P 2435 db

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 17-NR 1'90
(1–96)

Wydawnictwo SGGW-AR,
Fundacja ●Rozwój SGGW-AR●

http://rcin.org.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk oraz Urzędu Postępu Naukowo-Technicznego i Wdrożeń

Redaguje Kolegium:
Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wicenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA, Maciej ZABEL

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

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

Do Czytelników i Autorów POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI ostatnio ukazują się z dużym opóźnieniem, co jednak powinno się poprawić. Bardzo zależy nam na wspólnym z Czytelnikami i Autorami redagowaniu czasopisma – mamy ambicje łącznika. Prosimy więc o listy do redakcji uzupełniające wiadomości zawarte w publikowanych artykułach oraz krytyczne opinie naukowe, ale też opinie na temat organizacji naszego czasopisma. W nowych wskazówkach dla Autorów staramy się podkreślić znaczenie aktualności nadsyłanych informacji naukowych przedstawiając konieczność opierania nadsyłanych artykułów na najnowszej literaturze, której tak brakuje w kraju. Bardzo zależy nam na wspieraniu naszych działań przez Czytelników i Autorów, czego widocznym wyrazem będzie również prenumerata pisma.

Warszawa, lipiec 1990 *Redakcja*

Wydawnictwo SGGW-AR, Fundacja •ROZWÓJ SGGW-AR•
Nakład 500 + 30 egz. Ark. wyd. 10,5 Ark. druk. 6,0 Cena zł 30 000. Zam.
Oddano do składu 15.05.1990 r. Podpisano do druku w sierpniu 1990 r. Druk ukończono we wrześniu 1990 r.

http://rcin.org.pl

FITOCHROM PIERWOTNY MECHANIZM DZIAŁANIA

PHYTOCHROME - PRIMARY MECHANISM OF ACTION

Andrzej TRETYN, Jan KOPCEWICZ, Anna PAWLAK

Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Streszczenie. Fitochrom (*P*) występuje w dwu formach molekularnych P_r i P_{fr} wykazujących maksimum absorpcji odpowiednio przy 660 i 730 nm. P_{fr} jest aktywną formą fitochromu. *P* kontroluje przebieg procesów krótko- i długotrwałych. W przypadku procesów krótkotrwałych czas, jaki upływa od absorpcji światła do ujawnienia się odpowiedzi morfogenetycznej, jest rzędu ułamków sekundy do kilku minut. Zaliczyć do nich można ruchy szparek, nykinastie, zmiany potencjałów powierzchniowych i błonowych oraz zmiany przepuszczalności błon dla jonów. We wszystkich tych przypadkach działanie *P* polega na kontroli przepuszczalności błon dla jonów. *P* może brać udział w regulacji aktywności kanałów jonowych, a zwłaszcza kanałów wapniowych. Przypuszcza się, że *P* reguluje morfogenezę roślin przez kontrolę wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia.

Summary. Phytochrome (*P*) exists in two molecular forms: P_r and P_{fr} with maximum absorption at 660 and 730 nm, respectively. P_{fr} is an active form of *P*. The pigment controls both long- and short-term responses. In the short-term responses, the time elapsing between light absorption and morphogenetic response is in the range of a second to several minutes. These processes comprise stomatal apparatus movement, nykinasties, changes of surface and membrane potentials and membranes permeability for ions. In all these cases, *P* activity may consist in modification of membrane properties leading to changes in ion transport. It seems that *P* can regulate ion channel activity especially calcium one. It also believes that phytochrome may regulate same plant morphogenetic processes by controlling intercellular concentration of Ca^{2+}.

Wykaz stosowanych skrótów. FR – światło dalekiej czerwieni (730 nm), *Gp* – białko wiążące *GTP*, *HIR* – reakcja wysokoenergetyczna, *IP* – fosfatydyloinozytol, *LFR* – reakcja niskoenergetyczna, *P* – fitochrom, P_{fr} – forma fitochromu absorbująca światło dalekiej czerwieni, P_r – forma fitochromu absorbująca światło czerwone, *R* – światło czerwone (660 nm), *VLFR* – reakcja bardzo niskoenergetyczna.

WSTĘP

Światło wpływa na wzrost i rozwój roślin. Jego energia przetwarzana w procesie fotosyntezy na energię wiązań chemicznych stanowi podstawę egzystencji wszystkich organizmów roślinnych naszej planety. Wykształcenie u roślin mechanizmów percepcji

http://rcin.org.pl

światła oraz jego spektralnej jakości pozwoliło na pełniejsze wykorzystanie energii świetlnej podczas fotosyntezy. Jednym z barwników roślinnych biorącym udział w percepcji światła przez roślinę jest fitochrom (*P*). Został on wykryty u przedstawicieli wszystkich dotąd przebadanych roślin niższych i wyższych. Jego molekularne właściwości scharakteryzowano poprzednio [77]. Obecnie przedstawione zostaną niektóre poglądy na temat pierwotnego mechanizmu działania *P*.

WŁAŚCIWOŚCI FITOCHROMU

Poza chlorofilem *P* jest najlepiej poznanym barwnikiem roślinnym. Poniżej przedstawione zostaną niektóre właściwości *P*.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE

P dzięki swoim molekularnym właściwościom działa jako detektor światła rejestrujący jego natężenie oraz właściwości spektralne. Właściwością wyróżniającą *P* spośród innych barwników roślinnych jest możliwość jego występowania w dwu, wzajemnie fotoodwracalnych formach: P_r wykazujących maksimum absorpcji przy 660 nm i P_{fr} – przy 730 nm [77]. Widma absorpcyjne obu form *P* pokrywają się w pewnym zakresie. Powoduje to, że w określonych warunkach świetlnych powstaje stan równowagi stacjonarnej, który jest stanem charakteryzującym ilościowy stosunek obu form *P* [36]. Przy naświetlaniu rośliny światłem w zakresie 660 nm około 80% całej ilości fitochromu ($P_{tot} = P_r + P_{fr}$) przechodzi w formę P_{fr}. Przy naświetlaniu rośliny światłem dalekiej czerwieni (FR) tylko 3% fitochromu znajduje się w formie P_{fr} [36]. Obie formy *P* są termodynamicznie stabilne w fizjologicznym zakresie temperatur. Fotokonwersja *P* zachodzi w wyniku powstawania kolejnych pośredników, przy czym są one odmienne w przypadku fototransformacji P_r w P_{fr} i P_{fr} w P_r [32]. Poza tym u roślin dwuliściennych stwierdzono istnienie tzw. ciemniowej rewersji *P* polegającej na przekształceniu P_{fr} w P_r bez udziału czynników świetlnych [36].

WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNE

Masa molowa *P*, w zależności od gatunku, waha się od 120 do 127 kDa [80]. Dwie cząsteczki fitochromu tworzą fizjologicznie aktywny dimer [26]. Cząsteczka *P* składa się z części białkowej oraz chromoforu zbudowanego z otwartego pierścienia tetrapirolowego zbliżonego do fikocyjanobiliny [77]. *P* syntetyzowany jest w ciemności jako P_r i w tej formie podlega on akumulacji [80]. P_r jest bardzo stabilny w ciemności, natomiast jego fotokonwersja do P_{fr} wiąże się z szybkim zanikiem spektrofotometrycznie i immunochemicznie wykrywalnego *P* [80]. Degradacja *P* w formie P_{fr} jest procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie obserwuje się szybki zanik znacznych ilości P_{fr} ($t_{0.5}$ = 1–2 h), w drugim natomiast pozostała jego część ulega znacznie powolniejszej destrukcji ($t_{0.5}$ = 7–8 h) [22].

Przy użyciu metod immunochemicznych wykazano, że białkowy składnik fitochromu izolowanego z etiolowanych roślin jest odmienny od białka *P* wyodrębnionego z zielonych roślin. Powyższe dane wskazują, że w roślinach występują dwie populacje *P*. Stosując za kryterium podziału tempo degradacji P_{fr} wyróżniono fitochrom tzw. labilny i stabilny [29]. Fitochrom labilny jest szybko syntetyzowany w ciemności i równie szybko degradowany na

http://rcin.org.pl

świetle. *P* stabilny charakteryzuje się zarówno wolnym tempem syntezy P_r, jak i degradacji P_{fr}. Ta pula *P* występuje we wszystkich stadiach rozwojowych rośliny (poza roślinami etiolowanymi) i utrzymuje się na podobnym poziomie w ciemności, jak i na świetle [29]. Obie pule *P* kontrolują przebieg różnych procesów lub współdziałają w regulacji tych samych stadiów rozwojowych rośliny.

WŁAŚCIWOŚCI FIZJOLOGICZNE

Światło w szerokim zakresie natężenia kontroluje fotomorfogenezę roślin. Ilość energii niezbędnej do pełnej ekspresji określonego procesu jest wielkością stałą. *P* reguluje reakcje stymulowane dawkami energii zarówno niskimi, jak i bardzo wysokimi. Z tego względu wszystkie procesy kontrolowane przez *P* dzielimy na trzy kategorie [38]:

- reakcje niskoenergetyczne (*low fluence responses* – LFR)
- reakcje bardzo niskoenergetyczne (*very low fluence responses* – VLFR)
- reakcje wysokoenergetyczne *(high irradiance responses* – HIR).

Do zaindukowania LFR potrzeba światła czerwonego (R) o natężeniu rzędu $1-10^3$ $\mu mol \cdot m^{-2}$. Typowymi reakcjami niskoenergetycznymi są: kiełkowanie nasion, wzrost łodygi i liści oraz szereg zmian natury metabolicznej [36]. Reakcje te wykazują całkowitą odwracalność przez R/FR, a efekt końcowy zależy od tej długości światła, która była podana jako ostatnia. Niektóre procesy, jak zmiany modelu wzrostu roślin wyrosłych w ciemności, mogą być modyfikowane przez niezmiernie niskie natężenia światła [54] rzędu $10^{-4} - 10^{-1}$ $\mu mol \cdot m^{-2}$ [38]. Tego rzędu natężenia światła są zbyt niskie, aby zainicjować fotokonwersję *P*. Procesy stymulowane tak niskimi dawkami energii nazywamy reakcjami bardzo niskoenergetycznymi (VLFR). Charakteryzują się one tym, że nie wykazują odwracalności pod wpływem R/FR [7, 38].

Niektóre procesy fotomorfogenezy indukowane są przez duże dawki energii podawane jednorazowo lub w dłuższym okresie czasu, np. podczas wzrostu rośliny w ciągłym świetle. Tego typu reakcje nazwano wysokoenergetycznymi (HIR) [18, 41]. Widmo czynnościowe dla HIR wykazuje maksimum przy 720 nm i niebieskim zakresie fal świetlnych [40, 41]. Poza fitochromem w regulacji HIR uczestniczyć może inny barwnik roślinny, operujący w zakresie krótkich fal świetlnych, tzw. kryptochrom [7]. Należy zaznaczyć, że udział reakcji niskoenergetycznych w regulacji danego procesu nie eliminuje udziału reakcji wysokoenergetycznych. Zwykle w kontroli fotomorfogenezy współuczestniczą te dwa typy reakcji.

WPŁYW ŚWIATŁA NA WŁAŚCIWOŚCI BŁON

Analizując różne procesy wzrostu i rozwoju roślin regulowane przez *P*, stwierdza się znaczne różnice, jakie występują od czasu indukcji świetlnej do momentu ujawnienia się odpowiedzi morfogenetycznej. Na przykład dla kiełkowania nasion czy też inicjacji zakwitania czas ten wynosi od wielu dni do tygodni [31]. Są to procesy charakteryzujące się dużą złożonością, których regulacja polegać może na wpływie światła na aktywność genetyczną rośliny [31, 38]. Istnieje jednak szereg zjawisk kontrolowanych przez *P*, jak np. nykinastyczne ruchy liści, zmiany potencjałów powierzchniowych i błonowych, które z racji ich szybkich przebiegów (minuty, sekundy) trudno tłumaczyć w podobny sposób jak regulację

http://rcin.org.pl

przez *P* kiełkowania nasion [31, 38]. Wydaje się zatem, że może istnieć kilka odmiennych mechanizmów, za pomocą których *P* kontroluje fotomorfogenezę. Regulacja ta może zachodzić na wielu poziomach i dotyczyć kontroli aktywności genów oraz właściwości błon. Już odkrywcy fitochromu Hendricks i Borthwick [20] zaproponowali, że pierwotne działanie *P* polega na modyfikacji właściwości błon. Koncepcja ta, z pewnymi zmianami i uzupełnieniami, jest w dalszym ciągu aktualna.

EFEKT TANADY

Jednym z pierwszych opisanych krótkotrwałych procesów kontrolowanych przez *P* był tzw. "efekt Tanady" [70]. Jego odkrywca wykazał, że R stymuluje przyleganie wierzchołków korzeni do szkła, FR natomiast podane po R powoduje ich uwalnianie [70]. Do prawidłowego przebiegu tego procesu niezbędna jest obecność wielu substancji w środowisku, w tym zwłaszcza jonów wapniowych [70, 85]. Brak Ca^{2+} w środowisku bądź obecność jego chelatorów zakłócały prawidłowy przebieg efektu Tanady [70, 85]. Mechanizmem, za pomocą którego *P* może kontrolować przyleganie wierzchołków do ujemnie naładowanych powierzchni szklanych, jest transport kationów, zwłaszcza protonów.

Naświetlanie wierzchołków korzeni R powoduje sekrecję H^+ do środowiska. Podobnie do R działa acetylocholina [24]. Substancja ta dodana do środowiska stymulowała sekrecję H^+ i przyleganie wierzchołków korzeni do szkła. Zróżnicowany transport H^+ i innych jonów może prowadzić do powstawania zmian potencjałów powierzchniowych komórek roślinnych. Jaffe [23] wykazał, że R stymuluje powstawanie dodatnich, FR natomiast ujemnych potencjałów powierzchniowych wierzchołków korzeni fasoli. Badania prowadzone nad efektem Tanady wykazały, że działanie *P* polegać może na kontroli transportu jonów związanego z powstawaniem odpowiednich potencjałów powierzchniowych. Ujawniły one szczególny udział jonów wapnia w tych procesach [24, 85].

RUCHY NASTYCZNE

Nastie są to nieukierunkowane ruchy roślin wywołane różnego typu bodźcami środowiskowymi. Zachodzą one w organach o budowie grzbieto-brzusznej. Ruchy te powstają w wyniku nierównomiernego wzrostu lub zróżnicowanych zmian turgoru komórek zlokalizowanych morfogenetycznie w górnej (grzbietowej) i dolnej (brzusznej) części organu, np. poduszeczki podliściowej. Sejsmonastyczne (stymulowane szokiem mechanicznym) składanie się listków mimozy (*Mimosa pudica*) związane jest ze zróżnicowanym ruchem K^+ [73] i Ca^{2+} [74] w obrębie tkanek i komórek dolnej i górnej strony poduszeczek. Zmiany lokalizacji wapniowych jonów wpływają na nierównomierne pęcznienie obu stron tych organów.

Poza bodźcami mechanicznymi również światło reguluje ruchy ogonków liściowych i liści mimozy [11]. Naświetlanie mimozy pod koniec dnia FR przeciwdziała składaniu się listków, natomiast R odwraca efekt FR [13]. Działanie R i FR na ruchy listków mimozy polega na wpływie fal świetlnych obu tych długości na rozmieszczenie K^+ w obrębie tkanek poduszeczki. Poprzedzające przepływ K^+ zmiany potencjałów błonowych komórek poduszeczki, sugerować mogą udział *P* w kontroli pomp jonowych lub/i regulacji aktywności kanałów jonowych [12, 13]. Poza K^+ w nykinastycznych, regulowanych przez *P* ruchach liści mimozy biorą także udział jony wapnia [79].

http://rcin.org.pl

Kontrolowane przez *P* nykinastyczne ruchy zaobserwowano również u *Albizzia* i *Samanea* [13, 37]. Nykinastie, zwane ruchami sennymi, charakteryzują się oscylacjami wynikającymi z dobowych zmian warunków świetlnych [12]. W poduszeczkach liściowych *Samanea* stwierdzono niezwykle wysokie stężenie potasu oraz nierównomierne jego rozmieszczenie. Zmiany lokalizacji K^+ w obrębie tych organów powodują ruchy liści.

W złożonych listkach *Samanea* w komórkach brzusznej części poduszeczki zawartość K^+ jest pięć razy większa niż w komórkach części grzbietowej, natomiast kiedy listki są otwarte, zawartość ta jest o połowę mniejsza [12]. R stymuluje zamykanie listków wpływając na spadek zawartości potasu po stronie grzbietowej i jego wzrost po stronie brzusznej poduszeczki [12, 57]. FR odwraca działanie R. Stymulowane R i FR zmiany transportu K^+ oraz H^+ związane są ze zmianami potencjałów błonowych komórek poduszeczki [57].

REGULACJA RUCHÓW SZPAREK

P reguluje ruchy szparek *Camelina communis* [61, 63]. Światło niebieskie i R indukują otwieranie się szparek tej rośliny [61]. Naświetlanie R podwyższa pobieranie $^{86}Rb^+$ przez protoplasty komórek szparkowych oraz wpływa na ich pęcznienie [62, 63]. Stymulacyjne działanie R odwracalne jest przez FR. Inhibitory kanałów potasowych: czteroetyloaminian (TEA), chinidyna i Cs^+ hamują stymulowanie R i otwieranie się szparek [62]. Przypuszcza się, że w plazmolemmie komórek szparkowych *Camelina* istnieją dwa typy kontrolowanych przez *P* kanałów potasowych: pierwszy typ wrażliwy na Cs^+ i TEA, drugi natomiast na chinidynę. *P* może oddziaływać bezpośrednio na TEA-wrażliwe kanały potasowe oraz pośrednio, przez wpływ na organizację błon na chinidyno-wrażliwe kanały potasowe [62].

POTENCJAŁY POWIERZCHNIOWE I BŁONOWE

Podobnie jak w komórkach zwierzęcych, również w komórkach roślin stwierdzono obecność potencjałów powierzchniowych i błonowych. Odkryto, że R i FR wpływają na ładunek powierzchniowy komórek koleoptyli owsa [48]. Zmiany potencjałów powierzchniowych obserwowano po upływie około 15 s od momentu rozpoczęcia naświetlania badanych organów. Były one wynikiem zmian w przepuszczalności błon dla jonów. W komórkach czapeczki korzeni fasoli *P* kontroluje rozmieszczenie ładunków powierzchniowych plazmolemmy [56]. Również w komórkach glonu *Mesotaenium* tzw. zeta potencjał, wynikający z obecności ładunków na powierzchni błony komórkowej jest kontrolowany przez *P* [68]. Stymulowany przez R spadek tegoż potencjału zależy od obecności Ca^{2+} w środowisku.

Poza wpływem na potencjały powierzchniowe *P* reguluje potencjały błonowe (transbłonowe). Przy użyciu mikroelektrod wykazano, że R stymuluje depolaryzację [55] lub hiperpolaryzację [49] błon komórek koleoptyli owsa. W obu wspomnianych przypadkach FR działało przeciwnie do R [49, 55]. Wpływ R i FR na zmiany potencjałów błonowych rejestrowano od 5 do 10 sekund od momentu zadziałania bodźca świetlnego. Ostatnio wykazano, że zmiany te ujawniają się już po 1 sekundzie od rozpoczęcia naświetlania koleoptyli R lub FR [47].

Kontrolowane przez *P* zmiany potencjałów błonowych obserwowano również w komórkach poduszeczek podliściowych *Samanea* [57], przy czym R powodowało hiperpolaryzację, a FR depolaryzację komórek górnej strony tych organów. Największy stopień hiperpolaryzacji pod wpływem pierwszego impulsu R obserwowano po około 10 min od

http://rcin.org.pl

zadziałania bodźca. Po kolejnych impulsach FR i R zmiany te obserwowano już po upływie 90 s od momentu rozpoczęcia naświetlania. Okazało się, że kontrolowane przez *P* zmiany potencjałów błonowych komórek poduszeczek liściowych *Samanea* wynikają ze zróżnicowanego wpływu R i FR na błonowy transport H^+ [58] oraz K^+, Na^+, Ca^{2+} [12]. Antagonistyczny wpływ R/FR na potencjały błonowe obserwowano w komórkach glonu *Nitella* [84]. Stymulowana R depolaryzacja błon tego glonu ujawniała się jedynie w obecności Ca^{2+} w środowisku. Zmiany te obserwowano od 0,4 do 3,5 s po rozpoczęciu działania bodźca świetlnego, a powrót do stanu równowagi 1 – 2 minuty od zakończenia naświetlania komórek R [84].

Kontrolowane przez *P* zmiany potencjałów błonowych obserwowano również w komórkach krótko- [50] i długodniowych gatunków *Lemna* [30]. W obu przypadkach R stymulowało depolaryzację błon komórek miękiszowych, podczas gdy FR ich niewielką, ale zauważalną hiperpolaryzację [30, 39]. Podobny wpływ R i FR odnotowano w przypadku komórek kory pierwotnej hypokotyli fasoli [4] oraz splątków żeńskich gematofitów paproci [59]. Zmiany potencjałów powierzchniowych i błonowych należą do najszybszych procesów kontrolowanych przez *P* [31, 54].

PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON DLA JONÓW

R hamowało pobieranie K^+ przez siewki grochu, a FR znosiło inhibicyjny efekt R [35]. *P* regulował ponadto pobieranie P_i (fosforu nieorganicznego) i K^+ przez segmenty kolanek hypokotyli fasoli. R obniżało w porównaniu do kontroli absorpcję obu tych pierwiastków przez wspomniane segmenty [71]. Najwyższy stopień pobierania P_i i K^+ obserwowano 5 minut po rozpoczęciu naświetlania tkanek R. FR nie wywierało żadnego wpływu na badany proces, natomiast znosiło działanie R [71].

P uczestniczył w kontroli pobierania P_i, K^+, H^+ i Cl^- przez komórki hypokotyli fasoli. Barwnik ten przeciwstawnie wpływał na pobieranie wspomnianych pierwiastków przez dwa kolejne, 25-milimetrowe segmenty hypokotyli izolowane poniżej kolanek siewek. W przypadku segmentów apikalnych R stymulowało pobieranie K^{+86} (Rb^+), i Cl^- i P_i oraz sekrecję H^+ do środowiska. Natomiast w segmentach dystalnych R hamowało pobieranie K^+, Cl^- i P_i oraz sekrecję H^+ inkubacyjnego [4, 5].

Stosując jako materiał badawczy fragmenty tkanek roślinnych nie można wyeliminować udziału ścian komórkowych w procesie absorpcji jonów. Proces ten może być znacznie szybszy niż transport jonów przez plazmolemmę i tonoplast. Marmè [43] sugerował, że udział *P* w pobieraniu jonów może polegać na regulacji ilości wolnych, dodatnio i ujemnie naładowanych miejsc wiążących jony w ścianie komórkowej.

Na aktywny udział symoplastu w regulacji przepuszczalności błon dla jonów wskazują badania prowadzone w protoplastach liści soi. Przy ich użyciu Piwowarczyk [51] wykazał, że R stymuluje pobieranie K^+ przez protoplasty soi i wydzielanie przez nie H^+ do środowiska, FR natomiast znosi działanie R [51].

O udziale *P* w regulacji pobierania Ca^{2+} przez komórki roślinne pisano uprzednio [76]. Przy użyciu mikroautoradiografii wykryto, że R stymuluje pobieranie Ca^{2+} przez komórki glonu *Mougeotia* [9]. Podobny mechanizm działania R wykryto stosując technikę absorpcji atomowej oraz radioaktywnego wapnia, a jako materiału badawczego zarodniki paproci *Onoclea* [83], wycinki etiolowanych koleoptyli owsa [75] oraz protoplasty kukurydzy [8]. We wszystkich tych przypadkach naświetlanie FR po R stymulowało wypływ Ca^{2+} z

http://rcin.org.pl

komórek [9], obniżało tempo pobierania [8] bądź akumulacji [75, 83] jonów wapnia zewnątrz badanych komórek.

Przeciwne do opisanych powyżej wyniki uzyskano stosując wiążący się z Ca^{2+} barwnik – muroksyd (sól amonowa kwasu purpurowego). Przy jego zastosowaniu wykryto, że R hamuje napływ potasu, a FR stymuluje aktywny wypływ Ca^{2+} z protoplastów etiolowanych koleoptyli owsa [17] i protoplastów *Vallisneria gigantea* [69]. Przypuszcza się, że R działa dwustopniowo na pobieranie wapnia przez wspomniane komórki. W pierwszej fazie po naświetleniu komórek R następuje szybki napływ Ca^{2+} ze środowiska do cytoplazmy. Powoduje to, że w drugiej fazie następuje uwalnianie dużych ilości wapnia zgromadzonego we wnętrzu organelli komórkowych, a następnie jego usuwanie na zewnątrz protoplastu [65]. Taką sekwencję zdarzeń można było obserwować przy użyciu muroksydu, który nie wnikając do wnętrza komórek odzwierciedla zmiany stężenia Ca^{2+} w środowisku.

BŁONOWA LOKALIZACJA FITOCHROMU

Wpływ fitochromu na właściwości błon może wynikać z jego pośredniego lub bezpośredniego oddziaływania ze składnikami tych struktur. Oddziaływanie to może mieć różnorodny charakter:

1. Może wynikać z faktu, że *P* jest ich integralnym składnikiem lub też jest silnie związany z błonami.
2. *P* może być peryferyjnym białkiem błonowym.
3. Mogą istnieć odrębne populacje *P* występujące w cytozolu i powiązane z błonami.
4. *P* występuje w cytozolu i oddziałuje na błony przez wtórne przekaźniki.

