że precyzyjne określenie roli cząsteczek adhezyjnych w zjawisku praktywacji nie jest jeszcze ustalone. Wyniki badań wielu autorów wskazują, że molekuly te mogą kontrolować przenoszenie sygnału do komórek uzbrajanych poprzez wpływ na procesy fosforylacji białek. Obserwowany w badaniach niektórych autorów wzrost ekspresji receptorów CD11b i CD18 na praktywowanych przez TNF- $\alpha$  neutrofilach po ich stymulacji przez fMLP jest skutkiem zjawiska praktywacji, a jednocześnie jest prawdopodobnie czynnikiem ułatwiającym przenoszenie sygnału w tych komórkach.

### Receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin

Najefektywniejszymi osponinami są przeciwciała klasy IgG. Fagocytoza cząstek opłaszczonych przeciwciałami klasy IgG przebiega bardzo efektywnie. Istotną rolę dla właściwego jej przebiegu odgrywa obecność na komórkach żernych cząstek receptorowych, rozpoznających fragment Fc immunoglobulin [18]. Przeciwciała

klasy IgG opłaszczając cząstki lub komórki, np. bakterie, umożliwiają rozpoznanie i fagocytozę tych struktur przez komórki żerne, mające receptory dla fragmentów Fc. Istnieją trzy zasadnicze formy tego receptora, należące do tej samej nadrodziny cząsteczek immunoglobulinowych. Poszczególne formy: FcγRI, FcγRII, FcγRIII różnią się masą cząsteczkową, powinowactwem do IgG, a także siłą ekspresji i rolą w procesach odpornościowych [26]. Neutrofile wykazują ekspresję wszystkich trzech typów receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin. Ekspresja tych cząstek zależna jest od stanu czynnościowego komórki; receptor typu FcγRI pojawia się na neutrofilach dopiero po ich pobudzeniu (na przykład przez IFN-γ). Oprócz zdolności wiązania fragmentu Fc, receptory tej klasy biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej, prezentacji antygenów, odpowiadają za uwalnianie z neutrofilii mediatorów reakcji zapalnej, takich jak: IL-1, IL-6, TNF-α [18].

Receptor typu FcγRIII występuje w dwóch odmianach A i B, które są kodowane przez wa różne geny. W granulocytach spoczynkowych występuje aż 100–300 tysięcy receptorów FcγRIIIB [18]. W przeciwieństwie do innych receptorów FcγR, receptor FcγRIIIB (CD16 b) jest przytwierdzony do błony komórkowej neutrofila przez łącznik glikozylofosfatydyloinozytolowy, co umożliwia mu dużą ruchliwość [25, 26]. Receptor ten ma zdolność do wiązania lektyn, występujących na niektórych bakteriach, co także prowadzi do fagocytozy. Utrata tego receptora przez neutrofile jest jednym z mierników procesu apoptozy tych komórek [23].

Aktywacja neutrofilii peptydem fMLP prowadzi do uwalniania receptora FcγRIIIB do środowiska [70, 71]. Po ekspozycji neutrofilii na TNF-α obserwowano zmniejszenie ekspresji tego receptora [3, 30]. Czy efektem preaktywacji neutrofila przez TNF-α jest zwiększona utrata cząstek FcγRIIIB? W badaniach Asmana i współpr. wykazano, że inhibitory proteaz umożliwiających złuszczenie się molekuly CD16 zmniejszają efekty preaktywacji neutrofilii przez TNF-α [3]. W świetle tych doniesień wydaje się więc, że proteoliza łącznika glikozylofosfatydyloinozytolowego i złuszczenie się receptora CD16 mogą być istotnym sygnałem preaktywacji. Cząstka FcγRIIIB jest czynnościowo uzależniona od innego receptora – CD11b/CD18. O powiązaniu funkcjonalnym obu typów receptorów świadczyć może fakt, że na neutrofilach występują one w dużej bliskości, „czapkując się” (od ang. *cocapping*) przy udziale domeny lektyno-podobnej [27]. Zablockowanie tej domeny swoistym inhibitorem (N-acetyl-D-glukozamina – NAG) znosi efekty preaktywacji neutrofilii przez TNF-α [3]. Prawdopodobnie nie można wykluczyć udziału związanych czynnościowo obu typów receptorów w zjawisku preaktywacji. Jest możliwe, że cząstki CD16 związane przez łącznik glikozylofosfatydyloinozytolowy z błoną komórkową neutrofilii są, oprócz receptorów adhezyjnych, niezbędne do przenoszenia sygnału preaktywacji tych komórek.

## Niektóre szlaki transdukcji sygnału preaktywacji

Wyspecjalizowane białka receptorowe, takie jak przedstawione powyżej receptory dla fMLP, TNF- $\alpha$  czy też cząstki adhezyjne kompleksu CD11/CD18 rozpoznają sygnały zewnątrzkomórkowe. Po rozpoznaniu i przetworzeniu sygnału następuje przekazanie informacji na odpowiedni wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny, składający się z szeregu białek regulatorowych i efektorowych oraz z cząsteczek i jonów będących wtórnymi przekaźnikami informacji. Ostatecznym efektem tego procesu jest odpowiedź komórki, która zależna jest zarówno od uruchamianych szlaków przekazywania informacji, jak i od wzajemnych interakcji między tymi szlakami. Odpowiedź neutrofila, preaktywowanego przez TNF- $\alpha$ , na czynnik stymulujący (fMLP) jest wypadkową wzajemnych oddziaływań między szlakami transdukcji sygnału uruchamianymi podczas preaktywacji i następującej po niej stymulacji.

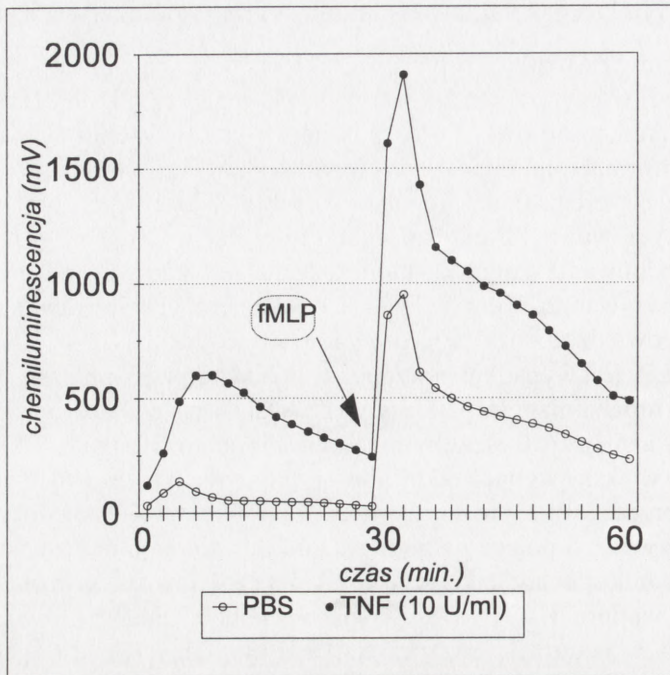
Jednym z ważniejszych efektów preaktywacji neutrofila przez TNF- $\alpha$  jest jego zdecydowanie większy wybuch oddechowy po stymulacji przez fMLP w porównaniu z komórką uprzednio nie preaktywowaną. Zjawisko wybuchu oddechowego (od ang. *respiratory burst*) polega na wytwarzaniu i uwalnianiu przez neutrofil dużych ilości anionorodnika ponadtlenkowego O<sub>2</sub>·, który częściowo ulega reakcji dysmutacji do nadtlenku wodoru H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [67]. Zjawisko wybuchu oddechowego zależne jest od aktywności w neutrofilu enzymu NADPH-oksydazy (EC 1.6.99.6) [34]. Jest to układ białek przenoszący elektrony z przestrzeni wewnątrzkomórkowej na cząstki tlenu na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W komórkach spoczynkowych aktywność enzymu jest niewielka, wzrasta znacznie pod wpływem stymulatorów, takich jak: fMLP, nienasyconych kwasów tłuszczowych i estrów forbolu [34]. Zdaniem większości autorów mechanizm aktywacji polega na przesunięciu z cytozolu do błony komórkowej specyficznych białek cytozolowych będących elementami kompleksu NADPH-oksydazy (p67<sup>phox</sup> i p47<sup>phox</sup>) i łączeniu się ich z flawocytochromem b [1, 24]. Analogiczną translokację białka cytozolowego p47<sup>phox</sup> obserwuje się w przypadku inkubacji neutrofila z TNF- $\alpha$  [3, 39]. Aktywacja NADPH-oksydazy może mieć więc decydujące znaczenie dla właściwego efektu zjawiska preaktywacji.

W dalszej części pracy przeanalizowano szlaki transdukcji sygnału uruchamiane w trakcie preaktywacji neutrofila przez TNF- $\alpha$  i w trakcie stymulacji przez fMLP, które ostatecznie doprowadzają do wzrostu aktywności NADPH-oksydazy i do specyficznej odpowiedzi komórki – wybuchu oddechowego.

## DROGI AKTYWACJI PO PRZYŁĄCZENIU LIGANDU DO RECEPTORA DLA fMLP

Po przyłączeniu fMLP do specyficznych receptorów na neutrofilach uruchamiane są klasyczne drogi przenoszenia sygnału, związane z białkami G. Aktywowana





RYSUNEK 1. Przykładowy przebieg chemiluminescencji izolowanych neutrofilów spoczynkowych (PBS) i preaktywowanych przez TNF- $\alpha$  po stymulacji fMLP (badania własne)

przez białka G fosfolipaza C hydrolizuje PtdInS(4,5)P<sub>2</sub> do dwóch wtórnych przekaźników informacji: diacyloglicerolu – DAG i trisfosfoinozytolu – InsP<sub>3</sub> [47, 56].

Pierwszy z nich pozostaje w plazmolemie i przy udziale Ca<sup>2+</sup> aktywuje kinazę białkową C (PKC) [36, 56]. W neutrofilach enzym ten pełni określoną rolę w przenoszeniu sygnału. Przemieszczanie się kinazy białkowej C z cytozolu do błony komórkowej jest sygnałem bezpośrednio poprzedzającym wybuch oddechowy [66]. Po stymulacji komórki przez fMLP dochodzi do przemieszczenia się kinazy białkowej C z cytozolu do błony komórkowej i do jednoczesnego wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia Ca<sup>2+</sup> [76]. Towarzyszący tym efektom wzrost aktywności NADPH-oksydazy może świadczyć o udziale kinazy białkowej C w pobudzeniu wybuchu oddechowego w neutrofilu [24]. Obecnie wiadomo także, że nie jest to jedyna droga pobudzenia NADPH-oksydazy. W badaniach Kawakami i współpr. wykazali, że inhibitor kinazy białkowej C H-7 hamuje translokację obu składowych NADPH-oksydazy nie wpływając jednocześnie na uwalnianie wolnych rodników tlenowych przez neutrofil [39]. Istnieje więc niezależna od PKC droga pobudzenia NADPH-oksydazy.