Jak dotąd brak jest przekonywujących dowodów wskazujących na trwałe, silne powiązanie *P* z błonami komórkowymi. Szereg danych natomiast potwierdza możliwość funkcjonowania *P* jako peryferyjnego białka błonowego. Dane te uzyskano przede wszystkim w doświadczeniach prowadzonych na komórkach glonów oraz na organizmach zbudowanych z jednej warstwy komórek [19, 52, 81]. Wykazano, że R przez *P* kontroluje optymalną względem światła orientację chloroplastów glonu *Mougeotia*. Prawidłowy przebieg tego procesu zależy od obecności Ca^{2+} w środowisku i związany jest z wpływem *P* na właściwości plazmolemmy. Przy użyciu światłowodów, umożliwiających punktowe naświetlenie niewielkich fragmentów komórek *Mougeotia*, wykazano, że *P* występuje w peryferyjnej, podbłonowej warstwie cytoplazmy. Ponadto stwierdzono, że cząsteczki *P* zachowują się jak dipole, których lokalizacja względem płaszczyzny ściany komórkowej jest odmienna dla P_r i P_{fr}. Forma P_r fitochromu zlokalizowana jest równolegle, a P_{fr} prostopadle do wspomnianej płaszczyzny [19, 52].

Doświadczenia z użyciem światłowodów prowadzono również na komórkach splątka *Adiantum*. Podobnie jak u *Mougeotia*, w komórkach *Adiantum P* wykazuje dichroiczną orientację względem płaszczyzny ściany komórkowej [81]. W szczytowo rosnących komórkach splątka *Adiantum* obecność *P* stwierdzono jedynie tuż poniżej ich wierzchołków [81].

Jak dotąd trudno stwierdzić, czy w komórkach roślin wyższych ma miejsce podobna lokalizacja cząsteczek *P*. Wydaje się jednak, że rozmieszczenie *P* opisane w komórkach *Mougeotia* i *Adiantum* umożliwia im odbiór kierunkowej informacji niesionej przez światło. Ponieważ przebieg większości kontrolowanych przez *P* procesów wzrostu i rozwoju

http://rcin.org.pl

roślin wyższych nie zależy od kierunku dopływu informacji, wyżej opisane rozmieszczenie barwnika może być charakterystyczne tylko dla pewnych wyspecjalizowanych komórek np. *Mougeotia* i *Adiantum*.

Badanie lokalizacji *P* w roślinach wyższych ciągle nastręcza wiele problemów. W celu komórkowej i subkomórkowej lokalizacji *P* można zastosować dwie strategie. Po pierwsze rozmieszczenie *P* można badać in vivo przy użyciu spektrofotometrii lub immunocytochemicznie [52]. W drugim przypadku stosując obie wspomniane metody identyfikacji obecność *P* oznaczyć można w oczyszczonych frakcjach komórkowych zawierających wzbogacone ilości poszczególnych struktur komórkowych [52].

W wyniku frakcjonowania komórkowego i przy użyciu spektrofotometrii wykryto *P* powiązany z zewnętrznymi błonami etioplastów [10], chloroplastów [21] oraz mitochondriów [65]. Jego obecność stwierdzono również w błonach siateczki śródplazmatycznej i w plazmolemmie [44] oraz w otoczce jądrowej [82].

Trudno ocenić, czy obecność *P* związanego z błonami tak różnych struktur komórkowych odzwierciedla rzeczywistą, subkomórkową lokalizację tego barwnika. Być może jest to artefakt powstający w trakcie przygotowania poszczególnych frakcji do badań. Fakt, że żadna z subkomórkowych frakcji w porównaniu do surowego ekstraktu nie zawiera zwiększonej ilości *P* zdaje się wskazywać na tę drugą możliwość.

Nie rozstrzygnięto dotąd, który ze składników błon uczestniczy w wiązaniu fitochromu [50]. Pierwszych dowodów na interakcje *P* z lipidami dostarczyli Roux i Yguerabide [64]. Stosując modelowe błony uzyskane z utlenionego cholesterolu wykazali oni, że dodanie do nich P_r, izolowanego z pędów owsa, 5-krotnie obniża ich oporność elektryczną. Naświetlanie R powodowało dalszy 10-krotny spadek oporności elektrycznej badanej błony. FR odwracało efekt R [64]. Georgievich i wsp. [14] zaobserwowali, że około 90% *P* łączy się z liposomami, gdy barwnik ten występuje w formie P_{fr}, podczas gdy P_r nie łączył się z tymi błonami [34]. Wiązanie się P_{fr} z liposomami zachodziło jedynie w obecności cholesterolu. Na możliwość udziału cholesterolu w wiązaniu *P* wskazują również wyniki badań przeprowadzonych przez Roth-Bejerano i Kendricka [60]. Wykazali oni, że R in vivo i in vitro zwiększa tzw. osadzalność *P* (patrz niżej).

Cholesterol, stigmosterol oraz filipina hamowały stymulowaną przez R osadzalność barwnika. Jednoczesne podanie filipiny ze sterydami nie wpływało na wspomniany proces. Na tej podstawie Roth-Bejerano i Kendrick zasugerowali, że pierwotny mechanizm działania *P* może polegać na tworzeniu kompleksu P_{fr} ze sterydowymi składnikami błon komórkowych [60].

Wzbogacone w *P* błony izolowane z kolanek hypokotyli dyni poddane działaniu fosfolipazy C nie traciły właściwości wiązania tego barwnika. Enzym powodował uwalnianie ponad 80% choliny, natomiast nie wpływał na usuwanie z błon fitochromu [16]. Ustalono ponadto, że niskie stężenia dezoksycholiny przyczyniają się do dysocjacji *P* z omawianych struktur. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że *P* nie łączy się polarnymi grupami fosfolipidów, natomiast może oddziaływać z białkowymi składnikami błon komórkowych [16].

Wiele nowych informacji na temat właściwości molekularnych i rozmieszczenia *P* w komórkach dostarczyły badania immunochemiczne [10, 77]. Przy użyciu przeciwciał mono- i poliklonalnych skierowanych przeciw białkowemu komponentowi *P* wykazano, że mogą istnieć dwie populacje tego barwnika [50]. Odkryto, iż *P* związany z błonami, występujący w tkankach etiolowanych roślin jest immunologicznie odmienny od *P* rozpuszczalnego [28]. W wyniku proteolizy cząsteczek obu populacji *P* nie udało się stwierdzić istnienia między

http://rcin.org.pl

nimi różnic [28]. W etiolowanych tkankach od około 5 do 10% całego *P* wiązało się z błonami komórkowymi [27]. Pozostała część *P* uległa łatwiej ekstrakcji do buforów. Właściwości *P* zmieniały się po naświetleniu tkanek lub ekstraktów roślinnych R. Podczas wodnej ekstrakcji *P* około 60% barwnika wiązało się z błonami i ulegało wytrąceniu z roztworu. Proces ten nazwano osadzalnością fitochromu (ang. *pelletability*) [53]. Fotokonwersja P_r do P_{fr} prowadzi do szybkiej ($t_{0.5}$ = 2 s) asocjacji *P* z niezidentyfikowanymi strukturami komórkowymi. Proces ten zachodzi jedynie w roztworach ekstrakcyjnych zawierających wysokie stężenie dwuwartościowych kationów [53]. Na możliwość agregacji *P* ze strukturami komórkowymi in vivo wskazują wyniki badań cytochemicznych. W etiolowanych tkankach fitochrom (P_r) rozmieszczony jest równomiernie w cytozolu [45, 77]. Naświetlaniu roślin R towarzyszą szybkie zmiany (1–2 s) rozmieszczenia *P*. Obserwuje się agregację cząsteczek tego barwnika na obszarach o powierzchni rzędu 1 μm^2 [45]. Jednakże na terenie tych struktur nie stwierdzono występowania błon. Obserwowana in vitro osadzalność *P* odpowiada prawdopodobnie agregacji cząsteczek tego barwnika in vivo [45, 77].

Badania immunochemiczne nie potwierdziły błonowej lokalizacji *P*. Jednakże, nie można wykluczyć, że barwnik ten wykazuje zupełnie inne właściwości immunogenne, jeśli jest powiązany z błonami [50]. Stąd też nie można go zlokalizować stosując przeciwciała uzyskane przeciw cząsteczkom rozpuszczalnego *P* [29].

DZIAŁANIE FITOCHROMU NA POZIOMIE BŁON PRZEGLĄD HIPOTEZ

Od czasu gdy Hendriks i Borthwick [20] zaproponowali błonowy mechanizm działania *P*, wysuniętych zostało kilka hipotez dotyczących tego zagadnienia.

Jedną z pierwszych opublikował Smith [67]. Zakładała ona, że obie formy *P* wbudowane są w błony komórkowe. W wyniku fotokonwersji P_r w P_{fr} następuje transport metabolitu *X* z puli *X'* do X^0 występujących po obu stronach błony (rys. 1).

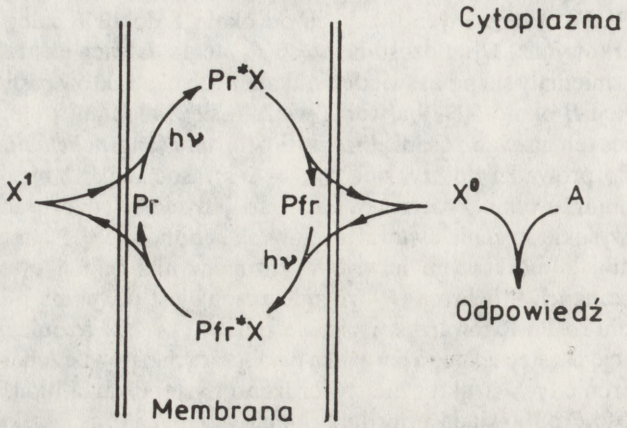
X^0 łącząc się z odpowiednim akceptorem *A* inicjuje odpowiedź morfogenetyczną. Przedstawiona hipoteza może tłumaczyć przebieg reakcji niskoenergetycznych (LFR), nic nie mówi natomiast o reakcjach wysokoenergetycznych (HIR).

Mechanizm (LFR) i (HIR) obrazuje model działania *P* opracowany przez Johnsona i Taskera [25]. Według wspomnianych autorów, podobnie jak w modelu Smitha, fotokonwersji P_r w P_{fr} towarzyszy transport metabolitu z puli *X'* do X^0 w cytoplazmie, co powodować może jego oddziaływanie z cząsteczkami P_{fr} prowadząc do powstania odpowiedzi morfogenetycznej [25] (rys. 2).

W przedstawionym modelu uwzględnia się rolę stężenia aktywnej formy *P*, jak i tempo cyklicznych przemian obu form barwnika. LFR tłumaczyć można powstawaniem odpowiedniego poziomu P_{fr}, natomiast HIR tempem cyklicznych konwersji obu form *P*.

Odkrycie u roślin kanałów jonowych, których aktywność może być regulowana przez *P*, doprowadziło do zaproponowania kolejnego modelu. Kendrick [31] zakładał mianowicie, że *P* łącząc się z białkowo-sterydowymi składnikami błon tworzyć może funkcjonalny kanał jonowy. Cykliczne konwersje P_r i P_{fr} i odwrotnie wpływają, według Kendricka, na kontrolę aktywności kanału (rys. 3).

http://rcin.org.pl

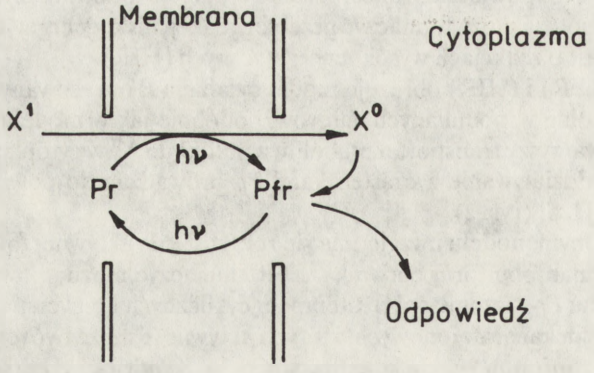


Rys. 1. Model działania fitochromu opracowany przez Smitha [67]

Działanie tych kanałów może być odmienne dla LFR i HIR. W przypadku LFR fotokonwersja P_r w P_{fr} prowadzi do otwarcia kanału i pasywnego transportu jonów przez błonę zgodnie z gradientem stężenia. W reakcjach HIR zachodzą cykliczne przekształcenia obu form *P*, co stymuluje wzmożony transport jonów przez kanał [31].

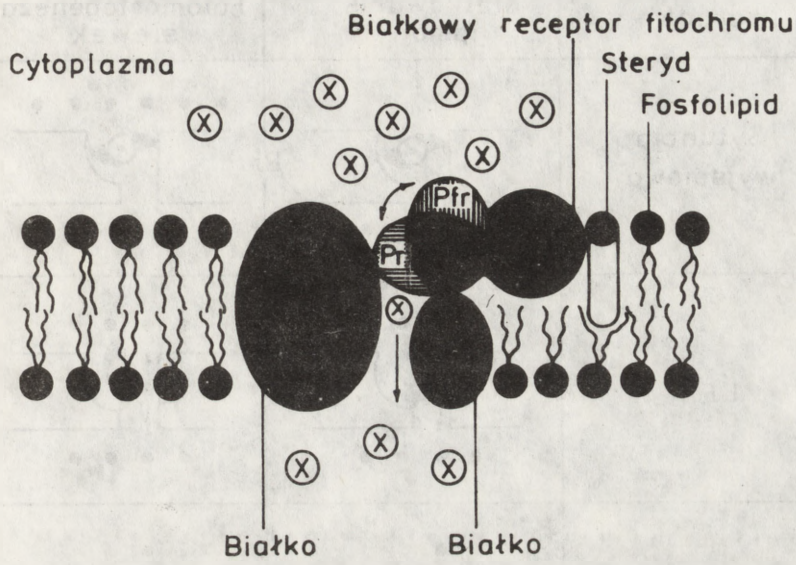
Hipoteza Hendricka [31] została rozwinięta przez Kendricka i Franklanda [33]. Wyjaśnia ona działanie *P* w kontroli kiełkowania nasion oraz wzrostu siewek. Model zakłada, że w plazmolemmie istnieją kanały, których aktywność regulowana jest przez *P*. Cząsteczki tego barwnika nie wchodzą w skład kanału, ale mogą otwierać go i zamykać (rys. 4).

W przypadku LFR fotokonwersja P_r w P_{fr} stymuluje otwieranie kanału, przez który zgodnie z gradientem stężeń zachodzi dyfuzja jonów lub metabolitów. Stałe, cykliczne konwersje obu form *P*, charakterystyczne dla HIR, powodowałyby aktywne "pompowanie" jonów lub metabolitów w poprzek błony komórkowej, również przeciw gradientowi stężeń.



Rys. 2. Model działania fitochromu opracowany przez Taskera i Johnsona

http://rcin.org.pl



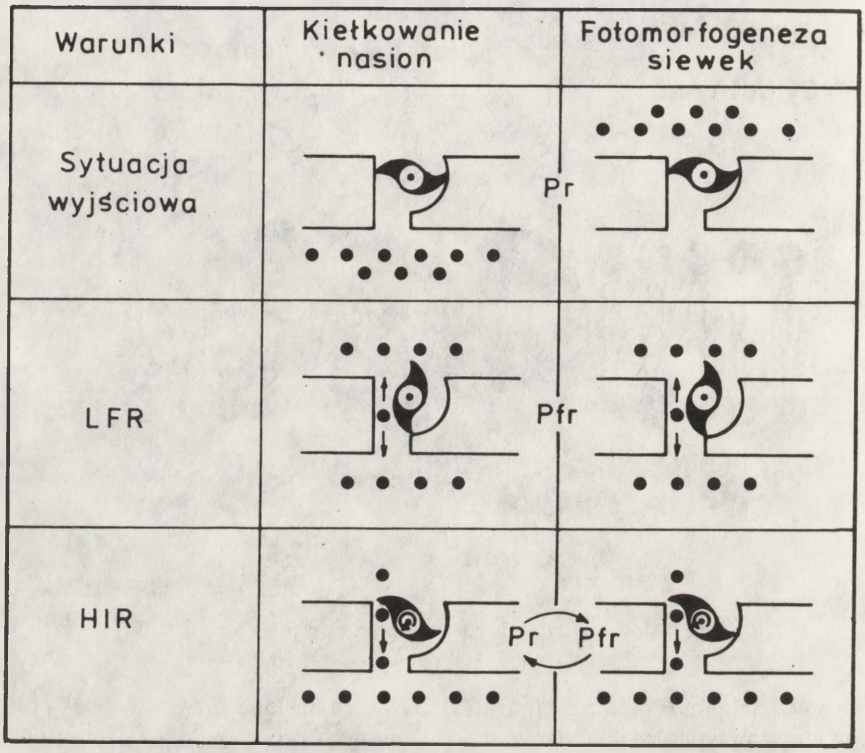
Rys. 3. Model działania fitochromu opracowany przez Kendricka [31]

Różnica w działaniu *P* podczas kontroli kiełkowania nasion i rozwoju siewek polegałaby na tym, że w przypadku pierwszego z wymienionych procesów dla HJR proponowana pompa działa przeciw gradientowi stężeń lub gradientowi elektrochemicznemu [33].

Z przedstawionego przeglądu hipotez opisujących mechanizm działania fitochromu widać, że w początkowym okresie badań nad tym barwnikiem zakładano jego obecność w błonach. Wraz z rozwojem technik immunochemicznych, które jak dotąd nie dostarczyły jednoznacznych dowodów wskazujących na występowanie *P* w błonach, zaczęto zakładać pośredni wpływ barwnika na właściwości błon komórkowych. Obecnie powszechnie akceptuje się wpływ *P* na aktywność kanałów jonowych. Pozostaje kwestią otwartą, jakiego typu kanały kontrolowane są przez *P*. Przeprowadzone obserwacje pozwalają sugerować, że są nimi kanały potasowe [62]. Aktywność tych kanałów może wynikać z wpływu *P* na transport Ca^{2+} [12]. Istnieje wiele dowodów eksperymentalnych potwierdzających udział *P* w regulacji aktywności kanałów wapniowych [78].

Zastosowanie do badań protoplastów liści pszenicy oraz różnego typu modulatorów zwierzęcych kanałów wapniowych pozwoliło określić, jakiego typu kanały wapniowe regulowane są przez *P*. Bossen i wsp. [2] wykazali, że kontrolowane przez *P* pęcznienie protoplastów etiolowanych liści pszenicy zachodzi jedynie w obecności Ca^{2+} w środowisku inkubacyjnym. Jonofor Ca^{2+} – A 23187, podobnie jak R, stymulował pęcznienie protoplastów. Z drugiej strony, inhibitory kanałów wapniowych: verapamil i La^{3+} znosiły działanie R. Ostatnio Bossen i wsp. [3] wykazali również, że w działanie *P* zaangażowane jest białko *G (G protein*, w skrócie G_P). Jest to białko błonowe wiążące GTP, którego struktura i funkcja zostały stosunkowo dobrze poznane u zwierząt [15]. Okazało się, że niehydrolizowane przez GTP-azę (enzym zlokalizowany na jednej z trzech podjednostek

http://rcin.org.pl



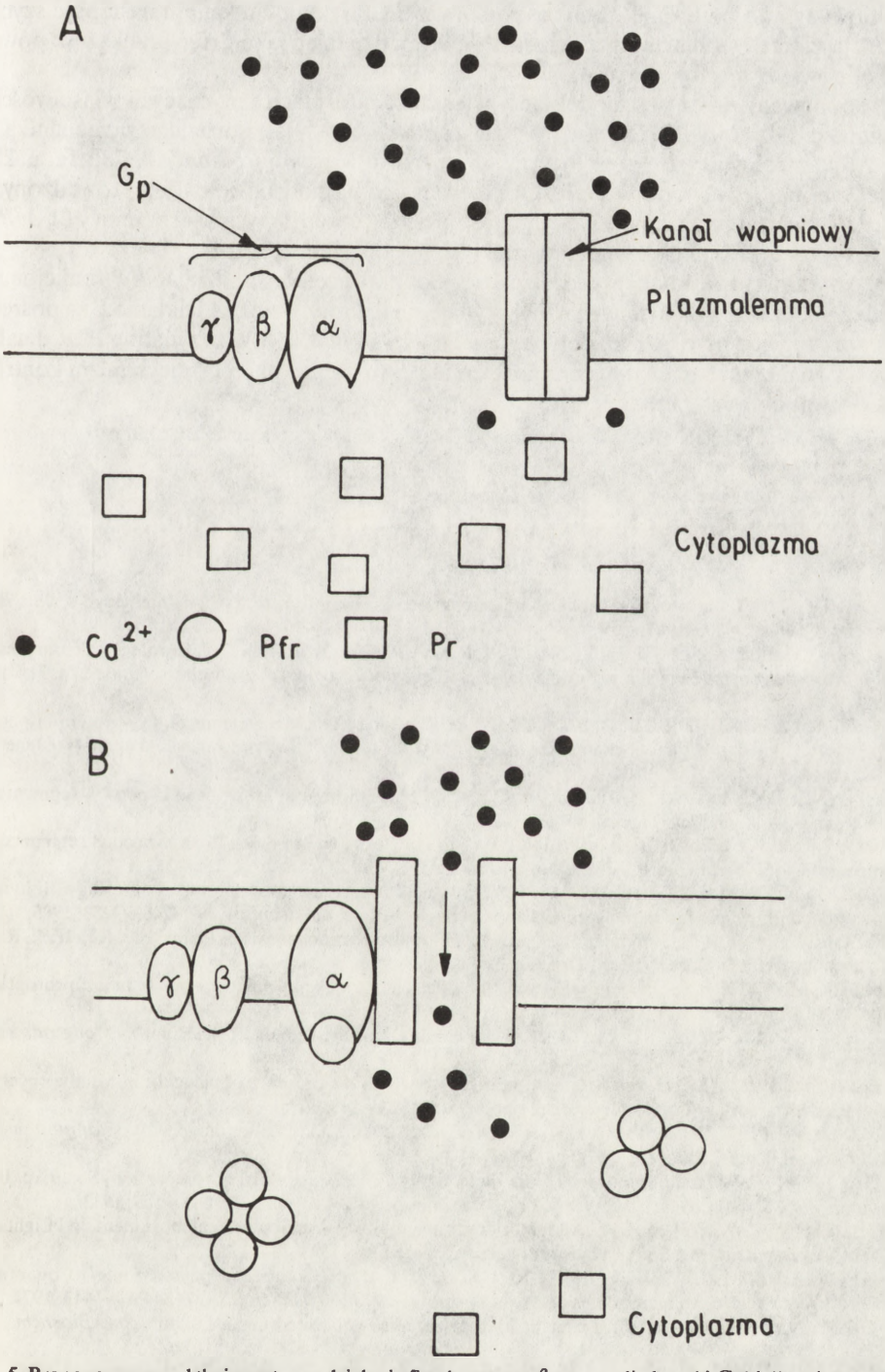
Rys. 4. Model działania fitochromu opracowany przez Kendricka i Franklanda [33]

G_p – [15]) zmodyfikowane nukleotydy guanidynowe *(GTP S)*, podobnie jak R, stymulują pęcznienie protoplastów. Inhibitor G_p – GDP–β–S znosił stymulacyjny wpływ R na badany proces [3]. U zwierząt G_p może kontrolować aktywność kanałów wapniowych [15]. Tretyn i wsp. [78] określili, jakiego typu kanały zależne od białka *G* kontrolowane są przez *P*. Przy użyciu agonistów i antagonistów owych kanałów ustalili, że *P* reguluje kanały wrażliwe na pochodne 1,4-dwuhydropirydynowe (DHP), odpowiadające zwierzęcym kanałom typu *L* [78].

Na podstawie badań nad zależnym od Ca^{2+} i kontrolowanym przez *P* pęcznieniem protoplastów liści pszenicy oraz dostępnej literatury proponujemy nowy model działania *P*. W modelu tym zakłada się, że *P* poprzez G_p wpływa na regulację kanałów wapniowych (rys. 5). G_p może bezpośrednio kontrolować aktywność wspomnianych kanałów lub pośrednio przez regulację metabolizmu *PI*.

W etiolowanych komórkach białko *G* występuje w formie zasocjowanej, w wyniku czego kanał jest zamknięty. Wewnątrz komórki *P* w formie P_r jest równomiernie rozmieszczony w cytozolu. Na zewnątrz komórki stężenie Ca^{2+} jest kilka rzędów wyższe niż w cytoplazmie. Po stymulacji komórki R większość *P* przechodzi w formę P_{fr}. Część cząsteczek P_{fr} przyłącza się do podjednostki α G_p, a jego nadmiar ulega "sekwestracji". Przyłączanie się P_{fr} stymuluje odłączenie się podjednostki α od β i γ, a ta w wyniku oddziaływania na kanał

http://rcin.org.pl



Rys. 5. Proponowany model pierwotnego działania fitochromu: α, β, γ – podjednostki G_p białka wiążącego GTP

http://rcin.org.pl

wapniowy typu *L* powoduje jego czasowe otwarcie. Po otwarciu kanału następuje szybki wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+}, który działając jako drugi przekaźnik powoduje odpowiedź morfogenetyczną.

Proponowany przez nas model łączy większość informacji dotyczących właściwości i mechanizmu działania *P*. Dotyczy to zwłaszcza roli Ca^{2+} jako drugiego przekaźnika w inicjacji kontrolowanych przez *P* procesów wzrostu i rozwoju roślin [64, 78]. Jednakże model ten ma pewne ograniczenia. Opracowano go na podstawie badań prowadzonych nad regulowanym przez *P* pęcznieniem protoplastów etiolowanych liści pszenicy [2, 3, 76]. Jest to typowa reakcja niskoenergetyczna [2].

W przyszłości należałoby stwierdzić, czy podobny mechanizm działania *P* funkcjonuje również podczas regulacji innych LFR. Wydaje się jednocześnie, że działanie *P* za pośrednictwem drugiego przekaźnika dotyczy przede wszystkim LFR. W przypadku HIR działanie fitochromu może mieć innych charakter. Należy również określić mechanizm kontroli kanałów wapniowych przez G_p.

Niniejsza praca powstała w trakcie badań prowadzonych w ramach problemu CPBP 05.02.4.07.

LITERATURA

[1] BERRIDGE, M. J., Inositol triphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers, *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 159–193, 1987.

[2] BOSSEN, M. E., DASSEN, H. H., KENDRICK, R. E., VREDENBERG, W. J., The role of calcium ions in phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts, *Planta* **174**: 94–100, 1988.