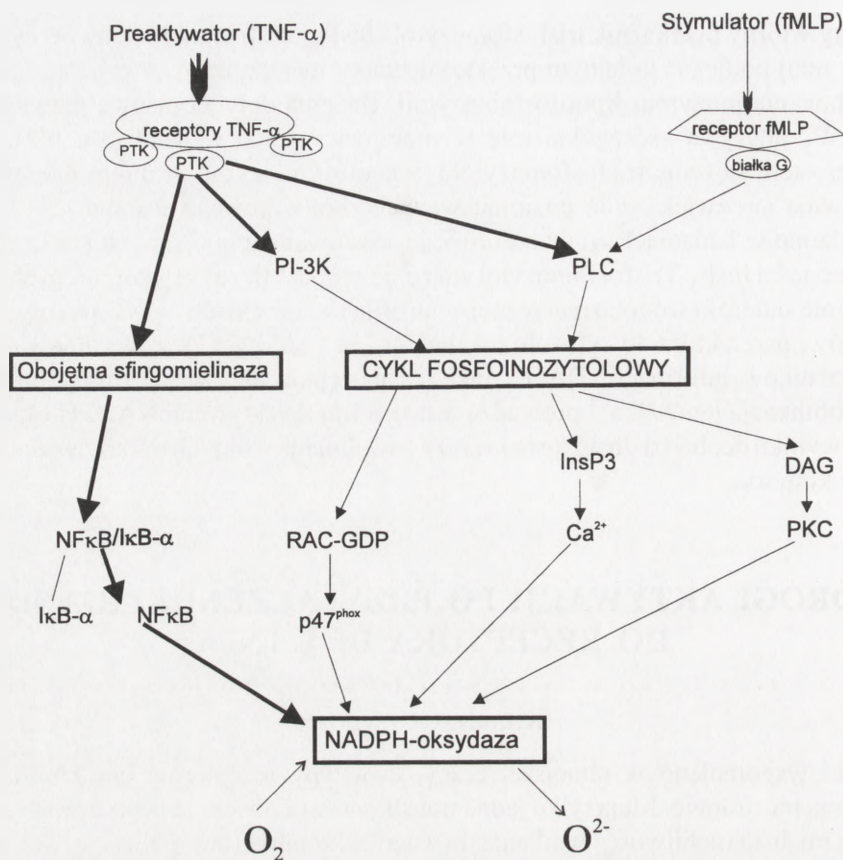
Inny wtórny przekaźnik trisfosfoinozytol ( $\text{InsP}_3$ ) zostaje uwolniony do cytozolu. Może tutaj podlegać kolejnym przekształceniom metabolicznym, prowadzącym do powstawania inozytolu i polifosfoinozytoli. Badania dotychczasowe potwierdzają, że  $\text{InsP}_3$  odgrywa szczególną rolę w mobilizacji  $\text{Ca}^{2+}$  w neutrofilu [43]. Wraz ze wzrostem stężenia trisfosfoinozytolu w neutrofilu, stymulowanym przez fMLP, obserwuje się zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia [2]. Jak potwierdzono w badaniach wielu autorów, proces uwalniania  $\text{Ca}^{2+}$  jest ściśle zależny od obecności  $\text{InsP}_3$ . Trisfosfoinozytol wiąże się ze specyficznym receptorem obecnym na błonie siateczki śródplazmatycznej neutrofila i w ten sposób wpływa na otwieranie kanałów, przez które do cytozolu uwalniany jest  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 43]. Powstanie wtórnych przekaźników informacji: DAG i  $\text{InsP}_3$ , a następnie aktywacja kinazy białkowej C i mobilizacja jonów  $\text{Ca}^{2+}$  prowadzą w neutrofilu do aktywacji NADPH-oksydazy. W jej wyniku dochodzi do wzrostu syntezy i uwalniania wolnych rodników tlenowych przez komórkę.

## DROGI AKTYWACJI PO PRZYŁĄCZENIU LIGANDU DO RECEPTORA DLA TNF- $\alpha$

### Kinazy tyrozynowe

Jak wspomniano w niniejszej pracy, dwa typy receptorów dla TNF- $\alpha$  mają podobną morfologię. Mają tylko jedną transbłonową sekwencję peptydową, co umożliwia im dużą ruchliwość i wnikanie do wnętrza komórki (internalizację). Receptory te w części zewnątrzkomórkowej mają cztery domeny zawierające reszty seryny, treoniny i proliny, które są potencjalnymi miejscami fosforylacji przy udziale kinaz tyrozynowych, seryno-treoninowych i kinaz zależnych od cyklicznych nukleotydów [7]. Mechanizm transdukcji sygnału przez receptory dla TNF- $\alpha$  jest stosunkowo słabo poznany. Wiadomo, że receptory dla TNF- $\alpha$  nie mają własnej kinazy tyrozynowej i w procesie przenoszenia sygnału wykorzystują kinazy tyrozynowe cytoplazmatyczne. Pobudzenie komórki odbywa się w sposób zbliżony do receptorów mających aktywność kinazy tyrozynowej. Po związaniu się TNF- $\alpha$  ze swoistymi receptorami dochodzi do trimeryzacji receptora. Umożliwia to wzrost powinowactwa receptora do cytokiny [7]. Region transbłonowy przenosi następnie sygnał o przyłączeniu cytokiny do domeny katalitycznej. Ta katalizuje autofosforylację i przeniesienie reszty fosofranowej  $\gamma\text{ATP}$  na reszty tyrozynowe białek substratowych [70].

Wiele doniesień wskazuje na kluczową rolę fosforylacji z wykorzystaniem kinaz tyrozynowych w preaktywacji neutrofilu przez TNF- $\alpha$ . W neutrofilach preaktywowanych przez TNF- $\alpha$  obserwowano wzrost ilościowy niektórych białek – substratów



RYSUNEK 2. Model aktywacji wybuchu tlenowego neutrofila preaktywowanego przez TNF- $\alpha$  i stymulowanego przez fMLP. Na rysunku zastosowano następujące skróty: **DAG** – diacylglicerol, **InsP<sub>3</sub>** – trisfosfoinozytol, **NF $\kappa$ B** – jądrowy czynnik transkrypcyjny B, **NADPH** – dinukleotyd nikotynamido-adeninowy, **p47<sup>phox</sup>** – jedno ze składowych białek NADPH-oksydazy, **PI-3K** – kinaza-3 fosfatydyloinozytolu, **PLC** – fosfolipaza C, **PKC** – kinaza białkowa C, **PTK** – kinaza tyrozynowa, **RAC-GDP** – małe białko G związane z NADPH-oksydazą

kinazy tyrozynowej [15, 49]. W badaniach innych autorów wykazano, że obserwowana w neutrofilach stymulowanych różnymi czynnikami fosforylacja z udziałem kinazy tyrozynowej ulegała wzmocnieniu w obecności TNF- $\alpha$  [45, 63]. W czasie, w którym notowano najsilniejszą odpowiedź preaktywowanego przez TNF- $\alpha$  neutrofila na fMLP, obserwowano największy wzrost ilości białek będących substratami kinazy tyrozynowej [63]. W badaniach Rafiee i współpracowników wykazano, że inhibitor kinazy tyrozynowej – genisteina zmniejszał stymulowaną przez fMLP chemiluminescencję neutrofilów preaktywowanych przez TNF- $\alpha$  [63]. Analogiczny wpływ genisteiny na neutrofile preaktywowane przez TNF- $\alpha$  lub substancję P opisywał Lloyds i współpracownicy [46]. W badaniach Liles i współpracowników potwierdzono, że działanie genisteiny na neutrofile preaktywowane przez TNF- $\alpha$  jest niezależne od zablokowania re-



ceptorów integrynowych [45]. Użyty inhibitor kinazy tyrozynowej (genisteina) zmniejszał uwalnianie  $H_2O_2$  przez komórki, w których receptory integrynowe połączono ze swoistymi przeciwciałami aktywującymi. Inne inhibitory kinazy tyrozynowej: ST 638 i herbimycyna hamowały uwalnianie reaktywnych form tlenu i enzymów antyoksydacyjnych przez neutrofile preaktywowane przez TNF- $\alpha$  w badaniach Niwa i współpr. [59]. W wyżej wymienionych badaniach nie obserwowano całkowitego zahamowania preaktywacji pod wpływem inhibitorów kinaz tyrozynowych. Taki wynik nasuwa przypuszczenie, że proces fosforylacji z udziałem kinaz tyrozynowych jest ważnym, chociaż nie decydującym etapem transdukcji sygnału podczas preaktywacji neutrofilów przez TNF- $\alpha$ . Badania innych autorów wskazują, że preaktywacja kompleksu NADPH-oksydazy zależna jest także od udziału kinaz seryno-treoninowych. Berkow i współpr., a następnie Crowley i Raffin wykazali, że TNF- $\alpha$  indukuje fosforylację kilku białek neutrofilów przy udziale tych kinaz [8, 15]. Jedną ze składowych białek kompleksu p47<sup>phox</sup> ma 6 potencjalnych miejsc fosforylacji z udziałem kinaz seryno-treoninowych [34]. Nie zidentyfikowano w tym białku natomiast żadnego miejsca fosforylacji tyrozynowej [33]. Według teorii wysuniętej przez Lloydsa i współpr. białko p47<sup>phox</sup> odgrywa rolę łącznika wszystkich możliwych dróg przenoszenia sygnału w neutrofilach preaktywowanych przez TNF- $\alpha$  [46]. Dlatego dalsze badania procesów fosforylacji tego białka mogą mieć kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmu zjawiska preaktywacji.

### Szlak sfingomielinowy

W procesie preaktywacji neutrofilów przez TNF- $\alpha$  dochodzi do indukowania aktywności czynników transkrypcyjnych AP-1 i NF- $\kappa$ B [48, 53]. Dokładny mechanizm aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B nie jest jeszcze poznany. Przypuszczalnie aktywacja następuje poprzez szlak sfingomielinowy. Połączenie TNF- $\alpha$  z receptorem p55 prawdopodobnie indukuje aktywność obojętnej sfingomielinazy błonowej (SMaza). Enzym ten katalizuje proces hydrolizy sfingomieliny błonowej, co prowadzi do utworzenia ceramidu [35]. Ten z kolei, stymuluje kinazy białkowe z grupy kinaz seryno-treoninowych, a także izoenzym  $\zeta$  kinazy białkowej C, kinazę białkową aktywowaną ceramidem (CAPK) i fosfatazę białkową aktywowaną ceramidem (CAPP) [48]. W dalszym etapie dochodzi do fosforylacji kompleksu NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  i odszczepienia składowej I $\kappa$ B- $\alpha$  [35, 51]. Czynniki martwicy nowotworów wiążąc się z receptorem aktywuje nieznaną jeszcze kinazę inhibitora I $\kappa$ B. Kinaza fosforyluje następnie inhibitor, co doprowadza do odłączenia I $\kappa$ B od NF $\kappa$ B [52]. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B przemieszcza się do jądra komórkowego, a następnie łączy z promotorami genów docelowych [38]. Proces ten może prowadzić do zahamowania cyklu komórkowego lub przez zahamowanie aktywności fosfolipazy D do apoptozy [55].

W świetle doniesień ostatnich kilku lat wydaje się, że ta droga przenoszenia sygnału, alternatywna do szlaku poprzez kinazę białkową C i DAG, może mieć znaczenie w mechanizmie zjawiska preaktywacji neutrofila przez TNF- $\alpha$ . Badania dowiodły, że proces transdukcji sygnału prowadzącej przez szlak sfingomielinowy odbywa się przy udziale proteaz serynowych i tiolowych. Henkel i współpr. wykazali, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B jest hamowana pod wpływem inhibitorów proteaz – TPCK i TLCK [35]. W badaniach Asman i współpr. wykazano, że inkubacja neutrofilów z TLCK znosi efekt preaktywacji tych komórek przez TNF- $\alpha$  [3]. Wydaje się więc, że udział proteaz serynowych w procesie preaktywacji jest bardzo prawdopodobny.

### Cykl fosfoinozytoli

Elementem wspólnym dla dróg przenoszenia sygnału preaktywacji komórki przez TNF- $\alpha$  i stymulacji przez fMLP jest udział pochodnych fosfoinozytoli. Jak już wspomniano, związanie TNF- $\alpha$  ze swoistymi receptorami prowadzi do ich autofosforylacji przez aktywację kinaz tyrozynowych. Kinazy aktywują fosfolipazę C i uruchamiają szlak generowania drugich przekazników DAG i InsP<sub>3</sub> [10]. Aktywowana jest także kinaza-3 fosfatydyloinozytoli – PI-3K [14, 21]. Enzym ten ma zdolność wprowadzania grupy fosforanowej w pozycję 3 pierścienia inozytoloowego. Powstałe przy udziale tego enzymu fosfolipidy należą do rodziny nowo odkrytych fosfolipidów inozytoloowych, mających grupę fosforanową w pozycji 3 pierścienia inozytoloowego [43]. Nieznana jest obecnie rola biologiczna tych fosfolipidów. W neutrofilu prawdopodobnie wpływają na konformację błony komórkowej, uczestniczą w zmianach cytoszkieletu komórki. Jak wykazały badania Niggli i Keller, zahamowanie aktywności kinazy PI-3K przez inhibitor (wortmanina) zmniejsza chemotaksję neutrofila [58]. Wydaje się, że substraty tej kinazy mogą mieć znaczenie w prawidłowej aktywności lokomocyjnej neutrofila. Jak stwierdzono, kinaza-3 fosfatydyloinozytoli – PI-3K przy udziale małego białka Rac wpływa na fosforylację podjednostki p47<sup>phox</sup> NADPH-oksydazy, przez co bierze udział w produkcji nadtlenków w neutrofilach [70]. Wykazano, że inkubacja neutrofilów ze specyficznym inhibitorem kinazy PI-3K (LY294002) hamuje efekty preaktywacji tych komórek przez TNF- $\alpha$  [14]. W świetle tych doniesień należy sądzić, aktywacja 3-kinazy fosfatydyloinozytoli przez kinazy tyrozynowe jest jeszcze jednym, istotnym elementem w szlaku przenoszenia sygnału preaktywacji neutrofila przez TNF- $\alpha$ .

### PODSUMOWANIE

Mechanizm zjawiska preaktywacji neutrofilów przez TNF- $\alpha$  jest wciąż niewyjaśniony. Jak wykazały badania prezentowane w niniejszej pracy, możliwy jest udział różnych dróg przenoszenia sygnału w komórkach. W procesie tym uczestniczyć

mogą zarówno białka G, kinazy białkowe, kinazy seryno-treoninowe i tyrozynowe, a także cykl fosfatydyloinozytoli. Niewyjaśniona pozostaje także rola proteaz serynowych i tiolowych. Wiele ostatnich doniesień podkreśla rolę szlaku sfingomielinowego w mechanizmie zjawiska preaktywacji. Przymuszcza się, w przenoszeniu sygnału w neutrofilu preaktywowanym przez TNF- $\alpha$  uczestniczą zarówno klasyczne receptory dla fMLP związane z białkami G, jak i receptory dla TNF- $\alpha$  związane z kinazą tyrozynową. Ostateczny efekt preaktywacji jest sumą oddziaływań czynnika preaktywującego na receptory dla TNF- $\alpha$  i czynnika stymulującego, np. fMLP, na receptory dla peptydu chemotaktycznego. Dużą rolę wydają się odgrywać także, obecne na powierzchni neutrofilu cząstki adhezyjne oraz receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin. Dalsze badania potwierdzą prawdopodobnie rolę jonów wapniowych w przenoszeniu sygnału preaktywacji.

## LITERATURA

- [1] AGWU D, McPHAIL L, SOZZANI S. Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. Effects of activation of NADPH oxidase. *J Clin Invest* 1991; **88**: 531–538.
- [2] AMATRUDA TT, DRAGAS-GRAONIC S, HOLMES R, PEREZ HD. Signal transduction by the formyl peptide receptor. *J Biol Chem* 1995; **47**: 28010–28013.
- [3] ASMAN B, GUSTAFSSON A, BERGSTROM K. Priming of neutrophils with tumor necrosis factor- $\alpha$  measured as Fc $\gamma$  receptor-mediated respiratory burst correlates with increased complement receptor 3 membrane density. *Int J Clin Lab Res* 1996; **26**: 236–239.
- [4] BACHMAIER K, PUMMERER C, KOZIERADZKI I, PFEFFER K, MAK TW, NEU N, PENNINGER JM. Low-molecular-weight tumor necrosis factor receptor p55 controls induction of autoimmune heart disease. *Circulation* 1997; **95**: 655–661.
- [5] BAJAJ MS, KEW RR, WEBSTER RO, HYERS TM. Priming of human neutrophil function by tumor necrosis factor. *Inflammation* 1992; **16**: 241–250.
- [6] BALAZOVICH KJ, SUCHARD SJ, REMICK DG, BOXER LA. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and fMLP receptors are functionally linked during fMLP-stimulated activation of adherent human neutrophils. *Blood* 1996; **2**: 690–696.
- [7] BAZZONI F, BEUTLER B. How do tumor necrosis factor receptors work? *J Inflammation* 1995; **45**: 221–238.
- [8] BERKOV RL, WANG D, LARRICK W, DODSON RW, HOWARD TH. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; **139**: 3783–3791.
- [9] BILSLAND CAG, DIAMOND MS, SPRINGER TA. The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b. *J Immunol* 1994; **152**: 4582–4589.
- [10] BRINDLEY DN, WAGGONER DW. Phosphatide phosphohydrolase and signal transduction. *Chem Phys Lipids* 1996; **80**: 45–57.
- [11] BURT HM, JACKSON JK. The priming action of tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on neutrophils activated by inflammatory microcrystals. *Clin Exp Immunol* 1997; **108**: 432–437.



- [12] CALAFAT J, KUIJPERS TW, JANSSEN H, BORREGAARD N, VERHOEVEN AJ, ROOS D. Evidence for small vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18. *Blood* 1993; **81**: 3122–3129.
- [13] CONDLIFFE AM, CHILVERS ER, HASLETT C, DRANSFIELD I. Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule *l*expression/ function. *Immunology* 1996; **89**: 105–111.
- [14] COFFER PJ, KOENDERMAN L. Granulocyte signal transduction and priming: cause without effect? *Immunol Lett* 1997; **57**: 27–31.
- [15] CROWLEY J, RAFFIN T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein phosphorylation in human neutrophils. *Amer J Respir Cell Mol Biol* 1991; **5**: 284–290.
- [16] DAPINO P, DALLEGRI F, OTTONELLO L, SACCHETTI C. Induction of neutrophil respiratory burst by tumor necrosis factor-alpha; priming effect of solid-phase fibronectin and intervention of CD11b-CD18 integrins. *Clin Exp Immunol* 1993; **94**: 533–538.
- [17] DELLA BIANCA V, DUSI S, NADALINI KA, DONINI M, ROSSI F. Role of 55- and 75-kDa TNF receptors in the potentiation of Fc-mediated phagocytosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **214**: 44–50.
- [18] DEO YM, GRAZIANO RF, REPP R, WINKEL JG. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc $\gamma$ R-directed immunotherapies. *Immunol Today* 1997; **18**: 127–15.
- [19] DETMERS PA, THIEBLEMONT N, VASSELON T, PIRONKOVA R, MILLER DS, WIGHT SD. Potential role of membrane internalization and vesicle fusion in adhesion of neutrophils in response to lipopolysaccharide and TNF. *J Immunol* 1996; **157**: 5589–5596.
- [20] DIAMOND MS, SPRINGER TA. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* 1993; **120**: 545–551.
- [21] DIDICHENKO SA, TILTON B, HEMMINGS BA, BALLMERHOFER K, THELEN M. Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47 (phox) by membrane-target phosphoinositide 3-kinase. *Curr Opin Biol* 1996; **6**: 1271–1278.
- [22] DONOVAN KL, COLES GA, WILLIAMS JD. Tumor necrosis factor-alpha augments the proinflammatory interaction between PMN and GBM via a CD18 dependent mechanism. *Kidney Int* 1995; **48**: 698–704.
- [23] DRANSFIELD I, BUCKLE AM, SAVILL JS, MCDOWALL A, HASLETT C, HIGG N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc $\gamma$ RIII) expression. *J Immunol* 1994; **153**: 1254–1260.
- [24] DUSI S, DONINI M, ROSSI F. Mechanism of NADPH oxidase activation: translocation of p40 (phox), Rac1 and Rac2 from cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47 (phox) or p67 (phox). *Biochem J* 1996; **314**: 409–412.
- [25] EDGERG JC, KIMBERLY RP. Cell type specific glycoforms of Fc $\gamma$ RIIIa (CD16). Differential ligand binding. *J Immunol* 1997; **159**: 3849–3857.
- [26] EDBERG JC, KIMBERLY RP. Modulation of Fc $\gamma$  and complement receptor function by the glycosylphosphatidylinositol-anchored form of Fc $\gamma$ RIII. *J Immunol* 1994; **152**: 5826–5831.
- [27] EDWARDS SW. Cell signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 362–367.
- [28] ELBIM E, GOUGEROT-POCIDALO MA. Priming study of human phagocytes oxidative burst by using flow cytometry. *Haematol Cell Ther* 1996; **39**: 527–535.
- [29] FERNANDEZ-SEGURA E, GARCIA JM, CAMPOS A. Topographic distribution of CD18 integrin on human neutrophils as related to shape changes and movement induced by chemotactic peptide and phorbol esters. *Cell Immunol* 1996; **171**: 120–125.
- [30] FERRANTE A, MARTIN AJ, BATES EJ, GOH DHB, HARVEY DP, PARSONS D, RATHJEN DA, RUSS G, DAYER JM. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated neutrophils, the role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst and degranulation. *J Immunol* 1993; **151**: 4821–4828.

- [31] GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ, VADAS MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 8667–8671.
- [32] GAY JC, RADDASSI K, TRUETT AP, MURRAY JJ. Phosphatase activity regulates superoxide anion generation and intracellular signaling in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1997; **2**: 243–253.
- [33] GRINSTEIN S, FURUYA W, BUTLER JR, TSENG J. Receptor-mediated activation of multiple serine/threonine kinases in human leukocytes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 20223–20231.
- [34] HENDERSON LM, CHAPPEL JB. NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1273**: 87–107.
- [35] HENKEL T, MACHLEIDT T, ALKALAY I, KRONKE M, BEN-NERIACH Y, BAEUERLE P. Rapid proteolysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1993; **365**: 182–185.
- [36] HURTTIA H, LEINO L. Subcellular localization of diacylglycerol kinase activity in stimulated and unstimulated human peripheral blood lymphocytes and neutrophils. *Biochem Mol Biol Int* 1996; **40**: 579–585.
- [37] JOHNSTON SC, DUSTIN ML, HIBBS ML, SPRINGER TA. On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules. *J Immunol* 1990; **145**: 1181–1187.
- [38] KAMIŃSKA B. Rola indukowalnych czynników transkrypcyjnych w regulacji ekspresji genów. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 55–65.
- [39] KAWAKAMI N, TAKEMASA H, YAMAGUCHI T, HAYAKAWA T, SHIMOHAMA S, FUJIMOTO S. Indication of a protein kinase C – independent pathway for NADPH oxidase activation in human neutrophils. *Archiv Biochem Biphys* 1998; **349**: 89–94.
- [40] KLEIN JB, SCHERZER JA, HARDING GB, JACOBS AA, McLEISH KR. TNF- $\alpha$  stimulates increased plasma membrane guanine nucleotide binding protein in polymorphonuclear leukocytes. *J Leukocyte Biol* 1995; **57**: 500–506.
- [41] KOWANKO IC, FERRANTE A. Adhesion and the TNF priming in neutrophil-mediated cartilage damage. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **79**: 36–42.
- [42] KOWANKO IC, FERRANTE A, CLEMENTE G, YOUSSEF PP, SMITH M. Tumor necrosis factor priming of peripheral blood neutrophils from rheumatoid arthritis patients. *J Clin Immunol* 1996; **16**: 216–221.
- [43] KULAR G, LOUBTCHENKOV M, SWIGART P, WHATMORE J, BALL A, COCKROFT S, WETZKER R. Cooperation of phosphatidylinositol transfer protein with phosphoinositide 3-kinase gamma in the formylmethionyl-leucylphenylalanine-dependent production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in human neutrophils. *Biochem J* 1997; **325**: 299–301.
- [44] LALA A, SOJAR HT, NARDIN E. Quantitative approach for detection and characterization of formyl peptide receptor in solution using a photoaffinity ligand. *Pept Res* 1996; **9**: 58–60.
- [45] LILES WC, LEDBETTER JA, WALTERSDORPH AW, KLEBANOFF SJ. Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. *J Leukocyte Biol* 1995; **58**: 690–697.
- [46] LLOYDS D, BRINDLE NPJ, HALLET MB. Priming of tumour necrosis factor- $\alpha$  and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology* 1995; **84**: 220–226.
- [47] LUNDQVIST H, FOLLIN P, KHALFAN L, DAHLGREN C. Phorbol myristate acetate-induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 270–279.
- [48] MACHLEIDT T, WEIGMANN K, HENKEL T, SCHUTZ S, BAEURLE P, KRONKE M. Sphingomyelinase activates proteolytic I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation in a cell-free system. *J Biol Chem* 1994; **269**: 13760–13765.