[3] BOSSEN, M. E., KENDRICK, R. E., VREDENBERG, W. J., The involvement of a G-protein in phytochrome-regulated swelling of etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.) protoplasts, *Planta* (wysłane do redakcji).

[4] BROWNLEE, C., KENDRICK, R. E., Ion fluxes and phytochrome in mung bean hypocotyl segments. I. Fluxes of potassium, *Plant Physiol.*, **64**: 206–210, 1979.

[5] BROWNLEE, C., KENDRICK, R. E., Ion fluxes and phytochrome in mung bean hypocotyl segments. II. Fluxes of Cl^-, H^+, and P_i in apical and sub-hook segments, *Plant Physiol.*, **64**: 211–213, 1979.

[6] CORDONNIER, M. M., GREPPIN, H., PRATT, L. H., Monoclonal antibodies with differing affinities to the red-absorbing and far-red-absorbing forms of phytochrome, *Biochemistry*, **24**: 3246–3253, 1985.

[7] COSGROVE, D. J., Photomodulation of growth, [w] Photomorphogenesis in Plants, red. Kendrick, R. E., Kronenberg, G. H. M., M. Nijhoff /Dr W. Junk Publ., Dordrecht, str. 341–366, 1986.

[8] DAS, R., SOPORY, S. K., Evidence of regulation of calcium uptake by phytochrome in maize protoplasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**: 1455–1460, 1985.

[9] DREYER, E. M., WEISENSEEL, M. H., Phytochrome-mediated uptake of calcium in *Mougeotia* cells, *Planta* **146**: 31–39, 1979.

[10] EVANS, A. E., SMITH, H., Spectrophotometric evidence for the presence of phytochrome in the envelope membranes of barley etioplasts, *Nature* (London), **259**: 323–325, 1976.

[11] FONDEVILLE, J. C., BORTHWICK, H. A., HENDRICKS, S. B., Leaflet movement of *Mimosa pudica* indicative of phytochrome action, *Planta* 69: 357–364, 1966.

[12] GALSTON, A. W., Leaflet movements in *Samanea*, [w] The Biology of Photoreception, Soc. Exp. Biol. Symp., Vol. 36, red. Cosins, D. J., Vince-Prue, D., Cambridge Univ. Press, str. 541–559, 1983.

[13] GALSTON, A. W., SATTER, R. L., Light, clocks and ion flux: an analysis of leaf movement, [w] Light and Plant Development, red. Smith, H., Butterworths, London, str. 159–184, 1976.

[14] GEORGEVICH, G., CEDEL, T. E., ROUX, S. J., Use of ^{125}I-labelled phytochrome to quantitate phytochrome binding to membranes of *Avena sativa*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**: 4439–4443, 1977.

[15] GILMAN, A. G., G protein: Transductions of receptor-generated signals, *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 615–649, 1987.

http://rcin.org.pl

[16] GRESSEL, J., QUAIL, P. H., Particlebound phytochrome: differential pigment release by surfactans, ribonuclease and phospholipase C., *Plant Cell Physiol.*, **17**: 925–940, 1976.
[17] HALE, C. C. II., ROUX, S. J., Photoreversible calcium induced by phytochrome in oat coleoptile cells, *Plant Physiol.*, **65**: 658–668, 1980.
[18] HARTMANN, K. M., A general hypothesis to interpret "high energy phenomena" of photomorphogenesis on the basis of phytochrome, *Photochem. Photobiol.*, **5**: 349–366, 1966.
[19] HAUPT, W., Localization of phytochrome in the cell, *Physiol. Veg.*, 8: 551–563, 1970.
[20] HENDRICKS, S. B., BORTHWICK, H. A., The function of phytochrome in regulation of plant growth, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **58**: 2125–2130, 1967.
[21] HILTON, J. R., An association of phytochrome with the chloroplast envelope membranes of *Spinacia oleracea* L.: a preliminary observation, *New Phytol.*, **95**: 175–178, 1983.
[22] JABBEN, H., HOLMES, M.G., Phytochrome in light-grown plants, [w] Encyclopedia of Plant Physiology, Photomorphogenesis, New Series, Vol. 16, red. Shropshire, A., jr. Mohr, H., Springer-Verlag, Heidelberg, str. 704–722, 1983.
[23] JAFFE, M. J., Phytochrome-mediated biopotentials in mung bean seedlings, *Science* **162**: 1016–1017, 1968.
[24] JAFFE, M. J., Acetylcholine as a native metabolic regulator of phytochrome-mediated processes in bean roots, [w] Recent Advances in Phytochemistry, red. Runeckles, V. C., Tso, T. C., Vol. 5, Academic Press, New York, str. 81–104, 1972.
[25] JOHNSON, C. B., TASKER, R., A scheme to account quantitatively for the action of phytochrome in etiolated and light-grown plants, *Plant Cell Environ.*, **2**: 259–265, 1979.
[26] JONES, A. M., QUAIL, P. H., Quarternary structure of 124-kDa phytochrome from *Avena*, *Biochemistry*, **25**: 2987–2995, 1986.
[27] JORDAN, B. R., Evidence for the interaction of membrane lipids and the plant photoreceptor, phytochrome, [w] Biochemistry and Metabolism of Plant Lipids, red. Wintermans, J. G. F. M., Kuiper, P. J. C., Elsevier, Amsterdam, str. 479–482, 1982.
[28] JORDAN, B. R., PARTIS, M. D., THOMAS, B., A study of phytochrome-membrane association using an enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting, *Physiol. Plant.*, **60**: 416–421, 1984.
[29] JORDAN, B. R., PARTIS, M. D., THOMAS, B., The biology and molecular biology of phytochrome, [w] Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol. 3, str. 315–362, 1986.
[30] KENDLER, R., LÖPPERT, H., ROTTENBURG, T. H., SCHARFETTER, E., Early effects of phytochrome in *Lemna*, [w] Photoreceptors and Plant Development, red. De Greef, J., Antwerp Univ. Press, str. 485–492, 1980.
[31] KENDRICK, R. E., The physiology of phytochrome action, [w] The Biology of Photoreception, Soc. Exp. Biol. Symp., Vol. 36, red. Cosins, D. J., Vince-Prue, D., Cambridge Univ. Press, str. 275–303, 1983.
[32] KENDRICK, R. E., SPRUIT, C. J. P., Phototransformations of phytochrome, *Photochem. Photobiol.*, **26**: 201–214, 1977.
[33] KENDRICK, R. E., FRANKLAND, B., Phytochrome and Plant Growth, E. Arnold Press, London, 1983.
[34] KIM, I.-S., SONG, P.-S., Binding of phytochrome to liposomes and protoplasts, *Biochemistry*, **20**: 5482–5489, 1981.
[35] KOHLER, D., Phytochromabhangiger Ionentransport in Erbsensämlingen, *Planta* **84**: 158–165, 1969.
[36] KOPCEWICZ, J., Rola fitochrömu we wzroście i rozwoju roślin, *Wiad. Bot.*, **24**: 67–84, 1980.
[37] KOUKKARI, W. L., HILLMAN, W. S., Pulvini as the photoreceptors in the phytochrome effect on nyctinasty in *Albizzia julibrissin*, *Plant Physiol.*, **43**: 698–704, 1968.
[38] KRONENBERG, G. H. M., KENDRICK, R. E., The physiology of action [w] Photomorphogenesis in Plants, red. Kendrick, R. E., Kronenberg, G. H. M., M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., Dordrecht, str. 99–114, 1986.
[39] LOPPERT, H., KRONENBERGER, W., KANDLER, R., Phytochrome-mediated changes in the membrane potential of subepidermal cells of *Lemna paucicostata* 6746, *Planta* **138**: 133–136, 1978.
[40] MANCINELLI, A. L., The photoregulation of anthocyanin synthesis, [w] Encyclopedia of Plant Physiology, Photomorphogenesis, Vol. 16. New Series, red. Shropshire, W., jr., Mohr, H., Springer-/Verlag, Heidelberg, str. 640–661, 1983.
[41] MANCINELLI, A. L., RABINO, I., The high irradiance responses of plant photomorphogenesis, *Bot. Rev.*, **44**: 129–180, 1978.
[42] MANDOLI, D. F., BRIGGS, W. R., Phytochrome control of two low-irradiance responses in etiolated oat seedlings, *Plant Physiol.*, 67: 733–739, 1981.
[43] MARMÉ, D., Phytochrome: Membranes as possible sites of primary action, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **28**: 173–198, 1977.

http://rcin.org.pl

[44] MARMÈ, D., BIANCO, J., GROSS, J., Evidence for phytochrome binding to plasma membrane and endoplasmic reticulum, [w] Light and Plant Development, red. Smith, H., Butterworths, London, str. 95–110, 1976.

[45] McCURDY, D. W., PRATT, L. H., Immunogold electron microscopy of phytochrome in *Avena*: Identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestrating and enhanced pelletability, *J. Cell Biol.*, **103**: 2541–2556, 1986.

[46] NEWMAN, I. A., Electric responses of acts to phytochrome transformation, [w] Mechanism of Regulation of Plant Growth, Vol. 12, red. Bielski, R. L., Ferguson, A. R., Cresswell, M. M., The Royal Society of New Zeland, Wellington, str. 355–360, 1974.

[47] NEWMAN, I. A., Rapid electric responses of oat to phytochrome show membrane processes unrelated to pelletability, *Plant Physiol.*, **68**: 1494–1499, 1981.

[48] NEWMAN, I. A., BRIGGS, W. R., Phytochrome-mediated electric potential changes in oat seedlings, *Plant Physiol.*, **50**: 687–693, 1972.

[49] NEWMAN, I. A., SULLIVAN, J. K., Auxin transport in oats: a model for the electric changes, [w] Transport and Transfer Processes in Plants, red. Wardlaw, I. F., Passioura, J. B., Academic Press, New York, str. 153–159, 1976.

[50] PARTIS, M. D., JORDAN. B. J., THOMAS, B., Comparison of soluble and membrane phytochrome in *Avena*, *Plant Physiol.*, Suppl., **75**: 74, 1984.

[51] PIWOWARCZYK, W., The effect of red and far-red light on proton secretion from mesophyll-cell protoplasts of *Vicia faba* L., *Planta* **173**: 42–45, 1988.

[52] PRATT, L. H., Localization within plan, [w] Photomorphogenesis in Plants, red. Kendrick, R. E., Kronenberg, G. H. M., M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., Dordrecht, str. 61–81, 1986.

[53] PRATT, L. H., MARMÈ, D., Red light-enhanced phytochrome pelletability: a re-examination and further characterization. *Plant Physiol.*, **58**: 686–692, 1976.

[54] QUAIL, P. H., Rapid action of phytochrome in photomorphogenesis, [w] Photomorphogenesis, Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 16, red. Shropshire, W., jr., Mohr, H., Springer Verlag, Heidelberg, str. 178–212, 1983.

[55] RACUSEN, R. H., Phytochrome control of electrical potentials and intercellular coupling in oat-coleoptile tissue, *Planta* **132**: 25–29, 1976.

[56] RACUSEN, R. H., ETHERINGTON, B., Role of membrane-bound, fixed charge changes in phytochrome-mediated mung bean root-tip adherance phenomena, *Plant Physiol.*, **55**: 491–495, 1975.

[57] RACUSEN, R. H., SATTER, R. L., Rhytmic and phytochrome-regulated changes in transmembrane potential in *Samanea pulvini*, *Nature* (London) **225**: 408–410, 1975.

[58] RACUSEN, R. H., GALSTON, A. W., Electrical evidence for rhytmic changes in the cotransport of sucrose and hydrogen ions in *Samanea pulvini*, *Planta* **135**: 57–62, 1977.

[59] RACUSEN, R. H., COCKE, T. J., Electrical changes in fern gametophyte cells during exposure to photomorphogenetically-active light, *Plant Physiol.*, Suppl. **67**: 731, 1981.

[60] ROTH-BEJERANO, N., KENDRICK, R. E., Phytochrome pelletability in barley. *Plant Physiol.*, **47**: 67–72, 1979.

[61] ROTH-BEJERANO, N., ITAI, C., Involvement of phytochrome in stomatal movement. Effect of blue and red light. *Physiol. Plant.*, **52**: 201–206, 1981.

[62] ROTH-BEJERANO, N., NEJIDAT, A., Phytochrome effect on K^+ fluxes in guard cells of *Camelina communis*, *Physiol. Plant.*, **64**: 501–506, 1985.

[63] ROTH-BEJERANO, N., NEJIDAT, A., ITAI, C., Further support for the involvement of phytochrome in stomatal movement. *Physiol. Plant.*, **64**: 501–506, 1985.

[64] ROUX, S. J., WAYNE, R. O., DATTA, N., Role of calcium ions in phytochrome responses: an update, *Physiol. Plant.*, **66**: 344–348, 1986.

[65] ROUX, S. J., McENTIRE, K., SLOCUM, R. D., CEDEL, T. E., HALE, C. C. II, Pytochrome induces photoreversible calcium fluxes in a purified mitochondrial fraction from oats, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78**: 783–787, 1981.

[66] ROUX, S. J., YGUERABIDE, J., Photoreversible conductance changes induced by phytochrome in model lipid membranes, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **70**: 762–764, 1973.

[67] SMITH, H., Phytochrome and photomorphogenesis in plants, *Nature* (London) **227**: 665–668, 1970.

[68] STENZ, H.-G., WEISENSEEL, M. H., Phytochrome mediates a reduction of the surface charge of *Mesotaenium* cells, *J. Plant Physiol.*, **122**: 159–168, 1986.

[69] TAKAGI, S., NAGAI, R., Light-affected Ca^{2+} fluxes in protoplasts of *Vallisneria* mesophyll cells, *Plant Physiol.*, **88**: 228–232, 1988.

http://rcin.org.pl

[70] TANDA, T., Substances essential for a red, far-red light reversible attachment of mung bean root tips to glass, *Plant Physiol.*, **43**: 2070–2071, 1968.
[71] TEZUKA, T., YAMAMOTO, Y., Control of ion absorption by phytochrome, *Planta* **122**: 239–244, 1975.
[72] TOKUHISA, J. G., DANIELS, S. M., QUAIL, P. H., Phytochrome in green tissues: spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-grown *Avena sativa*, *Planta* **164**: 321–332, 1985.
[73] TORIYAMA, H., Observation and experimental studies of sensitive plants. VI. The migration of potassium in the primary pulvinus, *Cytologia* **20**: 367–377, 1955.
[74] TORIYAMA, H., JAFFE, M. J., Migration of calcium and its role in the regulation of seismonasty in the motor cells of *Mimosa pudica* L., *Plant Physiol.*, **49**: 72–81, 1972.
[75] TRETYN, A., Influence of red light and acetylcholine on $^{45}Ca^{2+}$ uptake by oat coleoptile cells, *Cell Biol. Int. Rep.*, **11**: 887–896, 1987.
[76] TRETYN, A., KOPCEWICZ, J., Rola Ca^{2+} w mechanizmie działania fitochromu, *Wiad. Bot.*, w drukụ.
[77] TRETYN, A., KESY, J., KOPCEWICZ, J., Fitochrom – oczyszczanie, struktura i właściwości molekularne, *Post. Biol. Kom.*, **15**: 495–512, 1988.
[78] TRETYN, A., KENDRICK, R. E., BOSSEN, M. E., The effect of a calcium-channel antagonist nifedipine and agonist Bay K-8644 on the phytochrome-controlled swelling of etiolated wheat protoplasts, *Physiol. Plant.*, wysłane do redakcji.
[79] VAN DEN DRIESSCHE, T., The seismonastic leaf movement of *Mimosa pudica* and the nyctinastic leaf movement, [w] Photoreceptors and Plant Development, red. De Greef, J., Antwerp Univ. Press, str. 599–616, 1980.
[80] VIERSTRA, R. D., QUAIL, P. H., The protein, [w] Photomorphogenesis in Plants, red. Kendrick, R. E., Kronenberg, G. H. M., M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., Dordrecht, str. 35–60, 1986.
[81] WADA, M., KADOTA, A., FURUYA, M., Intracellular localization and dichroic orientation of phytochrome in plasma membrane and/or ectoplasm of a centrifuged protonema of fern *Adiantum capillus-veneris* L., *Plant Cell Physiol.*, **24**: 1441–1447, 1983.
[82] WAGLE, J., JAFFE, M. J., The association and function of phytochrome in pea nuclei, *Plant Physiol.*, Suppl., **67**: 727, 1980.
[83] WAYNE, R., HEPLER, P. K., Red light stimulates an increase in intracellular calcium in the spores of *Onoclea sensibilis*, *Plant Physiol.*, **77**: 8–11, 1985.
[84] WEISENSEEL, M. H., RUPPERT, H. K., Phytochrome and calcium ions are involved in light-induced membrane depolarization in *Nitella*, *Planta* **137**: 225–229, 1977.
[85] YUGHANS, H. O., JAFFE, M. J., Phytochrome controlled adhesion of mung bean root tips to glass. A detailed characterization of the phenomenon, *Physiol. Plant.*, **23**: 1004–1016, 1970.

Otrzymano: 10 maja 1989
Przyjęto: 8 sierpnia 1989
Adres autorów:
Uniwersytet M. Kopernika, Instytut Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej
Gagarina 9, 87-100 Toruń

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

INTERLEUKINA 1 (IL-1) – SYNTEZA I STRUKTURA

INTERLEUKIN 1 (IL-1) – SYNTHESIS AND STRUCTURE

Nadzieja DRELA

Instytut Zoologii Uniwersytetu Warszawskiego, Zakład Immunologii

Streszczenie. Interleukina 1 jest mediatorem szeregu reakcji immunologicznych, bierze udział wraz z innymi cytokinami w utrzymaniu homeostazy immunologicznej. Praca obejmuje przegląd komórek produkujących IL-1 oraz czynników indukujących jej syntezę. Szczególną uwagę zwrócono na aktualny stan wiedzy na temat struktury IL-1, kinetyki jej syntezy i wydzielania zewnątrzkomórkowego oraz omówiono czynniki modulujące te procesy.

Summary. Interleukin 1 is a mediator of several immunological reactions, and is involved with other cytokines in the maintenance of immunological homeostasis. This review includes an overview of cell sources and inducers of IL-1 production. The actual knowledge about the biochemical nature and the kinetics of synthesis and secretion of IL-1 is presented. The modulation of these processes by several agents is discussed.

WPROWADZENIE

Od szeregu lat uwaga badaczy skupiona jest wokół mechanizmów regulujących odpowiedź immunologiczną organizmu na różnego rodzaju infekcje oraz wokół udziału w reakcjach odpornościowych produktów wydzielanych przez komórki fagocytujące. Aktywność biologiczna niektórych produktów dotyczy podwyższania ciepłoty ciała przez endogenny pyrogen (EP – *endogenous pyrogen*), indukcji białek ostrej fazy przez endogenny mediator leukocytarny (LEM – *leukocytic endogenous mediator*) oraz aktywacji limfocytów przez czynnik aktywujący limfocyty (LAF – *lymphocyte-activating factor*).

W latach siedemdziesiątych nastąpił postęp w badaniach nad otrzymywaniem, oczyszczaniem, charakterystyką biologiczną i biochemiczną EP i LEM. Z badań prowadzonych przez różne laboratoria wynikało, iż zarówno ludzkie, jak i królicze EP/LEM są to białka o masie cząsteczkowej 12–17 kDa i punkcie izoelektrycznym w pH bliskim 7.0. Czynniki te izolowano z supernatantów pohodowlanych monocytów, makrofagów otrzewnowych i komórek Kupffera [29, 107]. Wstępna charakterystyka chemiczna EP wykazała heterogeniczność tego czynnika w zakresie masy cząsteczkowej i ładunku elektrycznego [20, 32]. Wykazano ponadto, iż preparaty określane jako EP wykazywały jednocześnie aktywność

http://rcin.org.pl

biologiczną przypisywaną LEM [65]. Większość badań prowadziła do konkluzji, że EP i LEM są białkami o zbliżonej budowie bądź iż jest to jedno białko przejawiające szereg aktywności biologicznych.

W tym samym czasie zajmowano się zasadniczą rolą jednojądrzastych komórek fagocytujących w rozpoznawaniu antygenu – hipotezą dwóch sygnałów [116, 135]. Hipoteza zakładała, iż 1/ jednojądrzaste komórki fagocytujące przetwarzają antygen i prezentują go kompetentnym limfocytom T oraz 2/ mononuklearne fagocyty wydzielają rozpuszczalny produkt lub produkty niezbędne do aktywacji limfocytów T. Ten rozpuszczalny produkt jednojądrzastych komórek fagocytujących opisany został po raz pierwszy w 1972 roku i nazwany w skrócie LAF [45, 46]. Wykazano, iż zasadnicza właściwość biologiczna LAF polega na podwyższaniu proliferacyjnej odpowiedzi tymocytów stymulowanych suboptymalnymi dawkami lektyn roślinnych, PHA i Con A. Dalsze badania wskazywały na podobieństwo właściwości biologicznych EP i LAF i prowadziły do wniosku, iż najprawdopodobniej jest to ta sama substancja [107, 117, 118, 129].

Doświadczenia in vitro, dotyczące mechanizmów immunoregulacji wykazały, że aktywowane monocyty i makrofagi wydzielają do podłoża substancje o aktywności biologicznej innej od tradycyjnie przypisywanej EP, LEM i LAF [37, 77, 102, 141, 142]. Wymieniano zwykle następujące czynniki:

BAF (*cell-activating factor*) – czynnik aktywujący limfocyty B,
TPF (*thymocyte proliferation factor*) – czynnik wzmagający proliferację tymocytów,
HP-1 (*helper-peak-1*) – czynnik wzmagający syntezę przeciwciał in vitro,
MCF (*mononuclear cell factor*) – czynnik wzmagający syntezę kolagenazy i prostaglandyny E_2 przez komórki synowialne,
MPIF (*muscle proteolysis inducing factor*) – czynnik indukujący proteolizę tkanki mięśniowej,
OAF (*osteoclast activating factor*) – czynnik stymulujący resorpcję kości,
katabolinę – czynnik indukujący rozkład tkanki łącznej,
hemopoetynę-1 – czynnik regulujący aktywność hemopoetyczną szpiku kostnego.

W 1979 roku na Międzynarodowej Konferencji dotyczącej limfokin, która odbyła się w Szwajcarii, w Ermatingen, dyskutowano nad fizycznymi podobieństwami między wymienionymi czynnikami i zaproponowano termin interleukina 1 (IL-1) dla monokiny opisywanej jako LAF oraz dla czynników o podobnych właściwościach fizykochemicznych: BAF, TPF, HP-1, EP, LEM, MCF, MPIF [1].

Interleukina 1 definiowana jest najczęściej jako rozpuszczalny, niskocząsteczkowy, immunoregulacyjny polipeptyd produkowany głównie przez jednojądrzaste komórki fagocytujące w odpowiedzi na stymulację lektynami, antygenami, czynnikami zapalnymi, mikroorganizmami, produktami pochodzenia bakteryjnego, limfokinami. Bierze udział w kontroli i aktywacji różnych komórek układu immunologicznego oraz komórek, których funkcja nie jest związana z reakcjami odpornościowymi. Działanie interleukiny 1 nie podlega restrykcji genetycznej i jest antygenowo nieswoiste [4, 29, 38, 64, 72a, 74 a, 100, 140].

http://rcin.org.pl

KOMÓRKI PRODUKUJĄCE IL-1

Wykaz komórek syntetyzujących interleukinę 1 przedstawia tabela 1. Najczęściej do otrzymywania IL-1 o dużej aktywności używa się aktywowanych monocytów krwi i makrofagów płucnych [23, 39, 109], monocytów krwi pępowinowej [34] i monocytów izolowanych z łożyska [40] oraz makrofagów otrzewnowych [66]. Dobrymi producentami IL-1 okazały się makrofagi węzłów chłonnych bydła, zdolne do podziałów komórkowych in vitro [95].

Mononuklearne komórki fagocytujące są populacją heterogenną pod względem morfologii, funkcji i produkcji IL-1. Stymulowane monocyty krwi produkują interleukinę o większej aktywności niż makrofagi płucne [39]. Frakcjonowanie populacji makrofagów płucnych lub monocytów krwi obwodowej w gradiencie Percollu wykazało istnienie komórek o różnych gęstościach. Makrofagi i monocyty znajdujące się we frakcjach komórek o największej gęstości produkują więcej IL-1 niż komórki charakteryzujące się mniejszą gęstością. Monocyty, których etap dojrzewania przebiegał in vitro, tracą zdolność do syntezy interleukiny z równoczesnym zmniejszaniem się wartości gęstości komórkowej. Wydaje się, iż ta wielkość fizyczna stanowi odzwierciedlenie stanu dojrzałości komórek [39]. Aktywność produkowanej IL-1 zależy od stadium morfologicznego i funkcjonalnego zróżnicowania komórek. Linia ludzkich prekursorowych komórek hemopoetycznych CM-SM w obecności odpowiednich stymulatorów, nabywa właściwości adherencyjnych, zdolności do fagocytozy, morfologicznie i funkcjonalnie upodabnia się do komórek monocytarno-makrofagowych i zaczyna syntetyzować IL-1 [114]. Zdolność do produkcji interleukiny 1 in vivo maleje ze wzrostem wieku organizmu [62].

Różne komórki produkujące IL-1 wymagają do indukcji jej syntezy odmiennych stymulatorów i optymalnego czasu hodowli [96, 131, 132]. Ludzkie keratynocyty syntetyzują IL-1 o właściwościach fizycznych i biologicznych podobnych do interleukiny produkowanej przez makrofagi [94]. Interleukiny uzyskiwane z różnych ludzkich linii komórkowych nie mają jednoznacznego odniesienia do IL-1 syntetyzowanej przez monocyty krwi obwodowej [41, 76, 138, 144]. Dobrym źródłem interleukiny 1 w laboratoriach są ustalone linie komórkowe: mysia linia makrofagowa P388D1 [70], ludzkie linie monocytarne U 937 [5] i THP-1 [101]. Synteza interleukiny 1 przez tyle różnych komórek pełniących w organizmie odmienne funkcje sugeruje, iż IL-1 bezpośrednio bierze udział w obronie organizmu na różnych etapach odpowiedzi immunologicznej.