- [49] MAJEWSKA E, PALEOLOG E, BAJ Z, FELDMANN M, TCHÓRZEWSKI H Role of tyrosine kinase enzymes in TNF- $\alpha$  and IL-1 induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 on human umbilical vein endothelial cells. *Scand J Immunol* 1997; **45**: 385–342.
- [50] MAZZONE A, RICEVUTI G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 1995; **80**: 161–175.
- [51] McDONALD PP, BALD A, CASSATELLA MA. Activation of the NF-kappa B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* 1997; **89**: 3421–3433.
- [52] McDONALD PP, CASSATELLA MA. Activation of the NF-kappa B by phagocytic stimuli in human neutrophils. *FEBS Lett* 1997; **412**: 583–586.
- [53] McLEISH KR, KLEIN JB, LEDERER ED, HEAD KZ, WARD RA. Azotemia, TNF- $\alpha$  and LPS prime the human neutrophil oxidative burst by distinct mechanisms. *Kidney Int* 1996; **50**: 407–416.
- [54] MENEGAZZI R, CRAMER R, PATRIARCA P, SCHEURICH P, DRIP E. Evidence that tumor necrosis factor alpha (TNF)-induced activation of neutrophil respiratory burst on biologic surfaces is mediated by the p55 TNF receptor. *Blood* 1994; **84**: 287–293.
- [55] MESNER PW, BUDIARDJO II, KAUFMANN SH. Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol* 1997, **41**: 461–499.
- [56] NEER EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 1995; **80**: 249–257.
- [57] NEUMANN B, MACHLEIDT T, LIFKA A, PFEFFER K, VESTWEBER D, MAK TW, HOZMAN B, KRONKE M. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol* 1996; **156**: 1587–1593.
- [58] NIGGLI V, KELLER H. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin markedly reduces chemotactic peptide-induced locomotion and increases in cytoskeletal actin in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1997; **355**: 43–52.
- [59] NIWA M, YOUSIF AEL, KOHNO K, KANAMORI Y, MATSUNO M, ABE A, UEMATSU T. The loss of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor and recombinant human TNF- $\alpha$  priming effects on the superoxide-generating response in exudated neutrophils is associated with a decrease in their receptor affinities. *J Immunol* 1996; **157**: 4148–4153.
- [60] PORTEU F, NATHAN CF. Mobilizable intracellular pool of p55 (type I) tumor necrosis factor receptors in human neutrophils. *J Leukocyte Biol* 1992; **52**: 122–124.
- [61] PORTEU F, HIELBLOT C. Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2834–2840.
- [62] QUEHENBERGER O, PAN ZK, PROSSNITZ ER, CAVANAGH SL, COCHRANE CG, YE RD. Identification of an N-formyl peptide receptor ligand binding domain by a gain-of-function approach. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **238**: 377–381.
- [63] RAFIEE P, LEE JK, LEUNG CC, RAFFIN TA. TNF- $\alpha$  induces tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in adherent human neutrophils. *J Immunol* 1995; **154**: 4785–4792.
- [64] RASMUSSEN BJ, CARPENTIER JL, PACCAUD JP, MAGNUSSON KE. The N-formyl methionyl peptide formyl-methionyl-leucyl phenylalanine (fMLP) increases the lateral diffusion of complement receptor 1 (CR1/CD35) in human neutrophils; a causative role for oxidative metabolites? *Biosci Rep* 1996, **16**: 391–404.
- [65] RICHTER J, GULLBERG U, LANTZ M. TNF-induced superoxide anion production in adherent human neutrophils involves both the p55 and p75 TNF receptor. *J Immunol* 1995; **154**: 4142–4148.
- [66] SALAMINO F, SPARATORE B, DE TULLIO R, MENGOTTI P, MELLONI E, PONTRE-MOLI S. Respiratory burst in activated neutrophils is directly correlated to the intracellular level of protein kinase C. *Eur J Biochem* 1991; **200**: 573–577.



- [67] SMITH JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukocyte Biol* 1994; **56**: 672–691.
- [68] TAPPER H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukocyte Biol* 1996; **59**: 613–622.
- [69] TCHÓRZEWSKI H, ZEMAN K, PALEOLOG E, BRENNAN F, FELDMANN M, KAHAN M, GUGA P, KWINKOWSKI M, SZYMAŃSKA B, JAROSZ J, PARNIEWSKI P, KOCUR E. The effects of tumor necrosis factor (TNF) derivatives on TNF receptors. *Cytokine* 1993; **5**: 125–132.
- [70] THELEN M, DEWALD B, BAGGIOLINI B. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev* 1993; **73**: 797–821.
- [71] TOSI MF, ZAKEM H. Surface expression of Fc $\gamma$  receptor III (CD16) on chemoattractant-stimulated neutrophils is determined by both surface shedding and translocation from intracellular storage compartments. *J Clin Invest* 1992; **90**: 462–470.
- [72] VON ANDRIAN UH, BERGER EM, RAMEZANI L, CHAMBERS JD, OCHS HD, HARRLAN JM, PAULSON JC, ETZIONI A, ARFORS KE. *In vivo* behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte deficiency syndromes. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2893–2897.
- [73] WALZOG B, JABLONSKI F, ZAKRZEWICZ A, GAEHTGENS P. Beta (2) integrins (CD11/CD18) promote apoptosis of human neutrophils. *FASEB J* 1997; **11**: 1177–1186.
- [74] WARD PA, McLEISH KR. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Amer Soc Nephrol* 1995; **9**: 1697–1702.
- [75] WARD PA. Neutrophils and adjuvant arthritis. *Clin Exp Immunol* 1997; **107**: 225–226.
- [76] WATSON F, GASMI L, EDWARDS SW. Stimulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in human neutrophils by soluble immune complexes – functional activation of Fc gamma RIIIb during priming. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17944–17951.
- [77] WILES ME, DYKENS JA, WRIGHT CD. Human neutrophil (PMN) oxygen radical production and the cytoskeleton. *Life Sci* 1995; **57**: 1533–1546.
- [78] WITTHAUT R, FARHOOD A, SMITH CW, JAESCHEKE H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia *in vivo*. *J Leukocyte Biol* 1994; **55**: 105–111.
- [79] ZEMAN K. Współczesne poglądy na rolę granulocytów obojętnochłonnych (neutrofilów) w procesach zapalnych. I. Patofizjologiczne podstawy udziału neutrofilów w zapaleniu. *Immunol Pol* 1993; **18**: 3–21.
- [80] ZEMAN K. Cytometria przepływową w badaniach neutrofilów. *Centr Eur J Immunol* 1996; **21**: 128–137.
- [81] ZEMAN K, KANTORSKI J, PALEOLOG EM, FELDMANN M, TCHÓRZEWSKI H. The role of receptors for tumour necrosis factor- $\alpha$  in the induction of human polymorphonuclear neutrophil chemiluminescence. *Immunol Lett* 1996; **53**: 45–50.
- [82] ZIMMERLI W, REBER AM, DAHINDEN CA. The role of formylpeptide receptors, C5a receptors and cytosolic-free calcium in neutrophil priming. *J Infect Dis* 1990; **161**: 242–249.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 17.06. 1998 r.

Przyjęto: 20.11.1998 r.

Adres autora: 90-647 Łódź 39, Plac Hallera 1



## POCHODZENIE MIKROGLEJU

### ORIGIN OF MICROGLIA

Marek ZIAJA

Zakład Neuroanatomii Instytutu Zoologii UJ, Kraków

*Streszczenie:* Mimo wielu lat badań problem pochodzenia mikrogleju pozostaje sprawą kontrowersyjną. Obecność antygenów błonowych, a także pewne cechy morfologiczne i funkcjonalne sugerują pochodzenie komórek mikrogleju od monocytów. Hipoteza taka została sformułowana ponad sześćdziesiąt lat temu i wiele późniejszych badań wydawało się w pełni ją potwierdzać. Pojawiły się jednak również wyniki, które każą zwrócić uwagę na inne możliwe źródła komórek mikroglejowych. Wśród potencjalnych prekursorów mikrogleju wymienia się komórki neuroektodermalne, makrofagi płodowe czy pierwotne komórki mezodermalne. Jest również możliwe pochodzenie komórek mikrogleju z różnych populacji prekursorowych. Wiemy, że mikroglej spoczynkowy powstaje w wyniku przekształcania się komórek tzw. mikrogleju amebowego. Dlatego też zasadniczy problem dotyczy przede wszystkim źródła komórek mikrogleju amebowego, a nie mikrogleju spoczynkowego.

*Słowa kluczowe:* mikroglej, neuroektoderma, monocyty, LC-1, makrofagi, mezoderma.

*Summary:* Despite many years of investigations, the origin of microglia remains a controversial issue. The presence of surface antigens and some morphological and functional features suggest monocytic origin of microglial cells. This hypothesis was first formulated over 60 years ago and numerous subsequent studies seemed to confirm it. Some other results arose that indicate other possible sources of microglia. Other potential sources of microglia mentioned in these studies are for example neuroectodermal cells, fetal macrophages or primitive mesodermal cells. Microglia could also originate from various precursor populations. We know that the resting form of microglia, ramified microglia, is formed through transformation of so-called amoeboid microglial cells. Therefore the key problem is the source of amoeboid microglia rather than the source of the resting form.

Key words: microglia, neuroectoderm, monocytes, LC-1 antigen, macrophages, mesoderm.

## WSTĘP

Komórki mikrogleju stanowią ważny element układu nerwowego. Badania prowadzone w ostatnich dwudziestu latach znacznie zwiększyły naszą wiedzę o roli



tych komórek. Pomimo poznania wielu aspektów zachowania się mikrogleju zarówno w zdrowej tkance, jak i podczas zmian patologicznych jest ono niewystarczające. Uważa się, że początkowo okrągłe komórki ameboidalne, pojawiające się wcześniej w rozwoju, przekształcają się stopniowo w rozgałęzione komórki mikrogleju spoczynkowego występującego w dojrzałym mózgu [20, 44]. Jednakże wciąż istnieją kontrowersje związane z pochodzeniem mikrogleju. Del Rio Hortega na podstawie własnych obserwacji uważał, że pochodzą one z komórek mezodermalnych napływających w czasie rozwoju embrionalnego z tworzących się opon [cyt. za 20]. Z kolei Santha i Juba [cyt. za 20] zauważyli, że mogą one zachowywać się jak makrofagi, a ich pojawienie się w tkance zbiega się w czasie z rozwojem naczyń krwionośnych. Dało to podstawę popularnej do dzisiaj hipotezie monocytarnego pochodzenia mikrogleju. W ostatnich latach pojawił się także pogląd, że mikroglej nie powstaje bezpośrednio z monocytów, ale że oba typy komórek rozwijają się z makrofagów płodowych [13]. Przyjęcie takiego rozwiązania daje możliwość pełniejszego wyjaśnienia roli mikrogleju w reakcjach odpornościowych układu nerwowego. Nie można jednak zapominać o badaniach, które wskazują na niewielki lub nawet żaden udział komórek krwiopochodnych w tworzeniu populacji komórek mikrogleju [5, 7, 8, 10, 20, 23, 30, 32]. Dlatego też w dalszym ciągu kwestia ta nie jest rozwiązana do końca. Wyniki niektórych badań mogą wskazywać, że populacja mikrogleju w układzie nerwowym nie jest jednorodna, ale tworzą ją komórki o podobnych cechach morfologicznych i czynnościowych, lecz o różnym pochodzeniu, ekto- lub mezodermalnym [5, 23].

## MONOCYTY?

Jedną z przesłanek najsilniej świadczących o istnieniu związków mikrogleju z monocytami jest ekspresja antygenów powierzchniowych. Liczne badania wykazały, że mikroglej ma antygeny charakterystyczne dla komórek układu odpornościowego, takie jak: receptor składnika 3 układu dopełniacza (CR3) [17, 25, 38, 41, 42], receptor Fc łańcucha przeciwciał [36], antygen wspólny dla leukocytów (*leucocyte common antigen* – LCA) [17, 38, 39], a także główne antygeny zgodności tkankowej klasy I i II (*major histocompatibility complex* – MHC) [17, 25, 38, 39, 41, 42,] czy białko CD4 [38, 39]. Ekspresja tych antygenów zmienia się wraz z rozwojem tych komórek, a szczególnie silnie objawia się w przypadku zmian patologicznych występujących w układzie nerwowym [44].

Podawanie znaczników, które mogą być pobrane przez monocyty krwi obwodowej, a następnie wykrywanie ich w komórkach ameboidalnego mikrogleju stanowi podstawę drugiej grupy eksperymentów, mających za zadanie sprawdzenie hipotezy o monocytarnym pochodzeniu mikrogleju. Kaur i wsp. [14] podawali dożylnie pe-

roksydazę chrzanową, Ling i wsp. [19] koloidalny węgiel, Xu i wsp. [40] i Li i wsp. [18] znacznik fluorescencyjny, rodaminę. Wszyscy oni stwierdzili pojawienie się tych związków w komórkach ameboidalnego mikrogleju znajdującego się w spidle wielkim, co może świadczyć o napływie monocytów do układu nerwowego. Jednakże, jak sugerują Hurley i Streit [13], istnieje możliwość innej interpretacji ich wyników. Ponieważ znaczniki te podawano w pierwszych dniach po urodzeniu, kiedy bariera krew-mózg nie jest jeszcze w pełni wytworzona, mogły one przez naczynia dostawać się do mózgu i być fagocytowane przez mikroglej ameboidalny, co spowodowało ich obecność w tych komórkach. Także Xu i wsp. [40] sugerują możliwość fagocytowania rodaminę przez ameboidalny mikroglej, bowiem tuż po podaniu znacznika wybarwione były przede wszystkim komórki ścian naczyń i leżące w ich pobliżu ameboidalne komórki mikrogleju. Pozwala to twierdzić, że rodamina dostaje się do mózgu przez ściany naczyń i dopiero wtedy może być aktywnie fagocytowana przez ameboidalny mikroglej. Ponadto intensywność znakowania komórek mikrogleju rodaminą podaną obwodowo spada wraz z wiekiem, co może być wynikiem dojrzewania bariery krew-mózg, a tym samym zmniejszenia napływu monocytów lub zmniejszenia się aktywności fagocytarnej mikrogleju ameboidalnego związanej z jego dojrzewaniem i przekształcaniem się w mikroglej rozgałęziony [40]. Cytowani wyżej autorzy stwierdzają, że wyniki ich badań mogą wskazywać nie tyle na monocyty jako prekursorzy mikrogleju, co na fakt, iż ameboidalny mikroglej stanowi bardzo efektywną barierę fagocytującą różne związki pochodzące z krwi, zanim w pełni wykształci się bariera krew-mózg.

Systematyczne badania nad przebiegiem rozwoju populacji mikrogleju u myszy przeprowadzili m.in. Perry i wsp. [31]. Używali oni przeciwciał wykrywających receptor Fc i CR3, oraz przeciwciała F4/80, wykrywającego antygen charakterystyczny dla monocytów [31]. Wykazali, że znakują one populację komórek, mających cechy morfologiczne mikrogleju. Zauważyli też, że w rozwoju embrionalnym komórki o cechach mikrogleju pojawiają się w pobliżu naczyń krwionośnych, a nie występują w rejonach, gdzie powstają neurony i makroglej. W 16 dniu rozwoju embrionalnego komórki F4/80+ znajdowały się w oponach, splotach naczyńiówkowych i w strefie okołokomorowej. Następnie znajdowano je w mózgu, gdzie stopniowo stawały się coraz bardziej rozgałęzione [31]. Badania te wydają się potwierdzać pogląd o powstawaniu mikrogleju z monocytów, gdyż pierwsze obserwowane komórki F4/80+ znajdowały się poza zasadniczą tkanką mózgu, a dopiero później obserwowano je w niej samej. Może to świadczyć o napływie komórek krwiopochodnych do układu nerwowego. Z drugiej strony Ashwell [1] stwierdził występowanie ameboidalnego mikrogleju już w 11 dniu rozwoju embrionalnego. Prawdopodobnie te wczesne komórki ameboidalne w układzie nerwowym są makrofagami płodowymi, które pojawiają się już około 9 dnia [37]. W innych badaniach zauważono, że makrofagi płodowe zasiedlają neuroektodermę przez oponę pajęczą, jeszcze zanim wykształci się sieć naczyniowa [35]. Wyniki te mogą wskazywać

na to, że to nie monocyty, ale makrofagi płodowe są komórkami, z których później powstaje mikroglej, zwłaszcza że dzielą się aktywnie w narządach, które zasiedlają [35]. Przemawia za tym również fakt, że pierwsze monocyty pojawiają się około 10–11 dnia rozwoju embrionalnego [37], zatem także mogą pochodzić z makrofagów płodowych.

Kolejne wskazówki co do pochodzenia mikrogleju przyniosły badania nad chimerami radiacyjnymi [16]. Dojrzałym zwierzętom niszczone szpik kostny przez napromienianie. Następnie szpik kostny odtwarzano za pomocą transfuzji komórek szpikowych ze zwierząt z antygenem MHC I, różniącym się od MHC I biorcy. Przy użyciu przeciwciał specyficznych dla MHC I dawcy badano występowanie tego antygeny u komórek mikrogleju biorcy [16]. Wyniki wskazują, że tylko niewielka część mikrogleju miała MHC I dawcy. Mimo iż komórek takich było tylko 10%, to pewne jest, że pochodziły one z przeszczepionych komórek szpikowych. Z drugiej strony interpretację tych wyników utrudnia fakt, że w normalnym, dojrzałym mózgu jest bardzo mało komórek, w których można wykryć MHC I i aby zaobserwować jego występowanie, trzeba wywołać stan zapalny, np. eksperymentalne zapalenie mózgu lub rdzenia kręgowego [16]. To powoduje powstanie sytuacji odmiennej niż w normalnym mózgu, co może wpływać na uzyskiwane wyniki. Stan zapalny w układzie nerwowym wytworzony eksperymentalnie może powodować napływ komórek krwiopochodnych mających za zadanie wspomaganie endogennych makrofagów w reakcji na uszkodzenie, a nie być odbiciem naturalnej migracji tych komórek w celu odnawiania populacji mikrogleju.

Inne badania wskazują, że udział komórek pochodzenia szpikowego w mózgu rozwijającym się może być większy niż w dojrzałym. De Groot i wsp. [5] niszczyli szpik kostny myszy jedno- i trzydziestodniowych przez naświetlenie promieniowaniem jonizującym. Jako dawców szpiku używali zwierząt transgenicznych. Do komórek tych zwierząt wprowadzano bakteriofaga  $\gamma$ , który wbudowywał się do DNA komórki. Następnie w różnym czasie po zabiegu identyfikowali w mózgu biorcy komórki z genomem dawcy. Okazało się, że dużo komórek przypominających makrofagi miało bakteriofaga  $\gamma$  zintegrowanego z DNA, ale znajdowały się one głównie w oponach, komorach mózgowia i niekiedy w ścianach naczyń krwionośnych. W samym mózgu komórki dawcy występowały w mózdzku, rdzeniu przedłużonym i spoidle wielkim, przy braku ich w istocie szarej i stanowiły zaledwie 10% wszystkich obserwowanych komórek mikrogleju. Udział procentowy komórek dawcy był podobny we wszystkich badanych okresach po zabiegu, co według autorów mogło wskazywać, że komórki te napłynęły do układu nerwowego we wczesnym okresie po urodzeniu. Ponieważ jednak duża liczba komórek mikrogleju nie wykazywała cech dawcy, uważali oni, że populacja tych komórek jest heterogenna i tylko niewielka ich część wykształca się z komórek pochodzenia szpikowego, a zdecydowana większość z występujących lokalnie prekursorów, być może pochodzenia ektodermalnego. Wydaje się prawdopodobne, że niewielka liczba komórek



dawcy obserwowana w mózgu biorcy związana była z tym, że po urodzeniu tylko niewiele spośród nich może jeszcze przechodzić do układu nerwowego, zanim dojrzeje bariera krew-mózg. Możliwe, że ich napływ do układu nerwowego zachodzi jedynie we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego, zaś w dojrzałym mózgu jest niewielki. Poza tym na przedstawione wyniki mógł wpłynąć sam fakt naświetlania zwierząt promieniowaniem jonizującym, które powoduje obumieranie przede wszystkim dzielących się komórek, również w układzie nerwowym. W związku z tym komórki układu odpornościowego mogą napływać do miejsc degeneracji komórek, co nie musi być związane z naturalnym zasiedlaniem mózgu przez monocyty. Dlatego też można przypuszczać, że monocyty mają zdolność przechodzenia do mózgu przez barierę krew-mózg, jeżeli wystąpią zmiany patologiczne, ale niekoniecznie proces ten musi odbywać się w zdrowej tkance, po osiągnięciu dojrzałości. Ponadto istnieje możliwość bardzo wczesnego w rozwoju embrionalnym zasiedlania układu nerwowego przez makrofagi płodowe, z których powstaje mikroglej [13]. Dlatego też po urodzeniu może występować jedynie niewielki napływ komórek krwiopochodnych przez dojrzewającą barierę krew-mózg.

Poparciem dla hipotezy o monocytarnym pochodzeniu mikrogleju są badania nad przebiegiem rozwoju mikrogleju u myszy pozbawionych grasicy. U zwierząt tych upośledzone jest wydzielanie przez limfocyty T czynników regulujących hematopoezę i wpływających na dojrzewanie komórek pochodzenia szpikowego. Htain i wsp. [12] stwierdzili, że w takim przypadku zagęszczenie komórek mikrogleju w różnych rejonach mózgu, a przede wszystkim w korze mózgowej i w spoidle wielkim, było mniejsze niż u zwierząt normalnych. Świadczyć to może, że komórki mikrogleju rzeczywiście powstają z komórek krwiopochodnych. Z drugiej strony występowanie ich, chociaż w mniejszej liczbie, można wytłumaczyć tym, że część limfocytów T może przedostawać się przez łożysko matki do organizmu płodu i wpływać na przebieg rozwoju komórek krwiopochodnych, a zarazem mikrogleju. Poza tym dojrzewanie komórek układu odpornościowego u tych zwierząt może odbywać się w śledzionie i naczyniach limfatycznych. Pozwala to wyjaśnić niewielkie różnice między liczbą komórek mikrogleju u myszy bez grasicy a myszami normalnymi. Przede wszystkim doświadczenie to wykazuje, że zaburzenia rozwoju komórek krwiopochodnych mają wpływ na kształtowanie się populacji mikrogleju, co może świadczyć o ich bliskich związkach z komórkami krwiopochodnymi.