CZYNNIKI INDUKUJĄCE SYNTEZĘ IL-1

Czynniki indukujące syntezę IL-1 przedstawia tabela 2. Nadal nie ma pewności, czy komórki spoczynkowe zdolne są do produkcji interleukiny 1 in vivo. Udział monocytów w rozpoznawaniu antygenu jest etapem niezbędnym, zatem niewykluczone, iż spoczynkowe komórki ciągle produkują niewielkie ilości IL-1 niewykrywalnej stosowanymi testami in vitro [82]. Wydaje się również możliwe, iż zarówno in vitro, jak i in vivo komórki ulegają ciągłej stymulacji bardzo niskimi dawkami endotoksyny rzędu pg · cm^{-3}. Śladowe ilości endotoksyny wykrywano w wielu odczynnikach używanych w laboratoriach. Jest ona oporna na ogrzewanie, przechodzi przez rutynowe filtry bakteriologiczne i może stymulo-

http://rcin.org.pl

wać komórki w ilościach poniżej wykrywalności dostępnymi metodami. Polimyksyna B hamuje biologiczną aktywność endotoksyny. Dodanie tego antybiotyku do hodowli komórkowej powoduje zahamowanie produkcji IL-1 indukowanej LPS bez uszkadzania komórek w hodowli [35, 81]. Mimo dodawania polimyksyny B do hodowli mononuklearnych komórek fagocytujących obserwowano śladową syntezę IL-1. Nie ma pewności, czy jej synteza związana była z preparatyką komórek (płukanie, adherencja in vitro), czy też była to produkcja interleukiny 1 przez rzeczywiście spoczynkowe komórki. Obserwowano syntezę

TABELA 1. Komórki produkujące IL-1

Jednojądrzaste komórki fagocytujące	Inne komórki
Makrofagi śledziony [8]	keratynocyty [94, 120]
Makrofagi otrzewnowe [68, 107]	astrocyty [42]
Makrofagi płucne [73, 123]	komórki nabłonkowe [50, 84]
Makrofagi węzłów chłonnych [95]	komórki mezangium kłębka nerkowego [93]
Makrofagi synowialne [25]	komórki Langerhansa [121]
Makrofagi szpiku kostnego [87]	komórki wysięku dziąsłowego [22]
Komórki Kupffera [31]	komórki naskórka [55]
Monocyty krwi obwodowej [6, 75, 109]	duże ziarniste limfocyty, LGL [2]
Monocyty krwi pępowinowej [34]	granulocyty obojętnochłonne [90, 132]
Monocyty łożyska [40]	limfocyty T [3, 131]
Ludzka linia monocytarna CM-SM [114]	limfocyty B [14, 96, 98]
Komórki ludzkiej białaczki mielomonocytarnej THP-1 [76, 101]	
Ludzkie linie białaczkowe U937, K562, HL60 [71, 113, 138]	
Mysia linia makrofagowa P388D1 [103]	

IL-1 in vitro przez niestymulowane makrofagi płucne pochodzące od chorych na sarkoidozę [73]. Aktywność IL-1 w podłożu pohodowlanym wykazywano już po 2 godzinach hodowli. Niewykluczone jednak, iż makrofagi płucne izolowane od pacjenta były już w stanie aktywności i nie wymagały dodatkowej stymulacji in vitro.

Najsilniejszymi czynnikami indukującymi syntezę IL-1 są lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych [6, 43, 83, 109]. Wydaje się, że większość efektów immunologicznych LPS związanych jest z aktywnością lipidu A. Jednakże znane są doniesienia o aktywności części węglowodanowej w procesie biosyntezy IL-1 [83, 86]. Makrofagi otrzewnowe myszy i monocyty krwi obwodowej człowieka syntetyzowały interleukinę 1 zarówno w hodowlach stymulowanych fragmentem polisacharydowym, jak i lipidem A LPS *Bordetella pertussis*, a także syntetycznymi węglowodanami i glikolipidami strukturalnie odpowiadającymi natywnemu LPS. W zależności od użytego do stymulacji fragmentu LPS (polisacharyd, lipid A) na różnym poziomie ustala się równowaga między interleukiną znajdującą się wewnątrz komórki i wydzielaną do podłoża. Wydaje się, iż fragment polisacharydowy efektywniej indukuje sekrecję interleukiny 1 [83, 88]. Toksyna o m. cz. 20–30 kDa, produkowana przez niektóre szczepy *Staphylococcus aureus*, izolowana od pacjentów z zespołem szoku toksycznego okazała się równie silnym czynnikiem indukującym syntezę IL-1 jak LPS [61].

Kompleksy immunologiczne powstające przy nadmiarze antygenu indukują syntezę IL-1 in vitro [36]. Lektyny i antygeny indukują syntezę IL-1 przez stymulację limfocytów T i syntezę przez nie limfokin aktywujących makrofagi lub monocyty. Supernatanty pohodowlane limfocytów, stymulowanych swoistymi antygenami, komórkami allogenicznymi bądź Con A, dodane do hodowli makrofagów indukują produkcję IL-1 [13, 28].

http://rcin.org.pl

Istotnym etapem w zainicjowaniu produkcji IL-1 jest stymulacja samej błony komórkowej komórek produkujących. Zjawisko fagocytozy nie ma wpływu na indukcję syntezy IL-1. Hodowla monocytów w obecności stymulatora i związków hamujących fagocytozę, takich jak cytochalazyna B, kolchicyna, nie zakłóca syntezy i wydzielania interleukiny 1 [18, 80]. Istnieją jednak doniesienia, iż fagocytoza jest ważnym etapem w procesie indukcji syntezy IL-1 przez komórki LGL stymulowane bakteriami [2]. Adherencja makrofagów do powierzchni szklanych lub plastikowych powoduje już aktywację makrofagów i syntezę IL-1 bez dodatkowej stymulacji [43]. Sugeruje to jednocześnie, iż adherencja nie może być

TABELA 2. Czynniki indukujące syntezę IL-1

Czynniki	Źródło literaturowe
Mikroorganizmy:	
wirusy	[98]
bakterie	[2, 18, 61, 80]
Produkty pochodzenia bakteryjnego i innych mikroorganizmów:	
endotoksyny bakterii Gram-ujemnych	[6, 43, 83, 109]
egzotoksyny patogenicznych szczepów bakterii	[61]
składniki ściany komórkowej o właściwościach adiuwantowych	[112]
ściany komórkowe	[63]
polisacharydy drożdży	[131, 132]
Kompleksy immunologiczne	[36]
Antygeny:	
antygeny bakteryjne	[21]
alloantygeny	[28, 131]
Czynniki zapalne:	
C5a	[110]
kryształy mocznika	[27]
krzem	[66]
Lektyny roślinne	[13, 26, 127]
Cytokiny:	
CSF	[90,104]
IL-2	[57]
IFN-γ	[44, 54, 57]
IFN-α	[44]
TNF	[79, 85, 91]
Czynniki syntetyczne:	
dwupeptyd muramylowy	[24, 135]
kwas poliinozyno-policytydylowy	[128]

metodą oczyszczania populacji makrofagów i monocytów, gdyż powoduje jednocześnie zmianę stanu fizjologicznego komórki.

Składniki dopełniacza indukują syntezę i wydzielanie IL-1 przez ludzkie monocyty krwi obwodowej. Oczyszczony składnik C3a, jak i pozbawiony C-końcowej reszty argininy C3a – C3a desArg, stymulowały syntezę IL-1 [53]. Niskie stężenia preparatów rzędu 10^{-8}M wystarczały do rozpoczęcia syntezy wewnątrzkomórkowej IL-1, natomiast stężenia 10–100 razy większe wymagane były do uwolnienia interleukiny do podłoża hodowlanego. Składniki komplementu C5a i pozbawiony argininy – C5a desArg indukowały w sposób zależny od dawki wydzielanie IL-1 już po 2 godzinach inkubacji z monocytami człowieka [110]. Wydzielanie IL-1 przez monocyty w obecności składników dopełniacza nie było hamowane po dodaniu polimyksyny B. Znane są także doniesienia o braku syntezy interleukiny 1 pod

http://rcin.org.pl

wpływem stymulacji składnikami dopełniacza [7]. Rozpuszczalne lub opłaszczone na nośniku składniki dopełniaczą C3b, iC3b, C3d, C3a, C5a, Ba, Bb nie indukowały produkcji IL-1 przez ludzkie monocyty. Autorzy doniesienia zastrzegają, iż używali do badań wysoce oczyszczonych preparatów pozbawionych zanieczyszczeń endotoksyną. Ważną rolę w produkcji IL-1 odgrywa ekspresja antygenów II klasy głównego układu zgodności tkankowej [48, 126]. Przeciwciała monoklonalne anty-Ia blokują produkcję IL-1 przez makrofagi otrzewnowe szczura stymulowane endotoksyną. Makrofagi hodowane bez czynników stymulujących stają się Ia-negatywne po 24–48 godzinach inkubacji i tracą zdolność do prezentowania antygenu. Monocyty człowieka stymulowane LPS tracą zdolność do syntezy IL-1 po 24 godzinach hodowli. Hodowla komórek w obecności indometacyny zapobiega utracie antygenów II klasy MHC i odblokowuje produkcję IL-1. Zatem ekspresja antygenów Ia bądź DR jest istotna zarówno w procesie rozpoznawania antygenu, jak i produkcji interleukiny 1. Nie wiadomo, w której fazie produkcji IL-1 konieczny jest udział antygenów Ia: aktywacji, syntezie czy uwalnianiu do podłoża. Korelację między ekspresją antygenów Ia i IL-1 związaną z błoną komórkową potwierdzają obserwacje, iż do indukcji interleukiny konieczny jest bezpośredni kontakt makrofagów i limfocytów T [108].

Cytokiny mogą bezpośrednio indukować syntezę IL-1 bądź też modulować jej produkcję stymulowaną innymi czynnikami, najczęściej produktami pochodzenia bakteryjnego lub bakteriami. Zapewne jest to naturalna regulacja syntezy i aktywności interleukiny 1 zachodząca in vivo. Fizjologicznym induktorem syntezy IL-1 przez neutrofile jest GM-CSF (*granulocyte, macrophage-colony stimulating factor*) czynnik stymulujący powstawanie kolonii neutrofilowo-makrofagowych [90]. Wreszcie sama IL-1 może stymulować swoją własną syntezę. Komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych syntetyzują interleukinę 1 pod wpływem stymulacji rekombinowaną ludzką IL-1 [139]. Limfokiny produkowane przez limfocyty T: IL-2 i IFN-γ aktywują funkcję monocytów i w konsekwencji wzmagają odpowiedź immunologiczną. In vitro oba te czynniki bezpośrednio nie indukują syntezy IL-1, lecz ją wzmagają w hodowlach monocytów stymulowanych LPS [44, 54, 57].

Ludzkie komórki śródbłonkowe i fibroblasty wykazują aktywność IL-1 związanej z błoną w wyniku stymulacji TNF – α i TNF-β [79, 85]. TNF-α produkowany przez aktywowane makrofagi jest silniejszym stymulatorem syntezy IL-1 niż TNF-β produkowany przez aktywowane limfocyty [91]. Wydzielanie IL-1 pod wpływem czynników o różnej strukturze chemicznej, a w szczególności w wyniku stymulacji komórek produktami pochodzenia bakteryjnego, świadczy o jej istotnym udziale w mechanizmach odpornościowych organizmu. Ciągle niewiele wiadomo o mechanizmach stymulacji makrofagów, monocytów i innych komórek przez tak różne czynniki. Wiadomo, iż w stymulacji z pewnością pośredniczą receptory powierzchniowe komórek.

CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA IL-1

Aktualnie przyjmuje się, iż IL-1 nie jest ani preformowana, ani akumulowana w komórce, lecz jest syntetyzowana de novo pod wpływem indukcji określonymi czynnikami. Biologicznie aktywny materiał wykrywany jest w płynach pohodowlanych już po 2–4 godzinach stymulacji komórek. Interleukina 1 jest polipeptydem wrażliwym na temperaturę: ogrzewanie do 56–60°C powoduje utratę 50% aktywności, a ogrzewanie przez 30

http://rcin.org.pl

minut w temp. 70°C powoduje jej całkowitą inaktywację niezależnie od rodzaju komórek produkujących i stopnia czystości preparatu. Trypsyna i chymotrypsyna powodują inaktywację IL-1 ludzkiej i króliczej, natomiast mysia IL-1 jest odporna na działanie tych dwóch enzymów oraz papainy. Neuraminidaza i rybonukleaza nie niszczą aktywności biologicznej interleukiny.

Badania struktury IL-1 dotyczą głównie materiału aktywnego biologicznie izolowanego z płynów pohodowlanych stymulowanych monocytów człowieka oraz pochodzącego z lizatów komórek i błony plazmatycznej. Wyizolowano dwie odrębne formy molekularne IL-1 o masie cząsteczkowej 17,5 kDa, a różniące się punktem izoelektrycznym [30, 49, 111]. Główną formą jest produkowana w większej ilości IL-1β, pI 7,0 oraz syntetyzowana w ilości 100-krotnie mniejszej IL-1α, pI 5,0. Odrębne cDNA kodują monocytarną IL-1α i β. Każdy z nich koduje prekursor interleukiny o m. cz. 31 kDa, który następnie ulega przekształceniu do cząsteczki 17,5 kDa, która jest zasadniczą formą sekrecyjną izolowaną z płynów pohodowlanych. Wydaje się, iż IL-1 jako jedyna spośród limfokin i monokin nie ma sekwencji sygnalnej decydującej o transporcie przez błonę. Frakcje lizatów komórkowych o masach cząsteczkowych 23 kDa i 31 kDa wykazywały w testach in vitro aktywność IL-1. Aktywowane monocyty wydzielają biologicznie aktywną interleukinę 1 o m. cz. 23 kDa po zadziałaniu enzymami proteolitycznymi (trypsyną, plazminą). Czynniki proteolityczne mogą zatem brać udział w regulacji uwalniania interleukiny na zewnątrz komórki.

Opisano cząsteczki IL-1 o różnej masie cząsteczkowej w zależności od lokalizacji [10, 49]: 17 kDa – wydzielana zewnątrzkomórkowo, 31 kDa – wewnątrzkomórkowa cytosolu i 23 kDa – obecna w cytosolu i błonie komórkowej. Różnica w masie cząsteczkowej między IL-1 z supernatantu pohodowlanego (17 kDa) a IL-1 błonową (23 kDa) może wynikać z obecności hydrofobowej sekwencji osadzonej w fosfolipidowej części błony plazmatycznej. Istnieją jeszcze przypuszczenia, iż po zakończeniu syntezy białka ten fragment hydrofobowy jest ucinany i zastąpiony przez glikofosfolipid, który zakotwicza białko w błonie.

Z badań Mosleya i wsp. [106] wynika, iż aktywność biologiczną mają obie formy IL-1α: 17,5 kDa i 31 kDa i jedynie forma 17,5 kDa interleukiny 1β.

Istnieje obszerna dokumentacja dotycząca heterogeniczności form molekularnych ludzkiej monocytarnej interleukiny 1. Krakauer [75, 76] wyizolowała z supernatantów pohodowlanych monocytów człowieka stymulowanych LPS dwie interleukiny 1 o m. cz. 14 kDa i punktach izoelektrycznych 5,1 i 6,8. Z kolei, z supernatantu pohodowlanego komórek ludzkiej linii ostrej białaczki monocytarnej THP-1 wyizolowała tylko jedną IL-1: 14 kDa, pI 6,8. Otrzymane interleukiny nie były wiązane na kolumnie z sefarozą sprzężoną z Con A, co sugeruje brak udziału reszt węglowodanowych w strukturze bądź aktywności IL-1. Chemiczna modyfikacja reszt argininy lub grup sulfhydrylowych interleukiny 1 o pI 6,8 niszczyła jej aktywność biologiczną, natomiast nie wpływała na aktywność IL-1 o pI 5,1. Obie formy IL-1 różniły się wrażliwością na temperaturę (56°C, 30 min). Wskazuje to na różnice w budowie trzeciorzędowej obu form molekularnych IL-1. Auron i wsp. [9] wykazali w supernatantach pohodowlanych monocytów krwi obwodowej człowieka stymulowanych LPS lub zabitą zawiesiną *Staphylococcus albus*, obecność trzech form molekularnych IL-1 o m. cz. 18 kDa i pI: 7,3; 5,9; 5,6. Proporcje tych form w supernatantach przedstawiały się odpowiednio 1000:10:1. Wewnątrzkomórkową formą IL-1 była prekursorowa cząsteczka o m. cz. 32 kDa. Ihrie i Wood [60] wyizolowali z supernatantu pohodowlanego stymulowanych ludzkich monocytów IL-1 15 kDa i pI 7,0 oraz kilka frakcji o mniejszej aktywności w zakresie pI 4,5–5,8. Lepe-Zuniga i wsp. [89] wykazali, że aktywność

http://rcin.org.pl

zewnątrzkomórkowej ludzkiej IL-1 związana jest z frakcją o m. cz. 15–17 kDa, natomiast aktywność wewnątrzkomórkowej IL-1 rozłożona jest w czterech frakcjach: 15; 26; 45; > 70 kDa. Traktowanie ostatnich trzech frakcji detergentami powodowało ich degradację do cząsteczek 15 kDa. Obydwie pule IL-1: zewnątrzkomórkowa i wewnątrzkomórkowa składały się z trzech form molekularnych o pI 5,5; 6,1 i 6,7 występujących w różnych proporcjach.

Heterogeniczność form molekularnych interleukiny 1 jest charakterystyczna także dla IL-1 otrzymanej z mysich linii monocytarnych [59, 103], makrofagów króliczych [66, 123], makrofagów otrzewnowych szczura [68].

Badania nad klonowaniem DNA kodującego ludzką interleukinę 1 nie dają odpowiedzi na pytanie, czy rekombinowana IL-1 stanowi kompletną replikację formy natywnej, aczkolwiek ich aktywność w większości testów biologicznych jest nie do odróżnienia [133]. Homologia w sekwencji kwasów nukleinowych i sekwencji aminokwasów między IL-1α i IL-1β wynosi odpowiednio 45% i 30%. Rekombinowana ludzka IL-1α, produkowana przez szczepy *E. coli*, charakteryzuje się łańcuchem polipeptydowym złożonym z 271 aminokwasów, z których 154 aminokwasy C-końcowe decydują o jej aktywności biologicznej i wykazuje 27% homologii sekwencji aminokwasów wobec ludzkiej IL-1β [51]. Istnieją doniesienia o wspólnych determinantach antygenowych IL-1 (form α i β) ludzkiej i mysiej [59] oraz ludzkiej i króliczej IL-1β [122].

Za pomocą przeciwciał monoklonalnych rozpoznano dwa epitopy na cząsteczce IL-1β i wykazano, iż zablokowanie jednego z nich hamuje całkowicie aktywność biologiczną IL-1β, a zablokowanie drugiego zmniejsza aktywność 10-krotnie [69]. Na różnice w strukturze między IL-1α i IL-1β wskazuje dodatkowo fakt, iż zastosowanie przeciwciała monoklonalnego przeciwko ludzkiej IL-1α neutralizuje aktywność właśnie tej formy, nie znosząc aktywności IL-1β [67, 143]. Badanie rozmieszczenia form molekularnych IL-1 za pomocą przeciwciał monoklonalnych wykazało, iż na powierzchni monocytów występuje IL-1α, a wewnątrz komórek IL-1β i IL-1α [23].

Ostatnio wykazano, za pomocą przeciwciał monoklonalnych, iż ludzki płyn owodniowy zawiera materiał o aktywności IL-1 [130]. We frakcji o m. cz. 60–90 kDa wykazano obecność głównie IL-1β, natomiast we frakcji 15–20 kDa – mieszaninę IL-1α i β. W ciągu ostatnich lat określono sekwencję aminokwasów ludzkiej IL-1α i IL-1β, która musi pozostać nienaruszona dla zachowania aktywności biologicznej interleukiny i zdolności wiązania z receptorem komórkowym [105]. Dla IL-1β jest to sekwencja między 120–266 aminokwasem, a dla IL-1α – między 128–267 aminokwasem. Ponadto przypuszcza się, iż obecność argininy jest krytyczna dla aktywności biologicznej IL-1.

KINETYKA SYNTEZY I WYDZIELANIA IL-1

Indukcja syntezy interleukiny 1 przez jednojądrzaste komórki fagocytujące wymaga kontaktu komórki z czynnikiem indukującym przez 60 minut, a nawet krótszego. Aktywacja komórki związana jest z typowymi zmianami metabolizmu błonowego. Nie wiadomo, w jaki sposób sygnał błonowy doprowadza do depresji i transkrypcji genu IL-1. Nie wiadomo również, w jaki sposób dochodzi do indukcji syntezy i wydzielania IL-1 przez makrofagi płucne i monocyty krwi człowieka w 24-godzinnych niestymulowanych hodowlach [73, 134].

http://rcin.org.pl

Lepe-Zuniga i Gery [88] wykazali produkcję wewnątrzkomórkowej IL-1 przez ludzkie monocyty w hodowlach niestymulowanych. Wydaje się, iż indukcji syntezy IL-1 konieczny jest bezpośredni kontakt makrofagów i limfocytów T, uwalnianie rozpuszczalnych mediatorów przez limfocyty T i udział produktów bakteryjnych [108]. W celu zbadania kinetyki syntezy IL-1 posługiwano się głównie hodowlami monocytów bądź makrofagów aktywowanych endotoksynami *S. minnesota, S. typhimurium, E. coli, V. cholerae i P. aeruginosa.* Aktywność IL-1 badano w lizatach komórkowych i supernatantach pohodowlanych [109]. Najsilniejsza indukcja syntezy i wydzielania IL-1 obserwowana była w hodowlach stymulowanych LPS *S. minnesota* w zakresie dawek 10 ng $\cdot cm^{-3}$ – 100 fg $\cdot$ cm^{-3}. Syntezę IL-1 o porównywalnej aktywności indukowały LPS *E. coli* w dawkach 10-krotnie większych oraz LPS *V. cholerae* i *P. aeruginosa* w dawkach 1000-krotnie większych. Aktywność interleukiny 1 wewnątrz komórek obserwowano już po godzinie hodowli z LPS. Szybki wzrost aktywności postępował do 4. godziny hodowli, osiągając maksimum w 6. godzinie i utrzymywał się prawie bez zmian do 24. godziny inkubacji. Aktywność IL-1 w supernatantach wykrywano po 2 godzinach inkubacji z endotoksyną. Wydzielanie IL-1 uzależnione było od jej syntezy de novo. Aktynomycyna D lub cykloheksamid całkowicie blokowały ten proces. W doświadczeniach tych nie wykazano wydzielania IL-1 przez cały czas inkubacji komórek w hodowlach niestymulowanych. Jednakże w hodowlach tych obserwowano aktywność wewnątrzkomórkowej IL-1 między 2. a 6. godziną inkubacji i nagły jej zanik powyżej 6 godzin hodowli. Stymulacja makrofagów lub monocytów w czasie od 0 do 24 godziny hodowli indukowała syntezę IL-1 o dużej aktywności biologicznej. Powyżej 24 godzin hodowli, aktywność spadała do 10% wartości maksymalnej. Dodanie w tym czasie większych ilości LPS nie odnawiało zdolności komórek do syntezy IL-1. Dodanie stymulatora w czasie późniejszym niż w momencie rozpoczęcia hodowli ujawniło obniżenie syntezy IL-1 w czasie 24-godzinnej inkubacji ze stymulatorem. Z badań innych autorów wynika, iż poziom IL-1 wydzielanej przez makrofagi i monocyty ludzkie do podłoża, wykazuje tendencję wzrostową do 48 godzin hodowli, przy czym ten wzrost aktywności pomiędzy 24. i 48. godziną inkubacji jest już niewielki [39]. W hodowlach monocytów człowieka stymulowanych lektynami (PHA, Con A) aktywność IL-1 związaną z komórką wykrywano po 12–24 godzinach stymulacji, a w podłożu hodowlanym między 24.–48. godziną hodowli. mRNA dla IL-1α i IL-1β pojawiały się w komórce po 4 godzinach stymulacji, przy czym mRNA dla IL-1β było zawsze więcej. W hodowlach niestymulowanych wykazywano mRNA dla IL-1β po 4 godzinach inkubacji w 37°C. W monocytach świeżo izolowanych z krwi nie wykrywano mRNA dla żadnej formy IL-1 [26].

Zarówno IL-1α, jak i IL-1β styntetyzowane są w komórce w formie prekursorowej i przetwarzane do formy biologicznie aktywnej [49]. Forma prekursorowa IL-1α również wykazuje aktywność biologiczną. Żadna z interleukin nie zawiera klasycznej sekwencji sygnalnej. W lizatach komórkowych odnajdywano jedynie formy prekursorowe, natomiast w supernatancie pohodowlanym stwierdzano zawartość obu form IL-1β, 17 i 31 kDa, co sugeruje, iż przemiana formy prekursorowej nie jest wymagana do zainicjowania fazy sekrecji.

Kinetyka pojawienia się i akumulacji formy prekursorowej i preformowanej IL-1β w podłożu są bardzo podobne [56]. Kinetyka wydzielania IL-1 jest unikalna w porównaniu z innymi białkami wydzielanymi zewnątrzkomórkowo. Znaczne ilości IL-1 są akumulowane wewnątrz komórki. Wewnątrzkomórkowy czas półtrwania wynosi odpowiednio dla IL-1α i IL-1β 15 i 2,5 godziny. Kinetyka wydzielania obu form interleukiny stanowi odzwiercie-

http://rcin.org.pl

dlenie tej różnicy czasu półtrwania. IL-1β jest wydzielana w sposób ciągły począwszy od 2. godziny syntezy, natomiast wydzielanie IL-1α jest opóźnione o około 10 godzin. Wydaje się, iż wydzielanie obu form interleukiny 1 podlega regulacji przez odrębny mechanizm, różny od klasycznej drogi przez retikulum endoplazmatyczne.