Również badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują na związek mikrogleju z linią komórek krwiopochodnych. Interesujących wyników dostarczyły badania Eglitis i Mezey [6]. Wykorzystali oni zdolność komórek pochodzenia szpikowego, transplantowanych do organizmu biorcy, do zasiedlania jego tkanek. Dawcami komórek szpikowych były samce myszy C57BL/J. Część komórek szpikowych wyznakowano genem oporności na neomycynę ( $neo^R$ ). Następnie tak przygotowane komórki podawano samicom myszy szczepu WBB6F1/J-Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>, które mają genetycznie uszkodzone komórki szpikowe. Po transplatacji przeprowadzono hy-

brydyzację *in situ*, aby wykryć gen neo<sup>R</sup> i białko GFAP (ang.: *glial fibrillary acidic protein*), występujące w komórkach astrocytów, w skrawkach mroźeniowych uzyskanych z mózgow w różnym czasie po zabiegu. Wykrywano także obecność chromosomu Y samców w komórkach. Komórki mające albo gen neo<sup>R</sup>, albo chromosom Y były obecne w różnych rejonach mózgowia, co dowodzi, że pochodziły one z komórek szpikowych dawcy. Udało się również obliczyć, że liczba komórek, która dostaje się do parenchymy mózgu, waha się od 500 w 3 dniu po transplantacji do 2000 po 2–4 tygodniach, a u niektórych zwierząt nawet do 10000. Autorzy tych badań uważają, że liczby te świadczą o dość intensywnym napływie komórek pochodzenia szpikowego. Poza tym stwierdzili, że część komórek mająca gen neo<sup>R</sup> lub chromosom Y była wyznakowana przez przeciwciała F4/80. O ile można się było tego spodziewać, to jednak zadziwiające jest, że w komórkach pochodzących od dawcy stwierdzono obecność GFAP, białka cytoszkieletowego charakterystycznego dla astrocytów. Znaczyłoby to, że także astrocyty mogą w pewnych warunkach powstawać z komórek szpikowych. Zastanawiające jest, że tylko około 10% komórek pochodzących od dawcy wykazywało antygeny charakterystyczne dla mikrogleju. Bardzo podobne wyniki otrzymano w badaniach ze zwierzętami naświetlanymi promieniowaniem jonizującym [5, 16]. Ich wyniki mogą wskazywać na niewielki, ale jednak stały napływ komórek krwiopochodnych przez barierę krew-mózg do układu nerwowego. Należy podkreślić, że wyniki przedstawione przez Eglitis i Mezey świadczą o występowaniu dwu istotnych zjawisk: przedostawaniu się komórek pochodzenia szpikowego do parenchymy dojrzałego mózgu i ich udziale w tworzeniu populacji mikrogleju.

Również badania *in vitro* potwierdzają hipotezę o ścisłych związkach mikrogleju z linią komórek krwiopochodnych. Sievers i wsp. [33, 34] hodowali komórki mikrogleju razem z astrocytami. Okazało się, że w takich warunkach początkowo małe, okrągłe komórki różnicowały się do form ameboidalnych, a następnie do w pełni rozgałęzionych form spoczynkowego mikrogleju. Ponadto hodowali oni także w ten sam sposób monocyty pobrane z krwi i makrofagi ze śledziony. Stwierdzili, że zarówno monocyty, jak i makrofagi zachowywały się w hodowli tak samo jak komórki mikrogleju. Ich podziały i różnicowanie morfologiczne przebiegały identycznie jak w przypadku mikrogleju, a komórki rozgałęzione powstałe z monocytów i makrofagów nie różniły się morfologicznie i antygenowo od mikrogleju spoczynkowego [33, 34]. Wyniki te mogą wskazywać na słuszność hipotezy o istnieniu układu fagocytów jednojądrowych, które powstają ze wspólnych prekursorów w szpiku kostnym, a pod wpływem mikrośrodowiska różnicują się do specyficznych makrofagów tkankowych podobnie jak mikroglej w układzie nerwowym czy komórki Kupffera w wątrobie. Jednocześnie badania te dowiodły, że aby komórki krwiopochodne napływające do układu nerwowego przekształciły się w mikroglej, wymagana jest obecność astrocytów tworzących specyficzne warunki środowiskowe, gdyż mikroglej nie rozwijał się w hodowli z fibroblastami.

Przedstawione badania wskazują, że komórki mikrogleju pozostają w ścisłym związku z komórkami krwiopochodnymi. Jednakże ich bezpośrednimi prekursorami prawdopodobnie nie są monocyty, ale makrofagi płodowe. Taka hipoteza wyjaśnia zarówno zbieżne w czasie pojawienie się w okresie płodowym mikrogleju ameboidalnego i monocytów, jak i bardzo zbliżone cechy morfologiczne i funkcjonalne tych dwóch rodzajów komórek. Jak sugerują Hurley i Streit [13], makrofagi płodowe i/lub komórki prekursorowe makrofagów zasiedlają układ nerwowy, stając się ameboidalnym mikroglejem, występującym w charakterystycznych grupach, który następnie migruje do otaczającej je parenchymy. Tam z kolei rozgałęziają się, przyjmując stopniowo wygląd typowego mikrogleju spoczynkowego. Kurz i Christ [15] stwierdzili, że pierwsze makrofagi, obserwowane w rozwoju embrionalnym, które następnie przekształcają się w embrionalny mikroglej [2, 3, 4, 29], nie zasiedlają układu nerwowego przechodząc przez ściany naczyń, ale w zdecydowanej większości przez powierzchnię oponową. Twierdzą, że komórki te we wczesnym rozwoju embrionalnym migrują z woreczka żółtkowego do embrionu, a następnie dzielą się w zawiązku układu nerwowego na tyle intensywnie, aby można było wyjaśnić obserwowaną tam liczbę makrofagów [2]. Taka interpretacja nie wyklucza możliwości, że we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego monocyty napływające do mózgu w wyniku reakcji zapalnej mogą później osiedlać się i przekształcać w mikroglej rozgałęziony. Możliwy wydaje się także dodatkowy napływ komórek pochodzenia szpikowego do normalnego i uszkodzonego mózgu po zakończeniu rozwoju embrionalnego i po osiągnięciu dojrzałości [6, 9].

## A MOŻE JEDNAK NEUROEKTODERMA?

Oprócz badań wskazujących na związki mikrogleju z układem fagocytów jednojądrzastych narasta liczba faktów przemawiających za neuroektodermalnym pochodzeniem mikrogleju. Zakładają one, że mikroglej powstaje z glioblastów, komórek macierzystych neurogleju, obecnych w komorowej, a później w okołokomorowej strefie rozwijającej się cewki nerwowej. W tym przypadku populacja komórek mikrogleju byłaby odgałęzieniem linii glejowej. Ponadto komórki odpowiedzialne za odnawianie się populacji astrogleju i oligodendrocytów w dojrzałym mózgu mogłyby brać udział również w odnawianiu populacji mikrogleju.

Użycie hodowli komórek neopalium i neuroepitelium dostarczyło nowych interesujących danych o pochodzeniu komórek mikrogleju. Aby sprawdzić, czy neuroektoderma może być źródłem komórek prekursorowych mikrogleju, Hao i wsp. [10] hodowali komórki neuroepitelium pobrane z 8,5-dniowych embrionów myszy, czyli przed powstaniem sieci naczyniowej. Na tym etapie rozwoju nie występują jeszcze makrofagi płodowe i monocyty. Aby mieć pewność, że do hodowli nie zostały przeniesione żadne komórki mezodermalne, na wyciętą tkankę działali trypsyną, aby oddzielić przyczepione do niej inne komórki. Tak pobraną tkankę ho-



dowano przez 10 dni, regularnie co 2–3 dni zmieniając pożywkę. W 10 dniu hodowli 95% komórek miało białko GFAP, którego występowanie jest charakterystyczne dla astrocytów. Potem zaprzestano zmieniania pożywki, stwarzając warunki deprywacji pokarmowej. Po upływie 10–12 dni od zaprzestania podawania składników pokarmowych, w hodowli pojawiały się komórki przejawiające ekspresję receptorów składnika układu dopełniacza 3 (CR3), występującą u mikrogleju i monocytów [17, 25, 38, 40, 41], przy jednoczesnym zaniku komórek GFAP pozytywnych. Wyniki pozwoliły autorom na stwierdzenie, że komórki przypominające makrofagi, które pojawiają się w hodowli poddanej deprywacji pokarmowej, pochodzą z komórek linii astrocytarnej. Zaobserwowali ponadto, że mimo iż w okresie, kiedy zostały pobrane komórki, neuroepitelium, monocyty i makrofagi płodowe jeszcze nie występują, to w hodowli pojawiają się komórki mikrogleju. Na tej podstawie przyjęli tezę, że mikroglej pochodzi z multipotencjalnych komórek neuroektodermalnych, a nie mezodermalnych [7, 10].

Rozwijając ten model doświadczalny, Neuhaus i Fedoroff [30] hodowali komórki pobrane z neopallium nowo narodzonych myszy. Używając ponownie przeciwciał Mac-1 w celu wykrycia ekspresji CR3, stwierdzili po około 2 tygodniach od ostatniej zmiany pożywki gwałtowny wzrost liczby komórek Mac-1-pozytywnych (Mac-1+). Ponadto, w ciągu pierwszego tygodnia hodowli zaledwie 0,1% komórek było Mac-1+ przy średnio 50% zawartości komórek GFAP+. Począwszy od 9 dnia od ostatniej zmiany pożywki nastąpiły dwa zjawiska:

(1) gwałtowny spadek liczby komórek GFAP+, do zaledwie 5% w 14 dniu deprywacji pokarmowej i

(2) wzrost liczby komórek Mac-1+ do 60% również w 14 dniu deprywacji.

O ile w pierwszym okresie hodowli dzielące się komórki stanowiły 15% wszystkich komórek w hodowli, o tyle wraz z chwilą zaprzestania podawania składników pokarmowych podziały stopniowo spadły. Autorzy tej pracy [30] znaleźli jedynie kilka dzielących się komórek Mac-1+. Na tej podstawie wysunęli pogląd, że komórki prekursorowe mikrogleju w neopallium są w stanie nieaktywnym, natomiast w przypadku ograniczonego dostępu do składników pokarmowych, pod wpływem czynników wydzielanych przez astrocyty, przekształcają się w komórki Mac-1+. Zaproponowali hipotezę, że komórki, które początkowo zawierały GFAP, prawdopodobnie astrocyty, w wyniku zmian w mikrośrodowisku przekształciły się bez podziałów w komórki Mac-1+, czyli mikroglej.

Richardson i wsp. [32] przeprowadzili eksperyment podobny do wyżej opisanych. Również w tej pracy autorzy stwierdzają, że komórki prekursorowe mikrogleju są morfologicznie i antygenowo nierozróżnialne od komórek prekursorowych astrocytów. Zauważyli, że aby komórki w tych hodowlach przekształciły się w mikroglej, wymagane jest prawdopodobnie określone stężenie czynników troficznych. Świadczy o tym fakt, że mikroglej nie pojawiał się w przypadku bardzo małej liczby komórek w hodowli lub przy częstym zmienianiu pożywki. Jeżeli natomiast komórek w

hodowli było co najmniej  $2 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup> lub nie zmieniano pożywki, mikroglej pojawiał się. Ponadto oszacowali, że co najmniej 12% komórek neopallium pobranych do hodowli mogło się przekształcać w mikroglej. Komórki te były Mac-1-, F4/80-, GFAP-, ale zawierały wimentynę.

Fedoroff i wsp. [8] zbadali także możliwość pojawiania się komórek, które miałyby antygeny charakterystyczne zarówno dla astrocytów, jak i mikrogleju. Komórki neopallium hodowali przez 8–10 dni, w pożywce zawierającej CSF-1 w różnych stężeniach i zmienianej co 2–3 dni. W tak prowadzonych kulturach stwierdzili występowanie komórek Mac-1+/GFAP+, których liczba zależała od stężenia CSF-1 w pożywce. Występowały także komórki jedynie GFAP+ jak i Mac-1+. Znaleźli również pewną liczbę komórek, które były zarówno GFAP, jak i Mac-1 negatywne. Być może były to prekursorzy wspólne dla astrocytów i mikrogleju. Wyniki przedstawione przez Fedoroffa i wsp. [8], a zwłaszcza wpływ stężenia CSF-1 na rozwój komórek mikrogleju sugerują, że astrocyty i mikroglej pochodzą z jednej linii komórkowej, a ich transformacja do komórek określonego typu zależy od mikrośrodowiska. Twierdzą oni, że mogą występować dwie odrębne populacje mikrogleju: jedna, która napływa do układu nerwowego we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego i pozostaje makrofagami, oraz druga, która w rozwoju postnatalnym dominuje, a powstaje z komórek związanych z linią astroglejową i jest populacją komórek, z których później powstaje mikroglej spoczynkowy.

Również badania *in vivo* dostarczyły pewnych informacji mogących świadczyć o neuroektodermalnym pochodzeniu mikrogleju [7, 21, 22]. W rozwoju embrionalnym komórki płytki dennej (ang. *floor plate*) różnicują się bardzo wcześnie [21, 22]. Przekształcają się one w szew glejowy (ang. *glial raphe*) w miarę, jak tworzy się cewka nerwowa [22]. Zbudowany jest on z komórek glejowych, tworzących oś pośrodkową ciągnącą się poprzez most i rdzeń kręgowy, rozdzielając ich brzuszne części na dwie symetryczne połowy. Od około 11 dnia rozwoju embrionalnego komórki glejowe płytki dennej barwią się na obecność lipokortyny 1 (LC-1+), białka wiążącego wapń [21, 22]. W okresie od dnia 15 do 18 intensywność barwienia jest największa, a później stopniowo spada [22].

Począwszy od 1 tygodnia życia w pobliżu szwu pojawiają się pojedynczo małe, okrągłe komórki LC-1+. W dalszym rozwoju zwiększa się ich liczba, a w obszarach bardziej oddalonych od szwu można zaobserwować rozgałęzione komórki LC-1+. W 4 tygodniu życia, w pobliżu zanikającego szwu gromadzi się duża liczba komórek LC-1+ zarówno ameboidalnych, jak i rozgałęzionych. Od 6 tygodnia rozwoju postnatalnego, rozgałęzione komórki LC-1+ obecne są już w całym układzie nerwowym, zarówno w istocie białej jak i szarej. Mają one wiele wypustek, a niektóre otaczają nimi ściany naczyń krwionośnych. Komórki te wybarwiają się lektynami *Bandeirea simplicifolia* BSI-B<sub>4</sub>, a nie stwierdzono w nich natomiast białka S100β, co sugeruje, że nie są to astrocyty, ale najprawdopodobniej komórki mikrogleju [22]. Ponadto komórki LC-1+ podlegają aktywacji w przypadku różnych uszkodzeń układu ner-

wowego, zwiększając swoją liczbę i przekształcając się w fagocyty [26]. Wydaje się więc prawdopodobne, że komórki rozgałęzione LC-1+ opisywane przez McKanna [21, 22] mogą być komórkami mikrogleju, powstającymi z komórek glejowych znajdujących się w szwie płytki dennej tyłomózgowia i rdzenia kręgowego. Sugeruje to określoną sekwencję rozwoju komórek LC-1+. W linii pośrodkowej w szwie występują najpierw komórki glejowe. Następnie w jego sąsiedztwie pojawiają się komórki ameboidalne, a później, w odległości większej niż 100  $\mu\text{m}$  od szwu, komórki rozgałęzione. Począwszy od 6 tygodnia rozgałęzione komórki LC-1+ są równomiernie rozrzucone w układzie nerwowym [43]. Według McKanna [21, 22], ten przebieg wskazuje na różnicowanie się komórek glejowych szwu w komórki mikrogleju, poprzez znane z innych badań formy pośrednie. Jednakże trudność w interpretacji tych wyników stwarzają wątpliwości, czy lipokortyna 1 może być uznana za marker mikrogleju. We wcześniejszych badaniach stwierdzono bowiem, że oprócz mikrogleju [24], występuje ona także w neuronach [11] i astrocytach [27]. Z kolei McKanna i Fedoroff oraz McKanna i Zhang [23, 24] uważają, że to jedynie mikroglej wykazuje ekspresję tego białka. Twierdzą, że lipokortyna-1 jest bardzo wrażliwa na warunki utrwalania tkanki, powszechnie stosowane w badaniach. Na podstawie własnych doświadczeń utrzymują, że immunoreaktywność neuronów i astrocytów jest artefaktem wynikającym ze sposobu utrwalania tkanki [23, 24].

Opisane w tym rozdziale prace nad hodowlami komórek neuroepitelium sugerują możliwość powstawania komórek mikrogleju z komórek neuroektodermy [7, 8, 10, 21, 22, 32]. Wydaje się jednak, że z dużą ostrożnością należy podchodzić do wyników badań *in vitro*. Mimo całej swojej użyteczności stwarzają one sytuację, która nie występuje *in vivo*. Powstawanie komórek zbliżonych morfologicznie i antygenowo do mikrogleju, zwłaszcza z komórek pobranych wcześniej w rozwoju embrionalnym, może być świadectwem możliwości plastycznych komórek, które w naturalnych warunkach mogą nigdy nie być realizowane.

## PODSUMOWANIE

Trudno jednoznacznie rozstrzygnąć, z jakiego rodzaju komórek powstaje mikroglej. Niektórzy autorzy sugerują, że fakt, iż mikroglej i makrofagi mają podobne antygeny i funkcje, nie musi świadczyć o ich wspólnym pochodzeniu, a komórki mikrogleju mogą powstawać również z neuroektodermy. Jednakże większość cech i dane o przebiegu rozwoju mikrogleju świadczą najsilniej o ich związkach z układem fagocytów jednojądrzastych. Z drugiej natomiast strony, wyniki części badań przeczą tej tezie wskazując na istnienie komórek rodowych wspólnych dla astrocytów i mikrogleju. Co ciekawe, niektóre badania [5, 6, 16] z jednej strony wskazują na możliwość zasiedlania układu nerwowego przez komórki krwiopochodne, przekształcające się następnie do mikrogleju rozgałęzionego, a z drugiej przemawiają za neuroektodermalnym pochodzeniu mikrogleju. Możliwa do przyjęcia jest hipoteza



De Groot [5], że populacja mikrogleju jest heterogenna. W tej sytuacji jej część tworzyłyby komórki związane z linią monocytarną, a pozostała miałaby związki z linią astrocytów, a więc powstawałaby z neuroektodermy. Biorąc pod uwagę zdecydowaną przewagę dowodów na powiązania mikrogleju i komórek linii monocyty/makrofagi, zarówno rozwojowe jak i funkcjonalne, większość autorów przychyliła się do hipotezy o pochodzeniu mikrogleju z komórek krwiopochodnych. Sievers et al. [33] nawiązując do wyników badań McKanna [21, 22], Fedoroff i wsp. [8], Hao i wsp. [10], Richardson i wsp. [32] sugerują, iż neuroektoderma w rozwoju embrionalnym może być zasiedlana przez komórki pochodzące z otaczającej ją mezodermy/mezenchymy i nie mające antygenów charakterystycznych dla w pełni zróżnicowanych monocytów, przez co nie można było stwierdzić ich obecności w hodowlach neuroepitelium. Takie komórki mogłyby napływać do zawiązków układu nerwowego bardzo wcześnie w rozwoju embrionalnym, jeszcze przed wykształceniem sieci naczyniowej, dzielić się i przekształcać do obserwowanego, prymitywnego mikrogleju [28, 33, 34]. Podobna sytuacja występuje w wątrobie, gdzie komórki Kupffera pojawiają się przed powstaniem szpiku i sieci naczyniowej [28]. Hipoteza ta wydaje się prawdopodobna i dobrze wyjaśnia wyniki uzyskane z różnych badań nad przebiegiem rozwoju komórek mikrogleju w układzie nerwowym. Dalsze badania mogą ją potwierdzić lub dostarczyć nowych informacji, które przeważą szalę na korzyść jednej z przedstawionych tutaj hipotez.

## LITERATURA

- [1] ASHWELL K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev Brain Res* 1991; **58**: 1–12.
- [2] COSSMANN PH, EGGI PS, CHRIST B, KURZ H. Mesoderm-derived cells proliferate in the embryonic central nervous system: Confocal microscopy and three-dimensional visualization. *Histochem Cell Biol* 1997; **107**: 205–213.
- [3] CUADROS MA, MARTIN C, COLTEY P, ALMENDROS A, NAVASCUES J. First appearance, distribution, and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol* 1993; **330**: 113–129.
- [4] CUADROS MA, MOUJAHID A, QUESADA A, NAVASCUES J. Development of microglia in the quail optic tectum. *J Comp Neurol* 1994; **348**: 207–224.
- [5] DE GROOT CJA, HUPPES W, SMINIA T, KRAAL G, DIJKSTRA CD. Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive *in situ* hybridization and immunoperoxidase techniques. *Glia* 1992; **6**: 301–309.
- [6] EGLITIS MA, MEZEY E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *PNAS* 1997; **94**: 4080–4085.
- [7] FEDOROFF S. Development of microglia. [w] Kettenmann H, Ransom BR [red.] *Neuroglia*. Oxford University Press, New York 1995: 162–181.
- [8] FEDOROFF S, ZHAI R, NOVAK JP. Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 1997; **50**: 477–486.
- [9] GEHRMANN J, KREUTZBERG GW. Microglia in experimental neuropathology. [w] Kettenmann H, Ransom BR [red.] *Neuroglia*. Oxford University Press, New York 1995: 883–904.

- [10] HAO C, RICHARDSON A, FEDOROFF S. Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: Characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int J Dev Neurosci* 1991; **9**: 1–14.
- [11] HELL JW, WESTENBROEK RE, WARNER C, AHLJANIAN MK, PRYSTAW W, GILBERT MM, SNUTCH TP, CATTERALL WA. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol* 1993; **123**: 949–962.
- [12] HTAIN WW, LEONG SK, LING EA. A comparative Mac-1 immunocytochemical and lectin histochemical study of microglial cells in the normal and athymic mice. *Glia* 1994; **12**: 44–51.
- [13] HURLEY SD, STREIT WJ. Microglia and the mononuclear phagocyte system. [w] Ling EA, Tan CK, Tan CBC [red] Topical issues in microglia research. Singapore Neuroscience Association, Singapore 1996: 1–20.
- [14] KAUR C, LING EA, WONG WC. Transformation of amoeboid microglial cells into microglia in the corpus callosum of the postnatal rat brain. An electron microscopical study. *Arch Histol Jpn* 1985; **48**: 17–25.
- [15] KURZ H, CHRIST B. Embryonic CNS macrophages and microglia do not stem from circulating, but from extravascular precursors. *Glia* 1998; **22**: 98–102.
- [16] LASSMANN H, SCHMIED M, VASS K, HICKEY WF. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 1993; **7**: 19–24.
- [17] LEHRMANN E, CHRISTENSEN T, ZIMMER J, DIEMER NH, FINSEN B. Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *J Comp Neurol* 1997; **386**: 461–476.
- [18] LI YB, KAUR C, LING EA. Labelling of amoeboid microglial cells and intraventricular macrophages in fetal rats following a maternal injection of a fluorescent dye. *Neurosci Res* 1997; **28**: 119–125.
- [19] LING EA, PENNEY D, LEBLOND CP. Use of carbon labelling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the „ameboid cells” present in the corpus callosum of postnatal rats. *J Comp Neurol* 1980; **193**: 631–657.
- [20] LING EA, WONG WC. The origin and Nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts. *Glia* 1993; **7**: 9–18.
- [21] MCKANNA JA. Lipocortin 1 immunoreactivity identifies microglia in adult rat brain. *J Neurosci Res* 1993; **36**: 491–500.
- [22] MCKANNA JA. Primitive glial compartments in the floor plate of mammalian embryos: Distinct progenitors of adult astrocytes and microglia support the notoplate hypotheses. *Perspect Dev Neurobiol* 1993; **1**: 245–255.
- [23] MCKANNA JA, FEDOROFF S. Development of microglia *in situ* and in cultures. [w] Ling EA, Tan CK, Tan CBC [red.] Topical issues in microglia research. Singapore Neuroscience Association, Singapore 1996: 21–42.
- [24] MCKANNA JA, ZHANG MZ. Immunohistochemical localization of lipocortin I in rat brain is sensitive to pH, freezing, and dehydration. *J Histochem Cytochem* 1997; **45**: 527–538.
- [25] MCRAE A, GILLAND E, BONA E, HAGBERG H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Dev Brain Res* 1995; **84**: 245–252.
- [26] MEZLER P, ZHANG MZ, MCKANNA JA. Infraorbital nerve transection and whisker follicle removal in adult rats affect microglia and astrocytes in the trigeminal brainstem. A study with lipocortin-1 and S100beta-immunohistochemistry. *Neuroscience* 1997; **80**: 459–472.
- [27] MULLENS L, MARRIOT DR, YOUNG KA, TANNAHIL L, LIGHTMAN SL, WILKIN GP. Up-regulation of lipocortin-1 and its mRNA in reactive astrocytes in kainate-lesioned rat cerebellum. *J Neuroimmunol* 1994; **50**: 25–33.
- [28] NAITO M. Macrophage heterogeneity in development and differentiation. *Arch Histol Cytol* 1993; **56**: 331–351.