Niemal jednocześnie z akumulacją wewnątrzkomórkowej, prekursorowej IL-1 wykazano aktywność IL-1 związaną z błoną plazmatyczną [15, 17, 23, 78, 92, 97]. Wydzielanie IL-1 nigdy nie jest kompletne. Zawsze wykrywana jest aktywność związana z błoną plazmatyczną lub cytoplazmą. Ciągle nie wiadomo, jaki ostatecznie mechanizm jest odpowiedzialny za związanie IL-1 z błoną. Istnieją różne białka błonowe, które są kowalencyjnie wiązane z fosfatydyloinozytolem. W czasie, gdy odbywa się synteza tych białek, mają one sekwencję hydrofobową w części C-końcowej. Natychmiast po syntezie fragment hydrofobowy jest ucinany i zastąpiony przez glikofosfolipid, który zakotwicza białko w błonie. Wydaje się, iż ten rodzaj wiązania jest ważnym mechanizmem specyficznego uwalniania z błony komórkowej białek, które nie mają sekwencji sygnalnej [10]. Niewykluczone, że właśnie taki jest mechanizm wiązania IL-1 w błonie. Zezwala on na szybkie oderwanie się IL-1 bez niszczenia innych białek błony. Sugeruje się, iż obecność błonowej IL-1 jest wstępnym warunkiem i koniecznym do jej wydzielania na zewnątrz komórek aktywowanych [97]. Hipotetyczny mechanizm wiązania IL-1 z błoną wg Brody'ego i Durumà [17] przedstawia rysunek 1.

Zakłada on glikozylację formy prekursorowej IL-1α 33 kDa i związanie z błoną w sposób lektyno-podobny. Za takim modelem przemawiają następujące obserwacje:

- Błonowa IL-1 jest eluowana ze stymulowanych makrofagów za pomocą mannozy.
- Prekursor IL-1α ulega glikozylacji w hodowli makrofagów stymulowanych LPS.
- Inhibitory glikozylacji hamują wydzielanie biologicznie aktywnej IL-1, co sugeruje, iż w jej uwalnianiu pośredniczy receptor błonowy o swoistości receptora dla lektyn.
- Krótka trypsynizacja powoduje uwolnienie prekursora IL-1α do podłoża.

Tę koncepcję potwierdzają badania Beuschera i wsp. [15], którzy zidentyfikowali mysią, błonową IL-1 jako formę prekursorową IL-1α o masie 33 kDa. Bakouche i wsp. [10], badając aktywność interleukiny 1 we frakcjach komórkowych, wykazali, iż jest ona związana z fragmentami błony, lizosomami i cytosolem. IL-1 w postaci prekursorowej występuje w cytosolu, natomiast w formie aktywnej – we frakcji lizosomalnej. Sugeruje to inny jeszcze mechanizm uwalniania IL-1 z komórki: przekształcenie prekursora w formę aktywną wewnątrz komórki i wydzielanie przez pęcherzyki lizosomalne.

Aktywność biologiczna błonowej IL-1 wzrasta po związaniu z liposomami [11]. Podczas aktywacji monocytów LPS, liposomy transportują endotoksynę do cytoplazmy [12]. Gęstość cząsteczek LPS na liposomach wpływa na stopień aktywacji monocytów, mierzony syntezą wewnątrzkomórkowej IL-1, jej akumulacją w błonie i wydzielaniem do podłoża. Liposomy pośredniczą w aktywacji monocytów LPS zarówno na etapie syntezy IL-1, jak i aktywacji mechanizmu sekrecyjnego i obydwa te procesy mogą przebiegać niezależnie.

http://rcin.org.pl

CZYNNIKI MODULUJĄCE SYNTEZĘ IL-1

Poziom interleukiny 1, wewnątrzkomórkowej i wydzielanej na zewnątrz komórki, w hodowlach stymulowanych ulega modyfikacji w wyniku działania na komórki produkujące czynników, takich jak: związki farmakologiczne, składniki surowicy, cytokiny, wirusy, produkty pochodzenia bakteryjnego.

Inhibitory syntezy białek: cykloheksimid i puromycyna oraz inhibitory mRNA – aktynomycyna D hamują syntezę IL-1 w sposób zależny od dawki [6]. Prostaglandyny i prostacykliny redukują produkcję interleukiny 1. Nie zaobserwowano wpływu na produkcję IL-1 inhibitorów cyklooksygenazy, takich jak indometacyna i ibuprofen. Cytochalazyna B powoduje raczej wzmożenie produkcji IL-1.

Aktywowane makrofagi wykazują dużą gęstość powierzchniowych receptorów dla sterydów i nawet fizjologiczne dawki kortykosterydów hamują wydzielanie szeregu mediatorów reakcji zapalnych. Preinkubacja monocytów z deksametasonem lub hydrokortizonem prowadzi do zahamowania syntezy i wydzielania interleukiny zależnie od dawki. Przy większych dawkach (1.0 μM hydrokortizonu i 0.1 μM deksametasonu) nie wykrywa się aktywności IL-1 w supernatantach pohodowlanych monocytów, natomiast w lizatach komórkowych obserwuje się 50% aktywności maksymalnej uzyskiwanej w hodowlach stymulowanych endotoksyną [6, 16, 124]. Hamowanie wydzielania IL-1 przez sterydy zachodzi również in vivo [125]. Najprawdopodobniej jest to wynikiem ogólnego hamującego wpływu sterydów na funkcje makrofagów i monocytów. Nie można jednak wykluczyć innych mechanizmów, takich jak wpływ na katabolizm IL-1 bądź bezpośrednio na jej syntezę. Glukokortykoidy hamują syntezę IL-1 prawdopodobnie za pomocą dwóch różnych mechanizmów:

1) blokowania transkrypcji mRNA dla IL-1 podczas aktywacji monocytów,

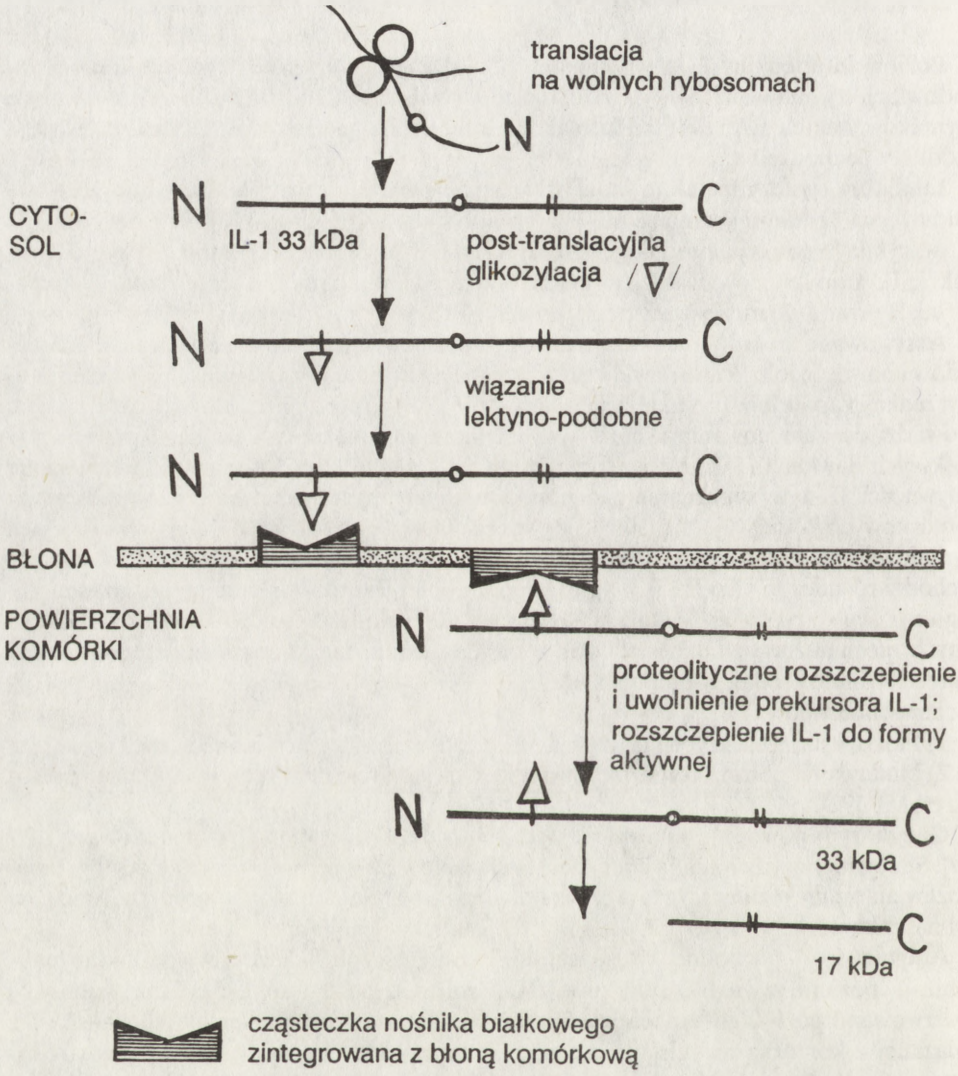
2) blokowania potranskrypcyjnej syntezy przez indukcję przejściowego wzrostu poziomu cAMP [72].

Gangliozydy powodują hamowanie wydzielania IL-1 przez monocyty stymulowane LPS [19]. Sjalogangliozydy hamują specyficzne wiązanie LPS z receptorami monocytów uniemożliwiając przekazanie sygnału powodującego uwolnienie IL-1 związanej z błoną na zewnątrz komórki.

Antybiotyki – pochodne kwasu nalidiksinowego, cyprofloksacyna i pefloksacyna – obniżają poziom zewnątrzkomórkowej IL-1 zależnie od dawki [115]. Efekt hamujący obserwowano po 1–2 godzinach inkubacji monocytów z antybiotykami. Aktywność IL-1 związanej z komórką nie ulegała zmianie. Jednocześnie nie obserwowano modyfikacji aktywności IL-1 spowodowanej reakcją z wymienionymi antybiotykami. Cyklofosfamid, działający immunosupresyjnie na funkcje makrofagów, powoduje hamowanie produkcji IL-1 in vitro i in vivo zależnie od dawki [99].

Modyfikacja DNA odgrywa istotną rolę w kontroli ekspresji genów dla IL-1 [74]. Komórki linii THP-1 stymulowane LPS syntetyzują IL-1, natomiast komórki U 937.1 nie produkują jej w wyniku takiej stymulacji. Po preinkubacji komórek U 937.1 z 5-azacytydyną następuje synteza mRNA dla IL-1β i uwalnianie interleukiny w hodowlach tych komórek stymulowanych LPS. Poziom mRNA dla IL-1β oraz wydzielanie interleukiny przez komórki THP-1 ulegały podwojeniu po traktowaniu azacytydyną. Nie zaobserwowano wzmożenia syntezy IL-1 przez obie linie komórkowe po działaniu 5-bromodezoksyurydyny nawet w

http://rcin.org.pl



Rys. 1. Schemat wiązania prekursora IL-1α z błoną komórkową [17]

obecności stymulatorów. Zatem synteza IL-1 może być przynajmniej częściowo regulowana przez metylację DNA. Metabolity witaminy D_3, znane z funkcji regulującej metabolizm wapnia w organizmie, wzmagają syntezę IL-1 przez komórki mysiej linii P388D1 stymulowane Con A [58]. Sugeruje to, iż działanie witaminy D_3 na szpik polega między innymi na

http://rcin.org.pl

modulacji produkcji interleukin regulujących aktywność komórek szpiku. Synteza IL-1 przez komórki P388D1 stymulowane LPS ulega wzmożeniu po dodaniu do hodowli neurohormonów [70]. Zjawisko to potwierdza hipotezę dotyczącą roli neurohormonów w indukowaniu i podtrzymywaniu chronicznych stanów zapalnych poprzez pobudzenie komórek układu immunologicznego, a w tym i produkcji IL-1. Składniki dopełniacza z reguły powodują wzmożenie syntezy IL-1 przez makrofagi i monocyty stymulowane LPS [110]. Poprzez mechanizm aktywacji dopełniacza w szeregu zjawisk biologicznych, takich jak reakcje antygen-przeciwciało, sepsy bakteryjne, nekroza tkanek, dochodzi do syntezy i wydzielania interleukiny 1. Znane są przykłady hamowania aktywności IL-1 przez składnik C1q dopełniacza lub kompleksy immunologiczne połączone z C1q w hodowlach niektórych linii limfoblastoidalnych komórek B [52].

Niektóre cytokiny modulują produkcję IL-1 przez komórki stymulowane. Ludzkie monocyty krwi obwodowej hodowane in vitro różnicują się w makrofagi i tracą zdolność do sekrecji IL-1 w odpowiedzi na LPS. Inkubacja monocytów z IFN-γ lub IFN-α przez 24 godziny hodowli zapobiega utracie zdolności sekrecyjnych. Różnice w działaniu obu interferonów ujawniają się podczas dłuższej inkubacji [44, 54, 57]. Sam IFN-γ nie indukuje wydzielania IL-1, natomiast wzmaga je w hodowlach monocytów stymulowanych niskimi dawkami LPS lub *Staphylococcus aureus*, niewystarczającymi do indukcji syntezy IL-1. Ponadto IFN-γ wykazuje zdolność reindukcji wydzielania IL-1 przez makrofagi, które utraciły właściwości sekrecyjne w czasie hodowli dłuższej niż 48 godzin. Z kolei IFN – α bezpośrednio indukuje wydzielanie IL-1 przez monocyty, lecz nie wzmaga jej w obecności stymulatorów i nie powoduje jej reindukcji. TNF – czynnik powodujący nekrozę tkanki nowotworowej może sam indukować syntezę IL-1 bądź wzmagać ją w hodowlach stymulowanych komórek [85, 91].

Udokumentowano regulację syntezy i wydzielania IL-1 przez samą interleukinę 1 zarówno in vitro, jak i in vivo [33, 138]. IL-1α indukuje ekspresję własnego genu oraz genu IL-1β. W surowicy królików szczepionych rekombinowaną ludzką IL-1α wykazywano obecność króliczej IL-1. Dodanie do hodowli jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka rekombinowanej ludzkiej IL-1α powodowało indukcję syntezy IL-1β. IL-1α indukowała w takich hodowlach syntezę prostaglandyny E_2 i było to związane z obniżeniem syntezy IL-1β. Dodanie indometacyny do hodowli zapobiegało spadkowi produkcji IL-1β indukowanej wysokimi stężeniami IL-1α. Wyniki te mogą mieć implikacje kliniczne, gdyż sugerują, że inhibitory cyklooksygenazy, stosowane często do zredukowania stanu zapalnego, w którym pośredniczy IL-1, mogą interferować ze zdolnością interleukiny do regulowania jej własnej syntezy.

Okazuje się, iż odwrotnie niż w przypadku stymulacji wydzielania IL-1 przez LPS wspomaganej przez IFN-γ produkcja IL-1 indukowana interleukiną 1 jest hamowana w obecności interferonu γ. Efekt hamujący IFN-γ ulega zniesieniu w obecności indometacyny [47, 137]. Bakterie lub składniki ściany komórkowej bakterii mogą same stymulować bądź modulować stymulację syntezy IL-1 indukowaną innymi czynnikami [63, 136]. Ostatnio wykazano, że infekcja ludzkich monocytów i makrofagów wirusem HIV-1 powodowała obniżenie wydzielania IL-1 do 20% wartości produkowanej przez komórki nie zainfekowane w odpowiedzi na stymulację lateksem lub LPS [119]. Udział tak wielu różnych czynników w modulacji syntezy i wydzielania IL-1 sugeruje, że ekspresja interleukiny 1 podlega regulacji na różnych poziomach tych procesów. Aktualny kierunek badań nad IL-1

http://rcin.org.pl

dotyczy mechanizmów jej działania i określenia w łańcuchu polipeptydowym sekwencji aminokwasowych odpowiedzialnych za poszczególne aktywności biologiczne.

LITERATURA

[1] AARDEN L. C., Revised nomenclature for antigen-nonspecific T-cell proliferation and helper factors, *Cell. Immunol.*, **48**: 433–436, 1979.
[2] ABO T., SUGAWARA S., AMENOMORI A., ITOH H., RIKIISHI M., MORO I., KUMAGAI K., Selective phagocytosis of Gram-positive bacteria and interleukin 1-like factor production by a subpopulation of large granular lymphocytes, *J. Immunol.*, **136**: 3189–3197, 1986.
[3] ACRES R. B., LARSEN A., CONLON P. J., IL1 expression in a clone of human T cells, *J. Immunol.*, **138**: 2132–2136, 1987.
[4] ALLISON A. C., The Interleukin-1 family of molecules, *BioEssays*, **3**: 260–262, 1986.
[5] AMENTO E. P., KURNICK J. J., KRANE S. M., Interleukin 1 production by human monocyte cell line, U937, is induced by a T-lymphocyte product, *Immunobiology*, **63**: 276, 1982.
[6] AREND W. P., MASSONI R. J., Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes, *Clin. Exp. Immunol.*, **64**: 656–664, 1986.
[7] AREND W. P., MASSONI R. J., NIEMANN M. A., GICLAS P. C., Absence of induction of IL-1 production in human monocytes by complement fragments, *J. Immunol.*, **142**: 173–178, 1989.
[8] ATKINS E., BODEL P., FRANCIS L., Release of an endogenous pyrogen in vitro from rabbit mononuclear cells, *J. Exp. Med.*, **126**: 357–386, 1967.
[9] AURON P. E., WARNER S. J. C., WEBB A. C., CONNON J. G., BERNHEIM H.A A., McADAM K. J. P. W., ROSENWASSER L. J., LO PRESTE G., MUCCI S. F., DINARELLO C. A., Studies on the molecular nature of human interleukin 1, *J. Immunol.*, **138**: 1447–1456, 1987.
[10] BAKOUCHE O., BROWN D. C., LACHMAN L. B., Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL1 release, *J. Immunol.*, **138**: 4249–4255, 1987.
[11] BAKOUCHE O., BROWN D. C., LACHMAN L. B., Liposomes expressing IL1 biological activity, *J. Immunol.*, **138**: 4256–4262, 1987.
[12] BAKOUCHE O., KOFF W. C., BROWN D. C., LACHMAN L. B., Interleukin 1 release by human monocytes treated with liposome-encapsulated lipopolysaccharide, *J. Immunol.*, **139**: 1120–1126, 1987.
[13] BERNHEIM H. A., BLOCK L. H., FRANCIS L., ATKINS E., Release of endogenous pyrogen-activating factor from concanavalin A-stimulated human lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **152**: 1811–1816, 1980.
[14] BERTOGLIO J. H., B-cell derived human interleukin 1, *CRC Critical Rev. Immunol.*, **8**: 299–314, 1988.
[15] BEUSCHER H. U., FALLON R. J., COLTEN H. R., Macrophage membrane interleukin 1 regulates the expression of acute phase proteins in human hepatoma Hep 3B cells, *J. Immunol.*, **139**: 1896–1901, 1987.
[16] BOCHNER B. S., RUTLEDGE B. K., SCHLEINER R. P., Interleukin 1 production by human lung tissue. II. Inhibition by anti-inflammatory steroids, *J. Immunol.*, **139**: 2303–2307, 1987.
[17] BRODY D. T., DURUM S. K., A plasma membrane anchoring mechanism for IL-1, Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, Alan R. Liss, Inc., 101–107, 1988.
[18] BUTLER T., SPAGNOULO P. J., GOLDSMITH G. H., AIKAWA M., Interaction of borrelia spirochetes with human mononuclear leukocytes causes production of leukocytic pyrogen and thromboplastin, *J. Lab. Clin. Med.*, **99**: 709–721, 1982.
[19] CAVAILLON J. -M., FITTING C., HAUTTECOEUR B., HAEFFNER-CAVAILLON N., Inhibition by gangliosides of the specific binding of lipopolysaccharide (LPS) to human monocytes prevents LPS-induced Interleukin-1 production, *Cell. Immunol.*, **106**: 293–303, 1987.
[20] CEBULA T. A., HANSON D. F., MOORE D. M., MURPHY P. A., Synthesis of four endogenous pyrogens by rabbit macrophages, *J. Lab. Clin. Med.*, **94**: 95–105, 1979.
[21] CHAO P., FRANCIS L., ATKINS E., The release of an endogenous pyrogen from guinea pig leukocytes in vitro, *J. Exp. Med.*, **145**: 1288–1298, 1977.
[22] CHARON J. A., LUGER T. A., MERGENHAGEN S. E., OPPENHEIM J. J., Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation, *Infect. Immun.*, **38**: 1190–1195, 1982.
[23] CONLON P. J., GRABSTEIN K. H., ALPERT A., PRICKETT K. S., HOPP T. S., GILLIS S., Localisation of human mononuclear cell interleukin 1, *J. Immunol.*, **139**: 98–102, 1987.

http://rcin.org.pl

[24] DAMIAS C., RIVEAU G., PARAUT M., GEROTA J., CHEDID L., Production of lymphocyte-activating factor in the absence of endogenous pyrogen by rabbit or human leukocytes stimulated by a muramyl dipeptide derivative, *Int. J. Immunopharmac.*, **4**: 451–462, 1982.
[25] DAYER J. M., ZAVADIL-GROB C., UCLA C., MACH P., Translation of mRNA into biological active mononuclear cell factor (≅ interleukin-1) which stimulates prostaglandin E_2 and collagenase production by synovial cells, *Clin. Res.*, **31**: 448 A, 1983.
[26] DEMCZUK S., BAUMBERGER C., MACH B., DAYER J. M., Expression of human IL 1 α and β messenger RNAs and IL 1 activity in human peripheral blood mononuclear cells, *J. Mol. Cell. Immunol.*, **3**: 255–265, 1987.
[27] DI GIOVINE F. S., MALAVISTA S. E., NUKI G., DUFF G. W., Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystalinduced IL 1, *J. Immunol.*, **138**: 3213–3218, 1987.
[28] DDINARELLO C. A., Demonstration of a human pyrogen-inducing factor during mixed leukocyte reactions, *J. Exp. Med.*, **153**: 1215–1224, 1981.
[29] DINARELLO C. A., Interleukin 1, *Rev. Inf. Dis.*, 6: 51–95, 1984.
[30] DINARELLO C. A., Interleukin-1, *Dig. Dis. Sci.*, **33** (3 Suppl.) 25S–35S, 1988.
[31] DINARELLO C. A., BODEL P. T., ATKINS E., The role of the liver in the production of fever and in pyrogenic tolerance, *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **81**: 334–343, 1968.
[32] DINARELLO C. A., GOLDIN N. P., WOLFF S. M., Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens, *J. Exp. Med.*, **139**: 1369–1381, 1974.
[33] DINARELLO C. A., IKEJIMA T., WARNER S. J. C., ORENCOLE S. F., LONNEMANN G., CONNON J. G., LIBBY P., Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro, *J. Immunol.*, **139**: 1902–1910, 1987.
[34] DINARELLO C. A., SHPARBER M., KENT E. J., jr. WOLFF S. M., Production of leukocytic pyrogen from phagocytes of neonates, *J. Infect. Dis.*, **144**: 337–343, 1981.
[35] DUFF G. W., ATKINS E., The inhibitory effect of polymyxin B on endotoxin-induced endogenous pyrogen production, *J. Immunol. Methods*, **52**: 333–340, 1982.
[36] DUFF G. W., GEKOWSKI K. M., ATKINS E., Endogenous pyrogen production stimulated by immune complexes, *Clin. Res.*, **30**: 364 A, 1982.
[37] DUPERE S. L., O'CONNOR I. E., OLDHAM R. K., Lymphokines/cytokines: biotherapeutic applications, *J. Immunol. Immunopharmacol.*, **8**: 201–210, 1988.
[38] DURUM S. K., SCHMIDT J. A., OPPENHEIM J. J., Interleukin 1: an immunological perspective, *Ann. Rev. Immunol.*, **3**: 263–287, 1985.
[39] ELIAS J. A., SCHREIBER A. D., GUSTILO K., CHIEN P., ROSSMAN M. D., LAMMIE P. J., DANIELE R. P., Differential interleukin 1 elaboration by unfractionated and density fractionated human alveolar macrophages and blood monocytes: relationship to cell maturity, *J. Immunol.*, **135**: 3198–3204, 1985.
[40] FLYNN A., FINKE J. H., HILFIKER M. L., Placental mononuclear phagocytes as a source of interleukin-1, *Science*, **218**: 475–477, 1982.
[41] FONTANA A., HENGARTNER H., TRIBOLET N., WEBER E., Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin-2-mediated effects, *J. Immunol.*, **132**: 1837–1844, 1984.
[42] FONTANA A., KRISTENSEN F., DUBS R., GEMSA D., WEBER E., Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C_6 glioma cells, *J. Immunol.*, **129**: 2413–2419, 1982.
[43] FUHLBRIGGE R. C., CHAPLIN D. D., KIELY J. -M., UNANUE E. R., Regulation of interleukin 1 gene expression by adherence and lipopolysaccharide, *J. Immunol.*, **138**: 3799–3802, 1987.
[44] GERRARD T. L., SIEGEL J. P., DYER D. R., ZOON K. C., Differential effect of interferon-alpha and interferon-gamma on interleukin 1 secretion by monocytes, *J. Immunol.*, **138**: 2535–2540, 1987.
[45] GERY I., GERSHON R. K., WAKSMAN B. H., Potentiation of T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell, *J. Exp. Med.*, **136**: 128–142, 1972.
[46] GERY I., WAKSMAN B. H., Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator/s/ *J. Exp. Med.*, **136**: 143–155, 1972.
[47] GHEZZI P., DINARELLO C. A., IL-1 induces IL-1. III. Specific inhibition of IL-1 production by IFN-γ, *J. Immunol.*, **140**: 4238–4244, 1988.
[48] GLIMAN S. C., ROSENBERG J. S., FELDMAN J. D., Inhibition of interleukin 1 synthesis and T cell proliferation by a monoclonal anti-Ia antibody, *J. Immunol.*, **130**: 1236–1240, 1983.
[49] GIRI J. G., LOMEDICO P. T., MIZEL S. B., Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1: A 33000 molecular weight precursor for interleukin 1, *J. Immunol.*, **134**: 343–349, 1985.

http://rcin.org.pl

[50] GRABNER G., LUGER T. A., SMOLIN G., OPPENHEIM J. J., Corneal epithelial cell-derived thymocyte-activating factor (CETAF), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **23**: 757–763, 1982.

[51] GUBLER U., CHUA A. O., STERN A. S., HELLMANN C. P., VITEK M. P., DECHIARA T. M., BENJAMIN W. R., COLLIER K. J., DUKOVICH M., FANNILLETTI P. C., FIEDLER-NAGY C., JENSON J., KAFFKA K., KILIAN P. L., STREMLO D., WITTREICH B. H., WOEHLE D., MIZEL S. B., LOMEDICO P. T., Recombinant human interleukin 1 α: purification and biological characterization, *J. Immunol.*, **136**: 2492–2497, 1986.

[52] HABICHT G. S., BECK G., GHEBREHIWET B., C1q inhibits the expression of B lymphoblastoid cell line interleukin 1 (IL 1), *J. Immunol.*, **138**: 2593–2597, 1987.

[53] HEAFFNER-CAVAILLON N., CAVAILLON J. -M., LAUDE M., KAZATCHKINE M. D., C3a (C3a desArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes, *J. Immunol.*, **139**: 794–799, 1987.

[54] HAQ A. V., MACA R. D., Role of IFN-gamma and alpha in IL 1 synthesis and secrection of in vitro differentiated human macrophages: a comparative study, *Immunobiology*, **171**: 451–460, 1986.

[55] HAUSER C., SAURAT J. H., SCHIFF A., JAUNIN F., DAYER J. M., Interleukin 1 is present in normal human epidermis, *J. Immunol.*, **136**: 3317–3323, 1986.

[56] HAZUDA D., LEE J., YOUNG P., The kinetics of IL 1 secretion from activated monocytes. Differences between IL 1 alpha and IL 1 beta, *J. Biol. Chem.*, **263**: 8473–8479, 1988.

[57] HERRMANN F., CANNISTRA S. A., LINDEMANN A., BLOHM D., RAMBALDI A., MERTELSMAN R. H., GRIFFIN J. D., Functional consequences of monocyte IL-2 receptor expression. Induction of IL-1β secretion by IFN-γ and IL-2, *J. Immunol.*, **142**: 139–143, 1989.

[58] HODLER B., EVEQUOZ V., TRECHSEL U., FLEISCH H., STADLER B., Influence of vitamin D_3 metabolites on the production of interleukins 1, 2 and 3, *Immunobiology*, **170**: 256–269, 1985.

[59] HUANG J. J., NEWTON R. C., RUTLEDGE S. J., HORUK R., MATTHEW J. B., COVINGTON M., LIN Y., Characterization of murine IL-1β. Isolation, expression and purification, *J. Immunol.*, **140**: 3838–3843, 1988.

[60] IHRIE E. J., WOOD D. D., Biochemical heterogeneity of human interleukin-1, *Lymphokine Research*, **4**: 169–181, 1985.

[61] IKEJIMA T., DINARELLO C. A., GILL M. D., WOLFF S. M., Toxic shock (TS) strains of *Staphylococcus aureus* are potent inducers of human leukocytic pyrogen (LP) and lymphocyte-activating factor (LAF), *Clin. Res.*, **31**: 496 A, 1983

[62] INAMIZU T., CHANG M. -P., MAKINODAN T., Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice, *Immunology*, **55**: 447–455, 1985.

[63] INAMURA N., NAKAHARA K., KURODA Y., YAMAGUCHI I., AOKI H., KOHSAKA M., Effect of *Nocardia rubra* cell wall skeleton on interleukin 1 production from mouse peritoneal macrophages, *Int. J. Immunopharmac.*, **10**: 547–554, 1988.

[64] KAMPSCHMIDT R. F., The numerous postulated biological manifestations of interleukin-1, *J. Leuk. Biol.*, **36**: 341–355, 1984.

[65] KAMPSCHMIDT R. F., PULLIAM L. A., Effect of human monocyte pyrogen on plasma iron, plasma zinc, and blood neutrophils in rabbits and rats, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **158**: 32–35, 1978.

[66] KAMPSCHMIDT R. F., WORTHINGTON M. L., MESECHER M. I., Release of interleukin-1 (IL-1) and IL-1-like factors from rabbit macrophages with silica, *J. Leuk. Biol.*, **39**: 123–132, 1986.

[67] KASAHARA T., MUKAIDA N., SHINOMIYA H., IMAI M., MATSUSHIMA K., WAKASUGI H., NAKAMO K., Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human interleukin 1α (IL 1 α), *J. Immunol.*, **138**: 1804–1812, 1987.

[68] KATARANOVSKI M., SIMIĆ M. M., Biochemical characteristics of rat interleukin 1 (IL-1), *Period. Biol.*, **85** (suppl. 3): 33–34, 1983.

[69] KENNEY J. S., MASADA M. P., EUGUI E. M., DELUSTRO B. M., MULKINS M. A., ALLISON A. C., Monoclonal antibodies to human recombinant interleukin 1 (IL 1) β: quantitation of IL 1β and inhibition of biological activity, *J. Immunol.*, **138**: 4236–4242, 1987.

[70] KIMBALL E. S., PERSICO F. J., VAUGHT J. L., Substance P, neurokinin A and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. Possible relevance to arthritic disease, *J. Immunol.*, **141**: 3564–3569, 1988.

[71] KNUDSEN P. J., DINARELLO C. A., STROM T. B., Purification and characterization of a unique human interleukin 1 from the tumor cell line U937, *J. Immunol.*, **136**: 3311–3316, 1986.

[72] KNUDSEN P. J., DINARELLO C. A., STROM T. B., Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U 937 cells, *J. Immunol.*, **139**: 4129–4134, 1987.

http://rcin.org.pl

[72a] KOJ A., Interleukina 1 – nowy hormon tkankowy działający na wiele komórek docelowych, *Post. Biol. Kom.*, **13**: 7–22, 1986.
[73] KORETZKY G. A., ELIAS J. A., KAY S. L., ROSSMAN M. D., NOWELL P. C., DANIELE R. P., Spontaneous production of interleukin 1 by human alveolar macrophages, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **29**: 443–450, 1983.
[74] KOVACS E. J., OPPENHEIM J. J., CARTER D. B., YOUNG H. A., Enhanced interleukin-1 production by human monocyte cell lines following treatment with 5-azacytidine, *J. Leuk. Biol.*, **41**: 40–46, 1987.
[74 a] KOWALCZYK-BRONISZ S. H., Interleukina-1 – jej właściwości fizykochemiczne i aktywności biologiczne, *Post. Hig. Med. Dośw.*, **42**: 353–378, 1988.
[75] KRAKAUER T., Structural analysis of the charge heterogeneity of human interleukin 1, *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**: 371–376, 1984.
[76] KRAKAUER T., Biochemical characterization of interleukin 1 from a human monocytic cell line, *J. Leuk. Biol.*, **37**: 511–518, 1985.
[77] KRANE S. M., GOLDRING S. R., DAYER J. -M., Interactions among lymphocytes, monocytes and other synovial cells in the rheumatoid synovium, [w] Lymphokines: a forum for immunoregulatory cell products, red. E. Pick, M. Landy, Academic Press, New York, 7: 75–136, 1982.
[78] KURT-JONES E. A., BEKLER D. I., MIZEL S. B., UNANUE E. R., Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 1204–1208, 1985.
[79] KURT-JONES E. A., FIERS W., POBER J. S., Membrane interleukin 1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts, *J. Immunol.*, **139**: 2317–2324, 1987.
[80] KURT-JONES E. A., VIRGIN H. W., UNANUE E. R., In vivo and in vitro expression of macrophage membrane interleukin-1 in response to soluble and particulate stimuli, *J. Immunol.*, 137: 10–14, 1986.
[81] LACHMAN L. B., Interleukin-1: release from LPS-stimulated mononuclear phagocytes, [w] Beneficial effects of endotoxin, red. A. Nowotny, Plenum Press, New York, 283–305, 1983.
[82] LACHMAN L. B., METZGAR R. S., Purification and characterization of human lymphocyte activating factor, [w] Biochemical characterization of lymphokines. Proceedings of the 2nd International Lymphokine Workshop, red. A. L. Weck, F. Kristensen, M. Landy, Academic Press, New York, 405–407, 1980.
[83] LASFARGUES A., LEDUR A., CHARON D., SZABO L., CHABY R., Induction by lipopolysaccharide of intracellular and extracellular interleukin 1 production: analysis with synthetic models, *J. Immunol.*, **139**: 429–436, 1987.
[84] LE P. T., TUCK D. T., DINARELLO C. A., HAYNES B. F., SINGER K. H., Human thymic epithelial cells produce interleukin 1, *J. Immunol.*, **138**: 2520–2526, 1987.
[85] LE J., WEINSTEIN D., GUBLER U., VILCEK J., Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts, *J. Immunol.*, **138**: 2137–2142, 1987.
[86] LEBAR S., CAVAILLON J. -M., CAROFF M., LEDUR A., BRADE H., SARFATI R., HAEFFNER-CAVAILLON N., Molecular requirement for interleukin-1 induction by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes: involvement of the heptosyl-2-keto-3-deoxyoctulosonate region, *Eur. J. Immunol.*, **16**: 87–91, 1986.
[87] LEE K. -C., WONG M., Mc INTYRE D., Characterization of macrophage subpopulations responsive to activation by endotoxin and lymphokines, *J. Immunol.*, **126**: 2474–2479, 1981.
[88] LEPE-ZUNIGA J. L., GERY I., Production of intra- and extracellular interleukin-1 (IL-1) by human monocytes, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **31**: 222–230, 1984.
[89] LEPE-ZUNIGA J. L., ZIGLER J. S., jr, ZIMMERMAN M. L., GERY I., Differences between intra- and extracellular interleukin-1, *Mol. Immunol.*, **22**: 1387–1392, 1985.
[90] LINDEMANN A., RIEDEL D., OSTER W., MEUER S. C., BLOHM D., MERTELSMAN R. H., HERRMANN F., Granulocyte-macrophage colonystimulating factor induces interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils, *J. Immunol.*, **140**: 837–839, 1988.
[91] LOCKSLEY R. M., HEINZEL F. P., SHEPARD H. M., AGOSTI J., EESSALU T. E., AGGARWAL B. B., HARLAN J. M., Tumor necrosis factors alpha and beta differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells, *J. Immunol.*, **139**: 1891–1895, 1987.
[92] LOMEDICO P. T., GUBLER U., HELLMANN C. P., DUKOVICH M., GIRI J. G., PAN Y. E., COLLIER K., SEMIONOW R., CHUA A. O., MIZEL S. B., Cloning and expression of murine interleukin-1 cDNA in *Escherichia coli*, *Nature*, **312**: 458–462, 1984
[93] LOVETT D. H., RYAN J. L., STERZEL R. B., A thymocyte-activating factor derived from glomerular mesangial cells, *J. Immunol.*, **130**: 1796–1801, 1983.

http://rcin.org.pl

[94] LUGER T. A., CHARON J. A., COLAT M., MICKSCHE M., OPPENHEIM J. J., Chemotactic properties of partially purified human epidermal cell derived thymocyte-activating factor (ETAF) for polymorphonuclear and mononuclear cells, *J. Immunol.*, **131**: 816–820, 1983.

[95] MASTRO A. M., BORTNER D. M., PISHAK S. A., DNA synthesis and production of interleukin 1 by lymph node macrophages in culture, *J. Leuk. Biol.*, **39**: 63–75, 1986.

[96] MATSUSHIMA K., PROCOPIO A., ABE H., SCOLA G., ORTALDO J. R., OPPENHEIM J. J., Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes, *J. Immunol.*, **135**: 1132–1136, 1985.

[97] MATSUSHIMA K., TAGUCHI M., KOVACS E. J., YOUNG H. A., OPPENHEIM J. J., Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL-1) activity and release of biologically active IL-1 from monocytes by trypsin and plasmin, *J. Immunol.*, **136**: 2883–2891, 1986.

[98] MATSUSHIMA K., TASATO G., BENJAMIN D., OPPENHEIM J. J., B-cell derived interleukin-1 (IL-1)-like factor, *Cell. Immunol.*, **94**: 418–426, 1985.

[99] McBRIDE W. H., HOON D. B., JUNG T., NAUNGAYAN J., NIZZE A., MORTON D. L., Cyclophosphamide-induced alterations in human monocyte functions, *J. Leuk. Biol.*, **42**: 659–666, 1987.

[100] MIZEL S. B., Interleukin 1 and T-cell activation, *Immunol. Today*, **8**: 330–332, 1987.

[101] MIZEL S. B., ANDERSON B. J., Interleukin-1 production by a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1), [w] Interleukins, Lymphokines and Cytokines, red. J. J. Oppenheim, S. Cohen, Academic Press, New York, 401–407, 1983.

[102] MIZEL S. B., DAYER J. -M., KRANE S. M., MERGENHAGEN S. E., Stimulation of rheumatoid synovial cell collagenase and prostaglandin producion by partially purified lymphocyte-activating factor (interleukin 1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 2474–2477, 1981.

[103] MIZEL S. B., MIZEL D., Purification to apparent homogeneity of murine interleukin 1, *J. Immunol.*, **126**: 834–837, 1981.

[104] MOORE R. N., OPPENHEIM J. J., FARRAR J. J., CARTER C. S., jr., WAHEED A., SHADDUCK R. K., Production of lymphocyte-activating factor (interleukin 1) by macrophages activated with colony stimulating factors, *J. Immunol.*, **125**: 1302–1305, 1980.

[105] MOSLEY B., DOWER S. K., GILLIS S., COSMAN D., Determination of the minimum polypeptide length of the functionally active sites of human interleukins 1 alpha and beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 4572–4576, 1987.

[106] MOSLEY B., URDAL D. L., PRICKETT K. S., LARSEN A., COSMAN D., CONLON P. J., GILLIS S., DOWER S. K., The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor, *J. Biol. Chem.*, **262**: 2941–2944, 1987.

[107] MURPHY P. A., SIMON P. L., WILLOUGHBY W. F., Endogenous pyrogens made by rabbit peritoneal exudate cells are identical with lymphocyte-activating factors made by rabbit alveolar macrophages, *J. Immunol.*, **124**: 2498–2501, 1980.

[108] MYERS M. J., PULLEN J. K., GHILDYAL N., EUSTIS-TUSF E., SCHOOK L. B., Regulation of IL-1 and TNF-α expression during the differentiation of bone marrow derived macrophage, *J. Immunol.*, **142**: 153–160, 1989.

[109] NEWTON R. C., Human monocyte production of interleukin-1: parameters of the induction of interleukin-1 secretion by lipopolysaccharides, *J. Leuk. Biol.*, **39**: 299–311, 1986.

[110] OKUSAWA S., DINARELLO C. A., YANCEY K. B., ENDRES S., LAWLEY T. J., FRANK M. M., BURKE J. F., GELFAND J. A., C5a induction of human interleukin 1. Synergistic effect with endotoxin or interferon γ. *J. Immunol.*, **139**: 2635–2640, 1987.

[111] OPPENHEIM J. J., There is more than one interleukin 1, *Immunol. Today*, **7**: 45–47, 1986.

[112] OPPENHEIM J. J., TOGAWA A., CHEDID L., MIZEL S. B., Components of mycobacteria and muramyl dipeptide with adjuvant activity induce lymphocyte activating factor, *Cell Immunol.*, **50**: 71–81, 1980.

[113] PALACIOS R., IRHED I., SIDERAS P., Accessory function of human tumor cell lines. I. Production of interleukin 1 by the human hystiocytic lymphoma cell line U-937, *Eur. J. Immunol.*, **12**: 895–899, 1982.

[114] REVOLTELLA R. P., BUTLER R. H., MURIANI P., PANTELLI M., RANELLETTI F. O., Interleukin-1 production by a cloned line of human monocyte-like cells (CM-SM). Correlation with state of differentiation, *Scand. J. Immunol.*, **21**: 11–20, 1985.

[115] ROCHE Y., FAY M., GONGEROT-POCIDALO M. A., Effects of quinolones on interleukin 1 production on vitro by human monocytes, *J. Appl. Physiol.*, **61**: 1864–1868, 1986.

[116] ROSENTHAL A. S., Regulation of the immune response – role of the macrophage, *N. Engl. J. Med.*, **303**: 1153–1156, 1980.

http://rcin.org.pl

[117] ROSENWASSER L. J., DINARELLO C. A., ROSENTHAL A. S., Adherent cell function in murine T-lymphocyte recognition. IV. Enhancement of murine T-cell antigen recognition by human leukocytic pyrogen, *J. Exp. Med.*, **150**: 709–714, 1979.

[118] ROSENWASSER L. J., DINARELLO C. A., Ability of human leukocytic pyrogen to enhance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation, *Cell. Immunol.*, **63**: 134–142, 1981.

[119] ROY S., FITZ-GIBBON L., POULIN L., WAINBERG M. A., Infection of human monocytes/macrophages by HIV-1: effect on secretion of IL-1 activity, *Immunology*, **64**: 233–239, 1988.

[120] SAUDER D. N., CARTER C. S., KATZ S. I., OPPENHEIM J. J., Epidermal cell production of thymocyte-activating factor (ETAF), *J. Invest. Dermatol.*, **79**: 34–39, 1982.

[121] SAUDER D. N., DINARELLO C. A., MORHEM V. B., Langerhans cell production of interleukin-1, *J. Invest. Dermatol.*, **82**: 605–611, 1984.

[122] SIMON P. L., LEE J. C., Evidence for shared antigenic determinants on rabbit and human interleukin 1 (IL 1), *J. Immunol.*, **137**: 557–562, 1986.

[123] SIMON P. L., WILLOUGHBY W. F., The role of subcellular factors in pulmonary immune function: physicochemical characterization of two distinct species of lymphocyte-activating factor produced by rabbit alveolar macrophages, *J. Immunol.*, **126**: 1534–1541, 1981.

[124] SNYDER D. S., UNANUE E. R., Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin-1 production, *J. Immunol.*, **129**: 1803–1805, 1982.

[125] STARUCH M. J., WOOD D. D., Reduction of serum interleukin-1-like activity after treatment with dexamethasone, *J. Leuk. Biol.*, **37**: 193–207, 1985.

[126] STEEG P. S., JOHNSON H. M., OPPENHEIM J. J., Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokines: inhibitory effect of endotoxin, *J. Immunol.*, **129**: 2402–2406, 1982.

[127] STIMPEL M., PROKSCH A., WAGNER H., LOHMANN-MATTHES M. -L., Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*, *Infect. Immun.*, **46**: 845–849, 1984.

[128] STOŠIĆ-GRUJIĆIĆ S., SIMIĆ M. M., Mechanisms of poly I:C adjuvant action: effect on macrophages and interleukin 1 production *Period. Biol.*, **85**, Suppl. 3: 31–32, 1983.

[129] SZTEIN M. B., VOGEL S. N., SIPE J. D., MURPHY P. A., MIZEL S. B., OPPENHEIM J. J., ROSENSTREICH D. L., The role of macrophages in the acute-phase response: SAA inducer is closely related to lymphocyte activating factor and endogenous pyrogen, *Cell. Immunol.*, **63**: 164–176, 1981.

[130] TAMATANI T., TSUNODA H., IWASAKI H., KANEKO M., HASHIMOTO T., ONOZAKI K., Existance of both IL-1α and β in normal human amniotic fluid: unique high molecular weight form of IL-1β, *Immunology*, **65**: 337–342, 1988.

[131] TARTAKOVSKY B., KOVACS E. J., TAKACS L., DURUM S. K., T cell clone producing an IL-1 activity after stimulation by antigen-presenting B cells, *J. Immunol.*, **137**: 160–166, 1986.

[132] TIKU K., TIKU M. L., SKOSEY J. L., Interleukin 1 production by human polymorphonuclear neutrophils, *J. Immunol.*, **136**: 3677–3685, 1986.

[133] TOCCI M. J., HUTCHINSON N. I., CAMERON P. M., KIRK K. E., NORMAN D. J., CHIN J., RUPP E. A., LIMJUCO G. A., BOUILLA-ARGUDO V. M., SCHMIDT J. A., Expression in *Escherichia coli* of fully active recombinant human IL 1β: comparison with native human IL 1β, *J. Immunol.*, **138**: 1109–1114, 1987.

[134] TREVES A. J., BARAK V., TAL T., FUKS Z., Constitutive secretion of interleukin 1 by human monocytes, *Eur. J. Immunol.*, **13**: 647–651, 1983.

[135] UNANUE E. R., The regulation of lymphocyte functions by the macrophage, *Immunol. Rev.*, **40**: 227–255, 1978.

[136] VERMEULEN M. W., DAVID J. R., REMOLD H. G., Differential mRNA responses in human monocytes activated by interferon-γ and muramyl dipeptide, *J. Immunol.*, **139**: 7–9, 1987.

[137] VERMEULEN M. W., REMOLD H. G., Differential effects on human monokine transcription and translation following stimulation with LPS plus γ-interferon, [w] Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, A. R. Liss, Inc., 119–123, 1988.

[138] WAKASUGI H., HAREL A., DOKHELAR M. C., FRADELIZI D., TURSZ T., Accessory function and interleukin 1 production by human leukemic cell lines, *J. Immunol.*, **132**: 2939–2947, 1984.

[139] WARNER S. J. C., AUGER K. R., LIBBY P., Interleukin 1 induces interleukin 1. II. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult human vascular endothelial cells, *J. Immunol.*, **139**: 1911–1916, 1987.

http://rcin.org.pl

[140] WATSON J., Role of the interleukins in lymphocyte activation, [w] Mechanisms of lymphocyte activation, red. Resch, Kirchner, Elsevier/North-Holland Biomedical Press BV, 125–138, 1981.
[141] WOOD D. D., Purification and properties of human B cell-activating factor. I. Comparison of the plaque-stimulating activity with thymocyte-stimulating activity, *J. Immunol.*, **123**: 2395–2399, 1979.
[142] WOOD D. D., Mechanism of action of human B cell-activating factor, *J. Immunol.*, **123**: 2400–2407, 1979.
[143] WUNDERLICH D. A., LOBL T. J., PASLAY J. W., BERGER A. E., Generation of neutralizing monoclonal antibodies specific for human interleukin-1 beta, [w] Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, A. R. Liss, Inc., 383–385, 1988.
[144] YAMASHITA U., SHIRAKAWA F., NAKAMURA H., Production of interleukin 1 by adult T cell leukemia (ATL) cell lines, *J. Immunol.*, **138**: 3284–3289, 1987.

Otrzymano: 24 kwietnia 1989
Przyjęto: 15 sierpnia 1989
Adres autorki:
Instytut Zoologii Uniwersytetu Warszawskiego, Zakład Immunologii
02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93

http://rcin.org.pl

UDZIAŁ CYTOSZKIELETU W PROCESIE RÓŻNICOWANIA KSYLEMU W ROŚLINACH WYŻSZYCH

INVOLVEMENT OF THE CYTOSKELETON IN THE PROCESS OF XYLEM DIFFERENTIATION IN HIGHER PLANTS

Wiesława KUTERNOZIŃSKA

Zakład Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Streszczenie. W artykule przedstawiono badania dotyczące zmian układu cytoszkieletu w procesie różnicowania komórek roślinnych w elementy ksylemu oraz jego rolę w odkładaniu mikrofibryli celulozy. Poglądy pierwszych badaczy (lata sześćdziesiąte) na rolę cytoszkieletu, a zwłaszcza mikrotubul, w procesie ksylogenezy zostały potwierdzone i rozszerzone przez następnych autorów wykorzystujących nowe techniki fluorescencyjne do określenia zmian w układzie cytoszkieletu oraz technikę *freeze-etching* do badania struktur Golgiego. Na podstawie danych przedstawionych w artykule, dotyczących badań nad ksylogenezą oraz nad cytoszkieletem komórek zwierzęcych, zwłaszcza nad białkami umożliwiającymi transport organelli wzdłuż mikrotubul, w ostatnim rozdziale podjęto próbę podsumowania obecnie dostępnych wiadomości o mechanizmie odkładania wtórnej ściany komórkowej.

Summary. Investigations concerning the changes of the cytoskeleton in the process of plant cell differentiation to xylem elements and the role of the cytoskeleton in cell wall deposition are discussed. Views of the first investigators (the 60s) on the role of the cytoskeleton, especially of microtubules, in the process of xylogenesis were confirmed and extended by the authors who used new techniques of the cytoskeleton fluorescent labelling and the freeze-etching technique to investigate changes in the Golgi apparatus. In the last paragraph the presently available informations concerning the mechanism of secondary wall deposition are summarized. Attention has been paid to the cytoskeleton, Golgi apparatus and plasma membrane co-operation in the process of secondary wall deposition.

WSTĘP

Odkrycie nowych struktur komórkowych zawsze nasuwało pytania dotyczące ich roli w różnorodnych procesach zachodzących w komórce. Newcomb [66] opisał różnorodne funkcje przypisywane mikrotubulom przez różnych autorów już sześć lat po odkryciu ich

http://rcin.org.pl

w komórce roślinnej przez Ledbetera i Portera [54]. Zwrócił m.in. uwagę na badania, których wyniki pozwoliły sądzić, że mikrotubule mogą być odpowiedzialne za symetrię komórek roślinnych poprzez kontrolowanie procesu odkładania ściany komórkowej. Opisane przez cytowanych przez niego autorów rozmieszczenie mikrotubul pod błoną plazmatyczną w komórkach odkładających pierwotną lub wtórną ścianę komórkową (mikrotubule biegną zwykle pod błoną plazmatyczną równolegle do nowo odkładanych mikrofibryli celulozy) potwierdzało przypuszczenia odkrywców mikrotubul, że mogą one być zaangażowane w tym procesie.

Cronshaw [10] na podstawie badań przeprowadzonych na komórkach tytoniu różnicujących w elementy ksylemu doszedł do wniosku, że enzymy syntetyzujące celulozę znajdują się w błonie plazmatycznej. Autor ten posługując się techniką mikroskopii elektronowej opisał również występowanie licznych pęcherzyków Golgiego w pobliżu błony plazmatycznej oraz zakotwiczenie w niej mikrotubul.