- [29] NAVASCUES J, CUADROS MA, ALMENDROS A. Development of microglia: Evidence from studies in the avian central nervous system. [w] Ling EA, Tan CK, Tan CBC [red] Topical issues in microglia research. Singapore Neuroscience Association, Singapore 1996: 43–64.
- [30] NEUHAUSS J, FEDOROFF S. Development of microglia in mouse neopallial cell cultures. *Glia* 1994; **11**: 11–17.
- [31] PERRY VH, HUME DA, GORDON S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience* 1985; **15**: 313–326.
- [32] RICHARDSON A, HAO C, FEDOROFF S. Microglia progenitor cells: A subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 1993; **7**: 25–33.
- [33] SIEVERS J, PARWARESCH R, WOTTGE H-U. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes: Morphology. *Glia* 1994; **12**: 245–258.
- [34] SIEVERS J, SCHMIDTMAYER J, PARWARESCH R. Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells when cultured on astrocytes. *Ann Anat* 1994; **176**: 45–51.
- [35] SOROKIN SP, HOYTRF, BLUNT DG, MCNELLY NA. Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver and lungs of rat embryos as revealed by lectin marker. *Anat Record* 1992; **232**: 527–550.
- [36] STREIT W. Microglial cells. [w] Kettenmann H, Ransom BR [red] Neuroglia. Oxford University Press, New York 1995: 85–96.
- [37] TAKAHASHI K, YAMAMURA F, NAITO M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: A light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukocyte Biol* 1989; **45**: 87–96.
- [38] WANG CC, WU CH, SHIEH JY, WEN CY, LING EA. Immunohistochemical study of amoeboid microglial cells in fetal rat brain. *J Anat* 1996; **189**: 567–574.
- [39] WU CH, CHIEN HF, CHANG CY, LING EA. Heterogeneity of antigen expression and lectin labelling on microglial cells in the olfactory bulb of adult rats. *Neurosci Res* 1997; **28**: 67–75.
- [40] XU J, KAUR C, LING EA. Variation with age in the labelling of amoeboid microglial cells in rats following intraperitoneal or intravenous injection of a fluorescent dye. *J Anat* 1993; **182**: 55–63.
- [41] XU J, LING EA. Expression of major histocompatibility complex class II antigen on amoeboid microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of lipopolysaccharide. *Exp Brain Res* 1994; **100**: 287–292.
- [42] XU J, LING EA. Upregulation and induction of major histocompatibility complex class I and II antigens on microglial cells in early postnatal rat brain following intraperitoneal injections of recombinant interferon-gamma. *Neuroscience* 1994; **60**: 959–967.
- [43] ZHANG MZ, MCKANNA JA. Gliogenesis in postnatal rat optic nerve: LC1+ microglia and S100-beta+ astrocytes. *Dev Brain Res* 1997; **101**: 27–36.
- [44] ZIAJA M. Mikroglej: makrofagi ośrodkowego układu nerwowego. *Post Biol Kom* 1995; **22(2)**: 179–194.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 24.07.1998 r.

Przyjęto: 10.12.1998 r.

Adres autora: ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków



## KOMUNIKATY

### VII OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA BIOLOGII KOMÓRKI THE VII<sup>TH</sup> POLISH CONFERENCE ON CELL BIOLOGY

Uprzejmie informujemy, że VII Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki zostanie zorganizowana w 1999 roku, w dniach 9 (środa) do 12 (sobota) września, w Krakowie.

Za organizację Konferencji z upoważnienia Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki odpowiedzialni będą profesorowie: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda i Stanisław Przystański.

Zainteresowanych prosimy o śledzenie dalszych komunikatów.

**First Announcement.** The VIIth Polish Conference on Cell Biology will be organized in Cracow, on 9 (Wednesday) to 12 (Saturday) September 1999.

For the organization of Conference the professors: Tadeusz Cichocki, Włodzimierz Korohoda and Stanisław Przystański have been chosen by the Polish Cell Biology Society.

Please keep attention to the forthcoming communicates.

### INTERNATIONAL SYMPOSIUM on Molecular and Clinical Aspects of Regulation of Ovarian Function: Impact on the Reproductive Health of Women

October 6–10 1999, New Delhi, India

(includes a Workshop on Ovulation: Lessons from in vitro Approaches)

#### Topics to be discussed include:

*Hypothalamo-pituitary-ovarian axis, molecular biology of steroid hormone synthesis and action, interovarian regulators of follicular maturation, ovulation and atresia, regulation of luteal function, hormone replacement therapy, ovarian carcinoma*

#### Organizers:

Dr A. K. Mukhopadhyay, IHF, Grandweg 64, D-22529 Hamburg

**email:** mukhopadhyay@ihf.de **Tel.:** (+49 40) 561908-20/23, **Fax:** (+49 40) 561908-64

Dr Anand Kumar, Dept. of Reproductive Physiology, AIIMS, New Delhi 110029, India

**email:** anand@medinst.ernet.in **Fax:** (+9111) 6862663



## W. Mejsbaum-Katzenellenbogen's Molecular Biology Seminars

### 6. LIPOSOMES AND RELATED STRUCTURES

June 10–12, 1999, Wrocław/Szklarska Poręba, Poland

*General Objective of the Seminar:* To discuss recent advances in construction and application of liposomes and related vesicular structures in biomembrane modeling and delivery of therapeutic agents.

*The scientific programme* will include plenary lectures by invited speakers (30+10 min) and oral and poster presentation. Oral communications (15+5 min) will be chosen from the abstracts send by participants.

*The main topics of the seminar are:*

- Monolayers, Bilayers and Liposomes – Laboratory practice
- Proteoliposomes and Biomembrane Reconstitution
- Cationic Lipids and Nucleic Acids
- Liposomes as Carriers in Drug Delivery
- Non-liposomal Vesicular and Submicron Delivery Systems
- Other Applications of Liposomes

Poster presentations may relate to the Seminar themes or to other areas of lipids, amphiphiles and membrane structure.

The Seminar will be held in a resort of Szklarska Poręba near Jelenia Góra. Szklarska Poręba is situated in the south-west Poland in the scenic Sudety Mountains. Participants will be offered accommodations which will be placed in the easy walking distance of the lecture auditorium and restaurants.

*Preliminary list of invited speakers:* T. M. Allen (CA), D. Arndt (DE), G. Betageri (USA), J. R. Chantres (ES), A. Fahr (DE), D. Hoekstra (NL), P. Kinnunen (FI), B. Kloesgen (DE), J.-Y. Legrende (FR), L. Leserman (FR), J. Monkkonen (FI), N. Oku (JP), G. Rapp (DE), G. Scherphof (NL), R. Schwendener (CH), M. Sentjurs (SL), E. Touitou (IL), R. Zeisig (DE).

The second announcement containing further details of the scientific and social programme of Seminar will be send in March 1999. Please register using an appropriate form of the first announcement or on-line registration form to ensure receipt of the second and final announcement.

Please send all requests related to the Seminar to:

Organising Committee of Mejsbaum-Katzenellenbogen's Seminar  
 6. LIPOSOMES IN BIOLOGY AND MEDICINE  
 Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Wrocław University  
 Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, Poland  
 tel/fax +48 (71) 3252930

E-mail: meisem@angband.microb.uni.wroc.pl  
 or visit Seminar www Page at: <http://angband.mirob.uni.wroc.pl/biochem/sem-99.htm>

Early application is advised as the Liposome Seminar is limited to 150 persons.

## Wskazówki przygotowania rysunków do publikacji w PBK

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

Cennik odbitek prac dla Autorów w 1997 r.

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

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

### Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

#### *Prenumerata na rok 1999*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1999 na konto:

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

Cena prenumeraty rocznika na rok 1999:

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

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1999 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa;  
Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa  
account No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 20 dollars USA.



## Od Redakcji

Od stycznia 1999 roku Czytelnicy „Postępów Biologii Komórki” otrzymają zeszyty ze zmienioną okładką. Tytuł i informacje na okładce będą w języku polskim i angielskim. Nową okładkę opracowała Zofia Zawada z V klasy Państwowego Liceum Sztuk Plastycznych im. W. Gersona w Warszawie. Dla udostępnienia naszego czasopisma również Czytelnikom za granicą, będziemy prosić Autorów o obszerniejsze streszczenia do artykułów publikowanych w „Postęпах”.

„W tym Zeszytcie PBK” służy zaangażowanym Czytelnikom, gdyż oprócz skróconej informacji o artykule można tam często znaleźć informacje o wcześniejszych publikacjach na temat zbliżony do treści artykułu, bez zasięgnięcia informacji u innych osób.

Roczna prenumerata „Postępów” kosztuje zaledwie 20 złotych. Naprawdę każdy student, asystent, adiunkt czy profesor może sobie pozwolić na taki roczny wydatek. Wygoda z posiadania zeszytów „Postępów” pod ręką, na półce w pracy czy w domu jest duża. Publikujemy artykuły z bardzo różnych dziedzin biologii komórki i napewno każdy znajdzie tam coś interesującego dla siebie, jak również może poszerzyć swoje wiadomości o problemy, którymi na codzień się nie interesuje.

*Miło jest nam przekazać wiadomość, że Nagrodę Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w roku 1998 otrzymał dr Zbigniew Polański z Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytutu Zoologii UJ w Krakowie za prace:*

a) Genetic background of differences in timing of meiotic maturation in mouse oocytes: a study using recombinant inbred strains. *J Reprod Fertil* 1997, 109, 109–114.

b) Strain difference in timing of meiosis resumption in mouse oocytes: involvement of a cytoplasmic factor(s) acting presumably upstream of the dephosphorylation of p34<sup>cdc2</sup> kinase. *Zygote* 1997, 5, 105–109.

*Dyplom nagrody chcielibyśmy wręczyć podczas VII Ogólnopolskiej Konferencji Biologii Komórki, która odbędzie się w dniach 9–12 września 1999 r. w Krakowie. Zapraszamy na tę uroczystość.*

Prof. dr hab. Jerzy Kawiak

Prof. dr hab. Zofia Osuchowska

Prezes Fundacji Biologii Komórki  
i Biologii Molekularnej

Przewodnicząca Komisji Nagród  
Fundacji Biologii Komórki  
i Biologii Molekularnej

Warszawa 2 grudnia 1998 r.







# INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązują terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedzialnej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

## POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszcza:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 20 stron maszynopisu i do 100 pozycji bibliograficznych w zasadzie z ostatnich 5 lat (do 10% pozycji bibliograficznych starszych);

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 216) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy; w pracy i domowy wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym ( np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

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

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in Physarum polycephalum. Exptl Cell Res 1980: 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rysunków powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę, cennik w PBK. Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora.

Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu,

Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została

tabela i rycin.

tak nie

tak nie

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę.

tak

nie

Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

tak nie

Jest zgoda osób, których informacje niepubli-

tak

nie

plik i użytego programu edycyjnego z komputera IBM

tak nie

kowane są zamieszczone w tekście artykułu

tak

nie

Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn.

tak nie

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda-

kcyj i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

podpis

## TREŚĆ

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

**Indeks 369705**