Newcomb [66] uznał, że brak jest dowodów, aby mikrotubule były bezpośrednio zaangażowane w syntezę mikrofibryli celulozy. Ich związek z odkładaniem ściany komórkowej ma według niego charakter pośredni poprzez określanie orientacji nowo syntetyzowanych mikrofibryli. Podobnie Pickett-Heaps i Northcote [70] sugerowali, że mikrotubule kontrolują kierunek poruszania się w błonie plazmatycznej enzymów syntetyzujących celulozę i w ten sposób wpływają na orientację mikrofibryli.

Poglądy te zostały potwierdzone dzięki odkryciu w 1967 roku przez Taylora i wsp. [4, 5, 81], że dimery tubuliny wiążą kolchicynę, co uniemożliwia ich polimeryzację. Jeszcze w tym samym roku Pickett-Heaps [cyt. za 66] badając wpływ kolchicyny na różnicowanie ksylemu w siewkach pszenicy stwierdził, że zahamowanie funkcji mikrotubul nie hamuje odkładania wtórnej ściany komórkowej, ale zakłóca jej wzór.

W ciągu kilku następnych lat badania koncentrowały się na budowie zarówno mikrotubul, jak i mikrofilamentów, których głównym składnikiem jest aktyna [35]. Zwracano uwagę na ich zaangażowanie również w innych procesach przebiegających w komórce roślinnej, takich jak mitoza i ruchy cytoplazmy. Dane na temat mikrotubul, ich budowy i znanych do 1974 roku funkcji zostały podane przez Kwiatkowską [51, 52].

Badania sekwencji aminokwasów α-tubuliny izolowanej z witek spermatozoidów jeżowca i mózgu kurczęcia przeprowadzone w 1973 roku przez Ludueña [cyt. za 35] oraz badania krzyżowej reakcji w żelach serologicznych tubuliny izolowanej z różnych organizmów [11, 26] wykazały, że tubulina może być wysoko konserwatywnym białkiem. Stwierdzono jednak istotne różnice we wrażliwości tubuliny pochodzącej z różnych struktur komórkowych na takie czynniki, jak niska temperatura, kolchicyna lub enzymy proteolityczne [35].

Badania prowadzone w następnych latach koncentrowały się nie tylko na strukturze białek budujących cytoszkielet, ale coraz więcej uwagi poświęcano mechanizmom jego działania in vivo. Stwierdzono, że cytoszkielet jest dynamiczną strukturą, która zmienia się zarówno w trakcie przechodzenia komórki przez różne fazy cyklu komórkowego, jak i w procesie różnicowania [8, 12, 15, 33, 80].

Jednym z najczęściej badanych in vivo i in vitro oraz najlepiej poznanych procesów różnicowania komórek roślinnych jest ksylogeneza [1, 14, 48, 61, 62, 69, 82, 88, 90, 91]. W miarę wzbogacania wiedzy na temat różnych czynników wpływających na indukcję i przebieg procesów zmierzających do różnicowania komórek w elementy ksylemu oraz dzięki rozwojowi nowych technik umożliwiających uwidocznienie elementów cytoszkieletu powrócono również do zagadnienia postawionego wcześniej: jaka jest rola cytoszkieletu w

http://rcin.org.pl

procesie różnicowania ksylemu [76]. Badanie tego zagadnienia w dużej mierze było możliwe dzięki opracowaniu układu doświadczalnego, w którym duży procent komórek mezofilu *Zinnia elegans* L. hodowanych in vitro różnicował w elementy trachealne [17, 18, 24, 25, 46, 47, 83]. Procesy różnicowania obserwowane w tym układzie, jak również w innych układach in vitro, przypominają różnicowanie komórek proto- i metaksylemu w roślinach wyższych [21] (rys. 1).

Rys. 1. Różnicujące się w elementy trachealne komórki kalusa *Haplopappus gracilis* (Nutt.) A. Gray mają siateczkowaty wzór wtórnej ściany komórkowej przypominający wzór ściany komórek protoksylemu (zdjęcie oryginalne, wykonane w Lab. Cytofizjologii Zakładu Fizjologii Roślin PAN)

MIKROTUBULE

Badania układu mikrotubul w komórce roślinnej rozwinęły się w ostatnim dziesięcioleciu dzięki opracowanej przez Franke i wsp. w 1977 roku [cyt. za 53] metodzie immunolokalizacji tubulin. W metodzie tej wykorzystuje się monoklonalne przeciwciała szczura skierowane przeciw tubulinie drożdży [17, 18], a następnie znakowane barwnikami fluorescencyjnymi przeciwciała koźle lub królicze skierowane przeciw IgG szczura [17, 18].

Mikrotubule, jak wykazano, mogą występować w rozmaitych obszarach cytoplazmy. Możemy wyróżnić:

- mikrotubule kortykalne znajdujące się pod błoną plazmatyczną w komórkach będących w interfazie,
- przedprofazowe pasmo mikrotubul otaczających jądro komórkowe,
- mikrotubule wrzeciona kariokinetycznego tworzonego podczas mitozy lub mejozy,

http://rcin.org.pl

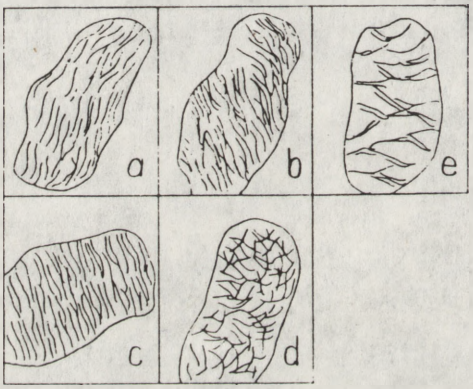
● mikrotubule fragmoplastu [6, 12, 28, 43, 53].

Komórki kambium w całych roślinach, jak i komórki hodowane in vitro mogą rozpocząć procesy różnicowania w elementy ksylemu, gdy są w fazach G_1 lub G_2 cyklu komórkowego [76, 86]. Z tego względu interesujące z punktu widzenia badań ksylogenezy są zmiany ułożenia i funkcji mikrotubul kortykalnych. Stwierdzono następujące zmiany:

1° Ułożone są one pod błoną plazmatyczną tworząc nieregularną sieć w izodiametrycznych komórkach [17, 19, 20, 30].

2° Mogą być regularnie ułożone, poprzecznie do długiej osi, w wydłużających się komórkach [17, 19, 20].

3° Mogą też być ułożone równolegle lub pod kątem ostrym w stosunku do długiej osi komórki [18, 45, 56] (rys. 2a, b, c, d).



Rys. 2. Układ mikrotubul kortykalnych w komórkach mezofilu *Zinnia elegans* L. hodowanych in vitro: a, b, c, d – komórki w trzy dni po rozpoczęciu hodowli, e – komórka, która odkłada wtórną ścianę komórkową; trzy dni po rozpoczęciu hodowli w 48% komórek mikrotubule układają się równolegle do długiej osi komórki (a); w 33% komórek mikrotubule układają się pod pewnym kątem do długiej osi komórki (b); w 7% komórek mikrotubule są ułożone prostopadle do długiej osi komórki (c); reszta komórek ma przypadkowy układ mikrotubul kortykalnych (d) (schematy wykonano na podstawie zdjęcia 1 z [18]; (e) układ mikrotubul kortykalnych odzwierciedla wzór odkładania wtórnej ściany komórkowej, której zgrubienia znajdują się nad mikrotubulami kortykalnymi zgrupowanymi w pasma (schemat wykonano na podstawie zdjęcia 4a z [17])

Zmiany układu mikrotubul we wczesnych etapach ksylogenezy najdokładniej badano w różnicujących komórkach mezofilu *Z. elegans* hodowanych in vitro. W takich hodowlach pierwsze elementy trachealne pojawiają się między 4. a 6. dniem. Zanim jednak zacznie się odkładanie ściany komórkowej, mikrotubule gromadzą się w tych komórkach w ciągłe pasma: pierścieniowe, spiralne lub siateczkowate, ułożone pod błoną plazmatyczną [17, 45]. Komórki takie wytwarzają później wtórną ścianę komórkową odpowiednio typu pierścieniowego, spiralnego bądź siateczkowatego, przypominającą ściany komórkowe protoksylemu [21]. Jeżeli hodowla jest kontynuowana, następuje w komórkach dodatkowe odkładanie wtórnej ściany komórkowej i większość elementów trachealnych, obecnych w hodowli między 10. a 13. dniem, ma wtórną ścianę komórkową typu siateczkowatego lub jamkowanego, przypominającą ścianę komórek metaksylemu [21]. Układ mikrotubul w drugim typie komórek zmienia się przed rozpoczęciem procesu dodatkowego odkładania wtórnej ściany komórkowej. Nie rozstrzygnięto ostatecznie, czy mikrotubule pojawiające się w tych komórkach i kierujące dodatkowym odkładaniem ściany komórkowej powstają z tubuliny syntetyzowanej de novo, czy też wykorzystywana jest tubulina powstała po dysocjacji poprzednich grup mikrotubul [21]. Ilość tubuliny w komórkach mezofilu *Z. elegans* różnicujących w elementy ksylemu gwałtownie wzrasta, zanim widoczne są zmiany

http://rcin.org.pl

morfologiczne, co według niektórych autorów wskazuje, że różnicujące komórki syntetyzują tubulinę do novo [22, 23].

Z badań nad mikrotubulami znajdującymi się w komórkach zwierzęcych wynika, że różne struktury zbudowane z mikrotubul zawierają różne typy tubulin α i β. Tubulina może również podlegać obróbce potranslacyjnej, co determinuje jej zdolność budowania mikrotubul [12]. Występowanie różnych izotypów tubulin α i β zostało również potwierdzone dla niektórych komórek roślinnych [42]. Można więc przypuszczać, że tubulina wchodząca w skład mikrotubul kortykalnych komórek odkładających pierwotną ścianę komórkową jest odmienna od wchodzącej w ich skład w komórkach różnicujących w elementy ksylemu.

We wszystkich badanych dotychczas układach komórek różnicujących się w elementy ksylemu w komórkach, które jeszcze były żywe, zawsze znajdowano mikrotubule pod błoną plazmatyczną w miejscach, gdzie odkładana była wtórna ściana komórkowa [17, 18, 21, 45, 72, 73]. Ten związek mikrotubul ze wzorem odkładania wtórnej ściany komórkowej został potwierdzony również przez liczne badania, w czasie których traktowano komórki czynnikami oddziałującymi na ułożenie mikrotubul lub polimeryzację tubuliny. Przykładowo kolchicyna, której dodanie blokuje polimeryzację tubuliny oraz hamuje syntezę etylenu [67], powoduje tworzenie nietypowej wtórnej ściany komórkowej w różnicujących się komórkach mezofilu *Z. elegans* [25, 45], w regenerujących ścianę komórkową protoplastach *Mougeotia* [59] i wielu innych typach komórek [35]. APM *(amiprophos-methyl)*, herbicyd, który prawdopodobnie hamuje syntezę tubuliny selektywnie zmniejszając ilość mRNA [9] lub wpływa na poziom wewnątrzkomórkowego wapnia [cyt. za 20] i w ten sposób powoduje depolimeryzację mikrotubul [20], wpływa na zmianę kształtu komórek. Komórki *Z. elegans* stają się kuliste i odkładają wtórną ścianę komórkową o wzorze innym niż w komórkach kontrolnych [19]. Taksol (pochodna taksanu otrzymanego z *Taxus brevifolia*, estryfikowana przy C-13), który stabilizując mikrotubule oraz zwiększając ich liczbę [41] hamuje podziały komórek HeLa i fibroblastów oraz zmienia rozkład i organizację organelli w neuronach [3], dodany do hodowli komórek mezofilu *Z. elegans* przed wystąpieniem typowych dla różnicowania zmian układu mikrotubul, powoduje odkładanie wtórnej ściany komórkowej o nietypowych pasmach biegnących równolegle do długiej osi komórki [20]. Cytochalazyna B, która wiążąc się do końca filamentu F-aktyny hamuje przyłączanie następnych monomerów aktyny, dodana do hodowli komórek mezofilu *Z. elegans*, w których układ mikrotubul nie zmienił się jeszcze z równoległego do długiej osi komórki na poprzeczny, powoduje również powstanie komórek o wzorze wtórnej ściany równoległym do długiej osi komórki [45]. Etylen, który jest wydzielany przez komórki poddane stresowi oraz stymuluje ksylogenezę [75] i kontroluje lignifikację [60], powoduje w traktowanych nim komórkach epidermalnych epikotyli grochu i hypokotyli fasoli zmianę orientacji mikrotubul [77], a także zmianę orientacji mikrofibryli celulozy [2, 65].

W żadnym z badanych dotychczas układów nie stwierdzono, aby zmiany w układzie mikrotubul lub ich depolimeryzacja hamowały odkładanie ściany komórkowej. Potwierdza to wspomniane wyżej przypuszczenia pierwszych badaczy zajmujących się w latach sześćdziesiątych rolą mikrotubul w odkładaniu ściany komórkowej, że mikrotubule zaangażowane są w proces orientacji mikrofibryli celulozy, a nie w samą syntezę mikrofibryli.

http://rcin.org.pl

AKTYNA

Badania nad rozmieszczeniem F-aktyny w komórkach roślinnych mogły się rozwinąć dzięki opracowaniu technik wykorzystujących znakowane barwnikami fluorescencyjnymi fallotoksyny, np. falloidynę izolowaną z *Amanita phalloides* [89]. Fallotoksyny wiążą się z filamentami F-aktyny stabilizując ich strukturę [87] tak, że stają się one niewrażliwe na czynniki depolimeryzujące (np. KJ), denaturację cieplną i na działanie cytochalazyny B. Znakowane barwnikami fluorescencyjnymi rodaminą [43] lub izotiocyjanianem fluoresceiny [44, 45], fallotoksyny pozwalają określać położenie filamentów F-aktyny w komórkach. Wykazano:

1° F-aktyna występuje w grubych pasmach cytoplazmy biegnących od jądra w kierunku błony plazmatycznej oraz w warstwie korowej cytoplazmy w komórkach będących w interfazie.

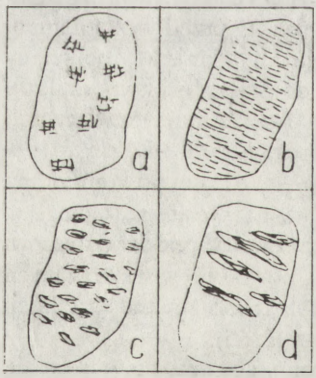
2° Znajduje się w przedprofazowym pierścieniu otaczającym jądro.

3° Wchodzi w skład wrzeciona kariokinetycznego.

4° Filamenty F-aktyny znajdują się również między podwójnym pierścieniem mikrotubul fragmoplastu tworząc fragmosom.

5° Filamenty te łączą dzielące się jądro z bocznymi ścianami komórki determinując płaszczyznę podziału [13, 55, 58].

Zmiany zachodzące w układzie filamentów F-aktyny w komórkach różnicujących się w elementy ksylemu okazały się być równie istotne jak zmiany w układzie mikrotubul. W komórkach będących w interfazie filamenty F-aktyny są ułożone pod błoną plazmatyczną poprzecznie do długiej osi komórki, a równolegle do mikrotubul kortykalnych w wydłużających się komórkach [55, 80] lub tworzą sieć leżącą między chloroplastami a błoną plazmatyczną [44] (rys. 3). W komórkach, które otrzymały sygnał do różnicowania, układ



Rys. 3. Układ filamentów F-aktyny w komórkach mezofilu *Zinnia elegans* L. hodowanych in vitro: a, b – w komórkach, które jeszcze nie rozpoczęły różnicowania; c, d – w komórkach odkładających wtórną ścianę komórkową; filmenty F-aktyny w komórkach nieróżnicujących się leżą pomiędzy chloroplastami a błoną plazmatyczną (a) (schemat wykonano na podstawie zdjęcia 1a z [44]) lub są ułożone poprzecznie do długiej osi komórki w wydłużających się komórkach (b); w komórkach, które odkładają wtórną ścianę komórkową, filamenty F-aktyny zbierają się w okrągłe lub eliptyczne agregaty leżące między mikrotubulami (c); w części komórek F-aktyna układa się w dłuższe pasma również leżące między mikrotubulami (d) (schematy wykonano na podstawie zdjęć 2a, d, g z [45])

ten zmienia się. W najlepiej pod tym względem zbadanych komórkach mezofilu *Z. elegans* wspomniane struktury zanikają [44], pojawiają się natomiast grube wiązki filamentów F-aktyny, równoległe do długiej osi komórki. Potem i te struktury zanikają, natomiast można wykazać obecność ognisk organizacji filamentów F-aktyny, same zaś filamenty układają się poprzecznie do długiej osi komórki. Natomiast w komórkach, które już zaczęły odkładać wtórną ścianę komórkową, filamenty F-aktyny znajdowano w przestrzeniach między mikrotubulami [44, 45, 50]. Wtórna ściana komórkowa nie była w tych miejscach odkładana. Z badań Kobayashi i wsp. [45] wynika, że cytochalazyna B dodana do hodowli

http://rcin.org.pl

komórek mezofilu *Z. elegans,* zanim nastąpią opisane wyżej zmiany układu filamentów F-aktyny, powoduje odkładanie wtórnej ściany komórkowej o nietypowym wzorze.

Fakt, że w roślinach występuje kilka genów kodujących aktynę i np. różnice w sekwencji aminokwasów pomiędzy różnymi formami aktyny występującej w tej samej roślinie mogą wynosić kilka procent [40], pozwala również przypuszczać, że różne struktury obserwowane w komórkach, w których skład wchodzi aktyna, są tworzone przez różne jej formy.

WZAJEMNE POWIĄZANIE ZMIAN UKŁADU RÓŻNYCH ELEMENTÓW CYTOSZKIELETU

Układ poszczególnych elementów cytoszkieletu jest ściśle ze sobą powiązany. W odniesieniu do komórek roślinnych dysponujemy informacjami dotyczącymi powiązań między zmianami układów mikrotubul i filamentów F-aktyny.

Traas i wsp. [cyt. za 58] stwierdzili, że kortykalne filamenty F-aktyny traciły swój poprzeczny do długiej osi komórki układ, jeżeli potraktowali komórki marchwi kremartem, czynnikiem depolimeryzującym mikrotubule. Podobnie kolchicyna działająca na mikrotubule, dodana do zawiesiny różnicujących się w elementy ksylemu komórek mezofilu *Z. elegans* uniemożliwiła zajście typowych dla różnicowania w tym układzie zmian ułożenia filamentów F-aktyny [45]. Ci sami autorzy stwierdzili, że w obecności cytochalazyny B, która hamuje polimeryzację aktyny, nie zachodzą zmiany w układzie mikrotubul. W obu przypadkach odkładana przez komórki wtórna ściana komórkowa miała wzór odmienny od obserwowanego w komórkach kontrolnych.

Trudno obecnie odpowiedzieć na pytanie, czy w proces ksylogenezy są zaangażowane inne niż mikrotubule i filamenty aktynowe składniki cytoszkieletu, gdyż brak jest informacji o występowaniu w komórkach roślinnych np. filamentów pośrednich (11 nm) i tensylinowych (2 nm). Ciekawe byłoby zbadanie, jak zachowują się w trakcie różnicowania białka związane z mikrotubulami (MAPs) [68], które mogą m.in. regulować procesy polimeryzacji i depolimeryzacji α β dimerów tubuliny [8]. Griffith i Pollard [29] wykazali, że MAPs są niezbędne przy tworzeniu in vitro przez filamenty F-aktyny i mikrotubule kompleksów o dużej lepkości. Istotną rolę mogłyby też pełnić, jeżeli występują w komórkach roślinnych, białka podobne do białek odpowiedzialnych w komórkach zwierzęcych za transport organelli wzdłuż mikrotubul w przeciwnych kierunkach. Jedno z tych białek – kinezyna, odpowiedzialna za transport organelli w kierunku dodatniego końca mikrotubuli, różni się pod względem budowy i aktywności enzymatycznej od dyneiny i miozyny [79, 85]. Nie stwierdzono dotychczas, aby kinezyna wywoływała ruch wzdłuż filamentów aktyny [84]. Innym białkiem odpowiedzialnym za ruch wzdłuż mikrotubul jest dyneina, przy czym dyneina izolowana z rzęsek wywołuje ruch w kierunku przeciwnym do ruchu wywołanego przez kinezynę. Natomiast dyneina cytoplazmatyczna izolowana z *Caenorhabditis elegans* umożliwia ruch w tym samym kierunku co kinezyna [84]. W układach in vitro dyneina umożliwia przemieszczanie się mikrotubul [78].

Nic nie wiadomo również na temat roli w procesie ksylogenezy białek związanych z aktyną. Stąd też nasze wiadomości o wzajemnych powiązaniach między poszczególnymi elementami są niepełne. Trudno jest przewidywać, czy cytoszkielet komórek roślinnych posiadających ściany komórkowe okaże się być tak skomplikowany jak komórek zwierzę-

http://rcin.org.pl

cych, jednak badania organizacji cytoplazmy roślin niższych wydają się sugerować, że jest on dużo bardziej złożony, niż sądzono.

UKŁADY ENZYMÓW SYNTETYZUJĄCYCH CELULOZĘ

Dzięki zastosowaniu techniki *freeze-etching* w komórkach roślin niższych i wyższych odkładających pierwotną lub wtórną ścianę komórkową udało się wykazać obecność struktur, które nazwano "rozetkami". Znajdowano je w błonie plazmatycznej od strony cytoplazmy. Herth wykazał ich występowanie w błonie plazmatycznej *Spirogyra* [36], *Vigna radiata* [37] i *Lepidium sativum* L. [38]. Obecność "rozetek" w błonie plazmatycznej wykazano także w *Glycine max* [39], *Funaria* [74], *Equisetum hyemale* [16], *Closterium* sp. [27] oraz *Z. elegans* [31]. Struktury te uważa się obecnie za enzymy syntetyzujące celulozę. Ich ułożenie w błonie plazmatycznej pod zgrubieniami wtórnej ściany komórkowej w komórkach różnicujących się w elementy ksylemu wskazuje na taką ich funkcję [31, 38]. Struktury te o średnicy: ok. 26 nm – *Equisetum hyemale* [16], 24 nm – *Z. elegans* [31], 24 nm – *Spirogyra* [36], 25 nm – *Lepidium sativum* L. [38], 25 nm – *Funaria* [74], składają się z sześciu jednakowych podjednostek o średnicy 8 nm ułożonych w ten sposób, że cała struktura ma sześciokrotną oś symetrii. Najmniejsza odległość pomiędzy środkami dwóch sąsiadujących ze sobą "rozetek" w błonie plazmatycznej *Lepidium sativum* L. wynosi ok. 35 nm [38]. Stwierdzono też po drugiej stronie błony plazmatycznej występowanie kulistych struktur o średnicy 24 nm u *Spirogyra* [36] lub 30 nm u *Lepidium sativum* L. [38]. Struktury te łączą fibryle celulozy z błoną plazmatyczną [27, 36]. "Rozetki" i kuliste struktury wykazują tę samą częstotliwość występowania w błonie plazmatycznej komórek *Lepidium sativum* L. różnicujących się w elementy ksylemu, co wskazywałoby, że są one częściami tego samego kompleksu syntazy [38]. Badania ilościowe dotyczące gęstości rozmieszczenia "rozetek" i szybkości odkładania fibryli celulozy pozwoliły obliczyć, że połówkowy czas życia tych enzymów wynosi ok. 10 min [cyt. za 27].

Długo nie było wiadomo, w którym miejscu w komórce powstają fibryle celulozy, czy syntetyzowane są przez enzymy związane z błoną plazmatyczną, czy też powstają w aparacie Golgiego i potem w pęcherzykach przenoszone są na powierzchnię komórki. Zwiększenie aktywności aparatu Golgiego w komórkach mezofilu *Z. elegans* L. różnicujących w elementy ksylemu obserwowali w 1984 roku Burgess i Linstead [7]. Dopiero jednak Haigler i Brown [31] badając te komórki przy użyciu mikroskopu skanningowego wykazali obecność takich samych jak w błonie plazmatycznej "rozetek" w błonach pęcherzyków Golgiego odrywających się od diktiosomów. Również w pęcherzykach znajdujących się tuż pod błoną plazmatyczną, w miejscach gdzie odkładana jest wtórna ściana komórkowa, "rozetki" znajdowały się w błonach po stronie cytoplazmy.

O obecności w pęcherzykach Golgiego materiału przypominającego strukturą fibryle celulozy donosił w 1967 roku Cronshaw [10]. W żadnej jednak z wymienionych wyżej prac, których autorzy stosowali technikę *freeze-etching*, nie wspominają oni o znalezieniu fibryli celulozy wewnątrz pęcherzyków Golgiego. Biorąc pod uwagę rozmiary pęcherzyków Golgiego, enzymów syntetyzujących celulozę i długość fibryli celulozy wydaje się, że są one syntetyzowane raczej po połączeniu pęcherzyka Golgiego z błoną plazmatyczną.

http://rcin.org.pl

Nie ma dotychczas pełnej odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób pęcherzyki Golgiego niosące enzymy syntetyzujące celulozę są kierowane do określonych obszarów błony plazmatycznej. Liczne badania prowadzone na komórkach zwierzęcych wskazują, że pęcherzyki Golgiego mogą być transportowane wzdłuż mikrotubul [84]. W komórkach roślinnych jednak dotychczas ani nie wykryto białek odpowiedzialnych za transport wzdłuż mikrotubul, ani nie wykazano, aby pęcherzyki Golgiego w trakcie odkładania wtórnej ściany komórkowej były transportowane wzdłuż mikrotubul. Jedynie dowody pośrednie z badań nad wpływem kolchicyny na odkładanie ściany komórkowej pozwalają przypuszczać, że mikrotubule odgrywają istotną rolę w transporcie pęcherzyków Golgiego niosących enzymy syntetyzujące celulozę. Enzymy syntetyzujące celulozę mogą zapewne przemieszczać się w błonie plazmatycznej wzdłuż mikrotubul [27, 37].

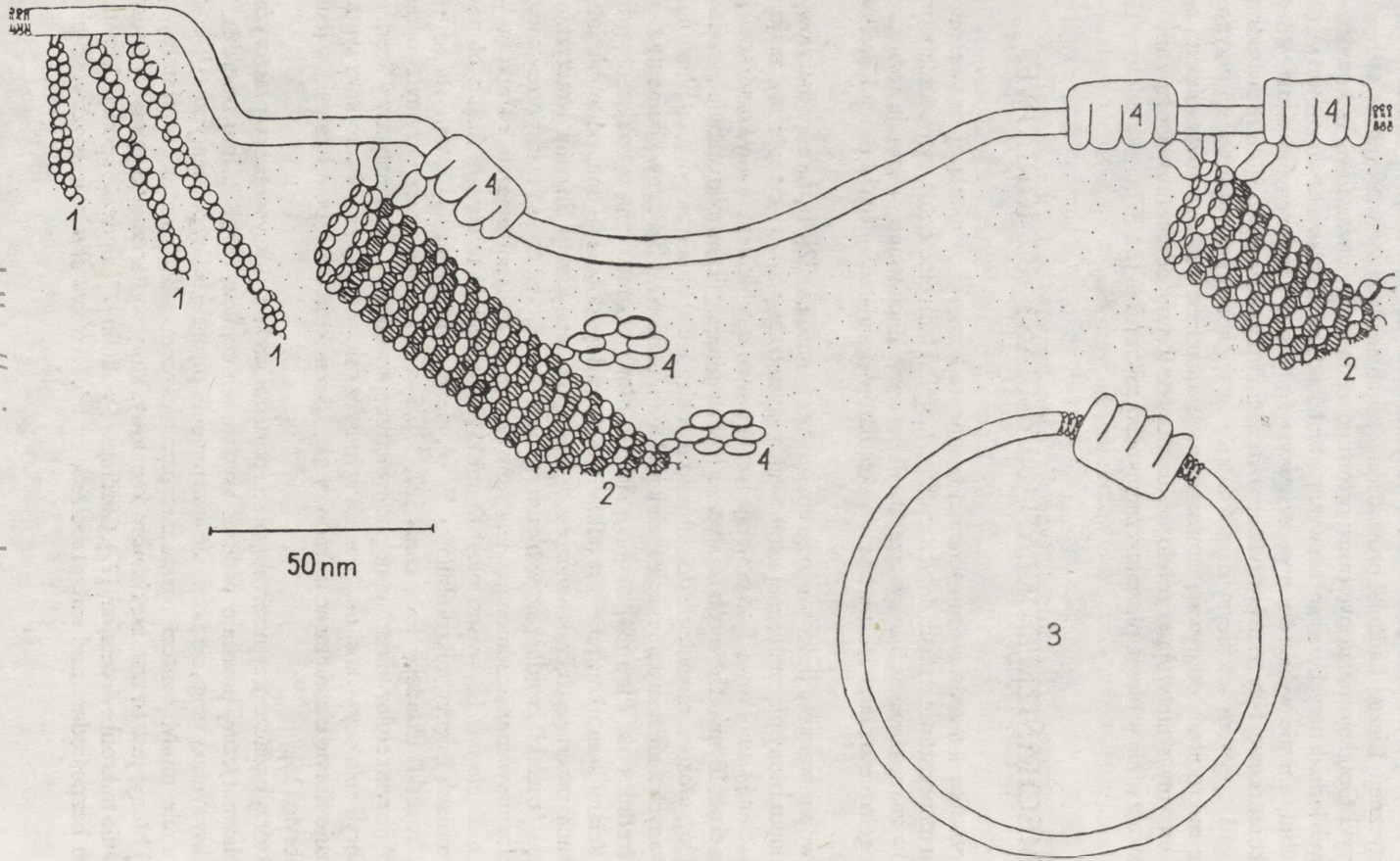
MECHANIZM ODKŁADANIA ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Na rysunku 4 przedstawiono schemat fragmentu komórki różnicującej się w element ksylemu na podstawie danych dotyczących budowy i układu elementów cytoszkieletu oraz enzymów zaangażowanych w syntezę fibryli celulozy. Zachowano proporcje rozmiarów poszczególnych struktur stosując się do postulatów przedstawionych w pracy Korohody [49].

Podwójna warstwa lipidowa, o grubości ok. 6 nm [12, 32], będąca podstawowym składnikiem błony plazmatycznej i stanowiąca zewnętrzną warstwę cytoplazmy, znajduje się pod ścianą komórkową. Pod powstającym wtórnym zgrubieniem ściany komórkowej w odległości ok. 10 nm od błony plazmatycznej [66] znajdują się liczne mikrotubule o średnicy 24 nm [35], ułożone równolegle do siebie i zakotwiczone w błonie za pomocą filamentów zbudowanych z nieznanych jeszcze białek [57], odmiennych od F-aktyny. Filamenty F-aktyny o średnicy ok. 7 nm [34] znajdują się pod błoną plazmatyczną w miejscach, gdzie wtórna ściana komórkowa nie jest odkładana. Prawdopodobnie są one, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, zakotwiczone w błonie plazmatycznej. Enzymy syntetyzujące celulozę – "rozetki" znajdują się w błonie pęcherzyków Golgiego i są transportowane do błony plazmatycznej. Średnica pęcherzyków Golgiego, transportujących "rozetki" w komórkach *Z. elegans* L., wynosi ok. 102 nm [31]. Pęcherzyki te ulegają fuzji z błoną w przestrzeniach między mikrotubulami. W błonie plazmatycznej *Closterium* sp. i *Vigna radiata* "rozetki" układają się w rzędy [27, 37]. Syntetyzowane przez enzymy tworzące "rozetki" fibryle celulozy układają się po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej. Średnica mikrofibryli celulozy wynosi ok. 20 nm. Przypuszcza się więc, że każdy kompleks syntazy syntetyzuje fibryle elementarne o średnicy ok. 3,5 nm, które następnie łączą się w jedną mikrofibrylę [36].

Niektórzy badacze przypuszczają, że siła poruszająca kompleksy syntazy w płaszczyźnie błony plazmatycznej powstaje podczas krystalizacji celulozy [37, 38]. Inni twierdzą, że kompleksy syntazy mogą się poruszać w strumieniu płynącej błony plazmatycznej [64, 65]. Mikrotubule miałyby zatem ograniczać przemieszczanie się "rozetek" w płaszczyźnie bocznej błony; jest to tzw. mechanizm kanałowy, który wystarczająco tłumaczy sposób odkładania mikrofibryli celulozy [27]. Giddings i Staehelin [27] nigdy nie spotkali "rozetek" leżących bezpośrednio nad mikrotubulami, co ich zdaniem eliminuje możliwość prze-

http://rcin.org.pl



Rys. 4. Schemat fragmentu komórki odkładającej wtórną ścianę komórkową; wszystkie znane dotychczas elementy komórki zaangażowane w ten proces są narysowane z zachowaniem proporcji ich rozmiarów: 1 – filamenty F-aktyny; 2 – mikrotubule; 3 – pęcherzyk Golgiego; 4 – enzymy syntetyzujące celulozę

http://rcin.org.pl

mieszczania się "rozetek" wzdłuż mikrotubul. Natomiast Herth [37] stwierdził, że jego wyniki nie wykluczają możliwości istnienia białka o wysokim powinowactwie do mikrotubul, które może wiązać z nimi "rozetki" i w ten sposób umożliwiać ruch enzymów wzdłuż mikrotubul. Preston [71] twierdzi, że mechanizm kanałowy nie tłumaczy wystarczająco sposobu odkładania fibryli celulozy i sugeruje istnienie jeszcze innej siły niezależnej od mikrotubul, umożliwiającej ułożenie fibryli celulozy w sposób występujący w komórkach roślinnych.

Biorąc pod uwagę badania prowadzone na komórkach zwierzęcych, z których wynika, że transport organelli wzdłuż mikrotubul w przeciwnych kierunkach jest możliwy dzięki białkom, takim jak kinezyna i dyneina, nie może wykluczyć występowania w komórkach roślinnych podobnych białek umożliwiających transport organelli wzdłuż mikrotubul. Można by wtedy odpowiedzieć na pytanie, dlaczego w trakcie odkładania pierwotnej ściany komórkowej "rozetki" znajdują się na całym obszarze błony plazmatycznej, a w trakcie odkładania wtórnej ściany tylko w określonych jej rejonach. Poruszające się wzdłuż mikrotubul pęcherzyki Golgiego (powiązane z nimi hipotetycznym białkiem) kierowane byłyby do określonych miejsc w błonie plazmatycznej. Wpływ mikrotubul na organizację aparatu Golgiego w komórkach zwierzęcych stwierdzili m.in. Moskalewski i Thyberg [63]. Następnie "rozetki" układałyby się wzdłuż mikrotubul, po obu ich stronach, powiązane z nimi innym lub tym samym białkiem i mogłyby się poruszać w przeciwnych kierunkach, co tłumaczyłoby fakt, że mikrofibryle celulozy są czasem przeciwnie ukierunkowane. Spotykane w komórkach *Closterium* [27] odchylenie położenia mikrofibryli od położenia mikrotubul (nie większe niż kilka stopni) również mogłoby być wyjaśnione tym mechanizmem.

Przedstawiony model mechanizmu odkładania ściany komórkowej jest oczywiście niepełny. Brak w nim informacji dotyczących nie tylko innych elementów cytoszkieletu, które być może występują w komórkach roślinnych, ale również danych dotyczących innych białek znajdujących się w tym obszarze błony plazmatycznej. Również sam mechanizm odkładania fibryli celulozy nie jest do końca wyjaśniony. Szczególnie skąpe są wiadomości o procesach regulacyjnych odpowiadających za zmianę układu elementów cytoszkieletu lub za gwałtowny wzrost syntezy tubuliny w różnicujących się komórkach. Brak jest dotychczas informacji o sposobie regulacji aktywności aparatu Golgiego, a żaden z cytowanych w tym artykule autorów nie wspomina o zmianach aktywności genów kodujących białka cytoszkieletu podczas różnicowania się komórek w elementy ksylemu.

PODZIĘKOWANIE

Autorka pragnie podziękować Panu Prof. dr. hab. Włodzimierzowi Korohodzie z Instytutu Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za dyskusję i cenne uwagi w trakcie opracowywania powyższego artykułu.

LITERATURA

[1] ALONI R., PLOTKIN T., Wound-induced and naturally occurring regenerative defferentiation of xylem in *Zea mays* L., *Planta*, **163**: 126–132, 1985.

[2] APELBAUM A., BURG S. P., Altered cell microfibrillar orientation in ethylene-treated *Pisum sativum* stems, *Plant Physiol.*, **48**: 648–652, 1971.

[3] BIRD M. M., The effects of taxol on embryonic chick tectum maintained in culture: an electron microscope study, *J. Ultrast. Res.*, **89**: 123–135, 1984.

http://rcin.org.pl

[4] BORISY G. G., TAYLOR E. W., The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-^{3}H to cellular protein, *J. Cell Biol.*, **34**: 525–533, 1967.
[5] BORISY G. G., TAYLOR E. W., The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus, *J. Cell Biol.*, **34**: 535–548, 1967.
[6] BROWN R. C., LEMMON B. E., Division polarity, development and configuration of microtubule arrays in bryophyte meiosis. II Anaphase I to the tetrad, *Protoplasma*, **138**: 1–10, 1987.
[7] BURGESS J., LINSTEAD P., In-vitro tracheary element formation: structural studies and the effect of tri-iodobenzoic acid, *Planta*, **160**: 481–489, 1984.
[8] CASSIMERIS L. U., WALKER R. A., PRYER N. K., SALMON E. D., Dynamic instability of microtubules, *Bio-Essays*, **7**: 149–154, 1988.
[9] COLLIS P., WEEKS D., Selective inhibition of tubulin synthesis by amiprophos-methyl during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardi*, *Science*, **202**: 440–442, 1978.
[10] CRONSHAW J., Tracheid differentiation in tobacco pith cultures, *Planta*, **72**: 78–90, 1967.
[11] DALES S., Concerning the universality of a microtubule antigen in animal cells, *J. Cell Biol.*, **52**: 748–754, 1972.
[12] DARNELL J., LODISH H., BALTIMORE D., Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York 1986.
[13] DERKSEN J., TRAAS J., OOSTENDORP T., Distribution of actin filaments in differentiating cells of *Equisetum hyemale* root tips, *Plant Sci.*, **43**: 77–81, 1985.
[14] DODDS J. H., PHILLIPS R., DNA and histone content of immature tracheary elements from cultured artichoke explants, *Planta*, **135**: 213–216, 1977.
[15] DOONAN J. J., COVE D. J., LLOYD C. W., Microtubules and microfilaments in tip growth: evidence that microtubules impose polarity on protonemal growth in *Physcomitrella patens*. *J. Cell Science*, **89**: 533–540, 1988.
[16] EMONS A. M. C., Plasma membrane rosettes in root hairs of *Equisetum hyemale*, *Planta*, **163**: 350–359, 1985.
[17] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Immunofluorescent and Calcofluor white staining of developing tracheary elements in *Zinnia elegans* L. suspension cultures, *Protoplasma*, **125**: 190–198, 1985.
[18] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Xylogenesis in tissue culture: taxol effects on microtubule reorientation and lateral association in differentiating cells, *Protoplasma*, **128**: 157–166, 1985.
[19] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Xylogenesis in tissue culture II: Microtubules, cell shape and secondary wall patterns, *Protoplasma*, **133**: 140–148, 1986.
[20] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Amiprophos-methyl (APM): a rapid, reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures, *Protoplasma*, **136**: 118–124, 1987.
[21] FALCONER M. M., SEAGULL R. W., Xylogenesis in tissue culture III: continuing wall deposition during tracheary element development, *Protoplasma*, **144**: 10–16, 1988.
[22] FUKUDA H., A change in tubulin synthesis in the process of tracheary element differentiation and cell division of isolated *Zinnia* mesophyll cells, *Plant Cell Physiol.*, **28**: 517–528, 1987.
[23] FUKUDA H., IWATA N., Establishment of a sensitized immunoblotting method for measuring plant tubulin content, *Plant Cell Physiol.*, **27**: 273–283, 1986.
[24] FUKUDA H., KOMAMINE A., Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*, *Plant Physiol.*, **65**: 57–60, 1980.
[25] FUKUDA H., KOMAMINE A., Direct evidence for cytodifferentiation to tracheary elements without intervening mitosis in a culture of single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*, *Plant Physiol.*, **65**: 61–64, 1980.
[26] FULTON C., KANE R. E., STEPHENS R. E., Serological similarity of flagellar and mitotic microtubules, *J. Cell Biol.*, **50**: 762–773, 1971.
[27] GIDDINGS T. H., jr., STAEHELIN L. A., Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium* sp., *Planta*, **173**: 22–30, 1988.
[28] GORST J., WERNICKE W., GUNNING B. E. S., Is the preprophase band of microtubules a marker of organization in suspension cultures? *Protoplasma*, **134**: 130–140, 1986.
[29] GRIFFITH L. M., POLLARD T. D., Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins, *J. Cell Biol.*, **78**: 958–965, 1978.
[30] HAHNE G., HOFFMANN F., Cortical microtubular lattices: absent from mature mesophyll and necessary for cell division? *Planta*, **166**: 309–313, 1985.

http://rcin.org.pl

[31] HAIGLER C. H., BROWN R. M. jr.., Transport of rosettes from the Golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture, *Protoplasma*, **134**: 111–120, 1986.
[32] HAYAT M. A., Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications Vol. 1, Van Nostrand Reinhold Company, New York (Cincinnati) Toronto-London-Melbourne 1970.
[33] HENSEL W., Cytodifferentiation of polar plant cells, use of anti-microtubular agents during the differentiation of statocytes from cress roots (*Lepidium sativum* L.), *Planta*, **169**: 293–303, 1986.
[34] HENSEL W., Demonstration by heavy-meromyosin of actin microfilaments in extracted cress *Lepidium sativum* L. root statocytes, *Planta*, **173**: 142–143, 1988.
[35] HEPLER P. K., PALEVITZ B. A., Microtubules and microfilaments, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 309–362, 1974.
[36] HERTH W., Arrays of plasma membrane "rosettes" involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*, *Planta*, **159**: 347–356, 1983.
[37] HERTH W., Oriented "rosette" alignment during cellulose formation in mung bean hypocotyl, *Naturwissenschaft*, **71**: 216–217, 1984.
[38] HERTH W., Plasma-membrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L., *Planta*, **164**: 12–21, 1985.
[39] HERTH W., WEBER G., Occurrence of the putative cellulose-synthesizing "rosettes" in the plasma membrane of *Glycine max* suspension culture cells, *Naturwissenschaft*, **71**: 153–154, 1984.
[40] HIGHTOWER R. C., MEAGHER R. B., The molecular evolution of actin, *Genetics*, **114**: 315–332, 1986.
[41] HOWARD W. D., TIMASHEFF S. N., Linkages between the effects of taxol, colchicine, and GTP on tubulin polimerization, *J. Biol. Chem.*, **263**: 1342–1346, 1988.
[42] HUSSEY P. J., TRAAS J. A., GULL K., LLOYD C. W., Isolation of cytoskeletons from synchronized plant cells: the interphase microtubule array utilizes multiple tubulin isotypes, *J. Cell Science*, **88**: 225–230, 1987.
[43] KAKIMOTO T., SHIBAOKA H., Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells, *Protoplasma*, **140**: 151–156, 1987.
[44] KOBAYASHI H., FUKUDA H., SHIBAOKA H., Reorganization of actin filaments associated with the differentiation of tracheary elements in *Zinnia* mesophyll cells, *Protoplasma*, **138**: 69–71, 1987.
[45] KOBAYASHI H., FUKUDA H., SHIBAOKA H., Interrelation between the spatial disposition of actin filaments and microtubules during the differentiation of tracheary elements in cultured *Zinnia* cells, *Protoplasma*, **143**: 29–37, 1988.
[46] KOHLENBACH H. W., SCHMIDT B., Cytodifferenzierung in Form einer direkten Umwandlung isolierter Mesophyllzellen zu Tracheiden, *Z. Pflanzenphysiol.*, **75**: 369–374, 1975.
[47] KOMAMINE A., FUKUDA H., Biochemical mechanism of cytodifferentiation, [w] Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, PLANT TISSUE CULTURE 1982, red. A. Fujivara, Tokyo, Lake Yamanaka, 91–92, 1982.
[48] KOPCIŃSKA J., Udział hormonów roślinnych w różnicowaniu elementów drewna w kulturach in vitro, *Wiad. Bot.*, **24**: 191–196, 1980.
[49] KOROHODA W., Integrity and dynamics of the cell surface complex, [w] Biophysics of Membrane Transport. Vol. 1, Ninth School on Biophysics of Membrane Transport, Poland, Polanica Zdrój – School Proceedings, red. J. Kuczera i S. Przestalski, Publishing Department of the Agricultural University of Wrocław, 227–248 Wrocław 1988.
[50] KUTERNOZIŃSKA W., PILIPOWICZ M., Hodowle in vitro pojedynczych komórek jako model do badań nad różnicowaniem komórek roślinnych, *Zesz. Nauk. UJ, seria Biologia Molekularna* (w druku).
[51] KWIATKOWSKA M., Mikrotubule. I. Budowa i skład chemiczny mikrotubul, *Post. Biol. Kom.* **1**: 237–253, 1974.
[52] KWIATKOWSKA M., Mikrotubule. II. Funkcje mikrotubul, *Post. Biol. Komórki*, **1**: 255–275, 1974.
[53] LA CLAIRE II J. W., Microtubule cytoskeleton in intact and wounded coenocytic green algae, *Planta*, **171**: 30–42, 1987.
[54] LEDBETTER M. C., PORTER K., A "microtubule" in plant cell fine structure, *J. Cell Biol.*, **19**: 239–250, 1963.
[55] LLOYD C., Actin in plants, *J. Cell Science*, **90**: 185–188, 1988.
[56] LLOYD C. W., SEAGULL R. W., A new spring for plant cell biology: microtubules as dynamic helices, *Trends Biochem. Sci.*, **10**: 476–478, 1985.
[57] LLOYD C. W., SLABAS A. R., POWELL A. J., LOWE S. B., Microtubules, protoplasts and plant cell shape, *Planta*, **147**: 500–506, 1980.

http://rcin.org.pl

[58] LLOYD C. W., TRAAS J. A., The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. Drug studies.
[59] MARCHANT H. J., HINES E. R., The role of microtubules and cell-wall deposition in elongation of regenerating protoplasts of *Mougeotia, Planta*, **146**: 41–48, 1979.
[60] MILLER A. R., CRAWFORD D. L., ROBERTS L. W., Lignification and xylogenesis in *Lactuca* pith explants cultured in vitro in the presence of auxin and cytokinin: a role for endogenous ethylene, *J. Exp. Bot.*, **36**: 110–118, 1985.
[61] MIZUNO K., KOMAMINE A., Isolation and identification of substances inducing formation of tracheary elements in cultured carrot-root slices, *Planta*, **138**: 59–62, 1978.
[62] MŁODZIANOWSKI F., Podziały oraz różnicowanie się komórek i tkanek w hodowli in vitro, [w] Hodowla komórek i tkanek roślinnych, red. M. Zenkteler, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 11–110, Warszawa 1984.
[63] MOSKALEWSKI S., THYBERG J., On the role of the nucleus in the structural organization of the cell: dispersion and rearrangement of the Golgi complex in cytoplasts treated with antimicrotubular drugs, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **20**: 305–316, 1988.
[64] MUELLER S. C., BROWN R. M., The control of cellulose microfibril deposition in the cell wall of higher plants. I Can directed membrane flow orient cellulose microfibrils? Indirect evidence from freeze-fractured plasma membranes of maize and pine seedlings, *Planta*, **154**: 489–500, 1982.
[65] MUELLER S. C., BROWN R. M., The control of cellulose microfibril deposition in the cell wall of higher plants. II Freeze-fracture microfibril patterns in maize seedling tissues following experimental alteration with colchicine and ethylene, *Planta*, **154**: 501–515, 1982.
[66] NEWCOMB E. H., Plant microtubules, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **20**: 253–288, 1969.
[67] NOODÉN L. D., Physiological and developmental effects of colchicine, *Plant Cell Physiol.*, **12**: 759–770, 1971.
[68] OLMSTED J. B., Microtubule-associated proteins, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **2**: 421–457, 1986.
[69] PHILLIPS R., Cytodifferentiation, *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11A: 55–70, 1980.
[70] PICKETT-HEAPS J. D., NORTHCOTE D., Relationship of cellular organelles to the formation and development of the plant cell wall, *J. Exp. Bot.*, **17**: 20–26, 1966.
[71] PRESTON R. D., Cellulose-microfibril-orienting mechanisms in plant cells walls, *Planta*, 174: 67–74, 1988.
[72] QUADER H., DEICHGRABER G., SCHNEF E., The cytoskeleton of *Cobaea* seed hairs: patterning during cell-wall differentiation, *Planta*, **168**: 1–10, 1986.
[73] QUADER H., HERTH W., RYSER U., SCHNEPF E., Cytoskeletal elements in cotton seed hair development in vitro: their possible regulatory role in cell wall organization, *Protoplasma*, **137**: 56–62, 1987.
[74] REISS H. D., SCHNEPF E., HERTH W., The plasma membrane of the *Funaria caulonema* tip cell: morphology and distribution of particle rosettes, and the kinetics of cellulose synthesis, *Planta*, **160**: 428–435, 1984.
[75] ROBERTS L. W., BABA S., SHIRAISHI T., MILLER A. R., Progress in cytodifferentiation under in vitro conditions, [w] Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, PLANT TISSUE CULTURE 1982, red. A. Fujivara, Tokyo, Lake Yamanaka, 87–89, 1982.
[76] ROBERTS L. W., GAHAN P. B., ALONI R., Vascular Differentiation and Plant Growth Regulators, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo 1988.
[77] ROBERTS I. N., LLOYD C. W., ROBERTS K., Ethylene-induced microtubule reorientations: meditation by helical arrays, *Planta*, **164**: 439–447, 1985.
[78] SALE W. S., FOX L. A., Isolated β-heavy chain subunit of dynein translocates microtubules in vitro, *J. Cell. Biol.*, **107**: 1793–1797, 1988.
[79] SAXTON W. M., PORTER M. E., COHN S. A., SCHOLEY J. M., RAFF E. C., Mc INTOSH J. R., *Drosophila* kinesin: characterization of microtubule motility and ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 1109–1113, 1988.
[80] SEAGULL R. W., FALCONER M. M., WEERDENBURG C. A., Microfilaments: dynamic arrays in higher plant cells, *J. Cell Biol.*, **104**: 995–1004, 1987.
[81] SHELANSKI M. L., TAYLOR E. W., Isolation of a protein subunit from microtubules, *J. Cell Biol.*, **34**: 549–554, 1967.
[82] SHININGER T. L., The control of vascular development, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**: 313–337, 1979.
[83] SUGIYAMA M., FUKUDA H., KOMAMINE A., Effects of nutrient limitation and γ-irradiation on tracheary element differentiation and cell division in single mesophyll cells of *Zinnia elegans*, *Plant Cell Physiol.*, **27**: 601–606, 1986.
[84] VALE R. D., Intracellular transport using microtubule-based motors, *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**: 347–378, 1987.

http://rcin.org.pl

[85] VALE R. D., SCHNAPP B. J., MITCHISON T., STEUER E., REESE T. S., SHEETZ M. P., Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro, *Cell*, **43**: 623–632, 1985.
[86] VAN'T HOF J., BJERKNES C. A., LAMM S. S., Meristematic precursors of vascular parenchyma differentiate from G_2 phase after replicating DNA discontinuously, *Amer. J. Bot.*, **73**: 87–95, 1986.
[87] WIELAND T., Modification of actins by phallotoxins, *Naturwissenschaft*, **64**: 303–309, 1977.
[88] WODZICKI T. J., WODZICKI A. B., Modulation of the oscillatory system involved in polar transport of auxin by other phytohormones, *Physiol. Plant.*, **53**: 176–180, 1981.
[89] WULF E., DEBOBEN A., BAUTZ F. A., FAULSTICH H., WIELAND T., Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4498–4502, 1979.
[90] ZAJĄCZKOWSKI S., WODZICKI T. J., Auxin and plant morphogenesis – a model of regulation, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **47**: 233–243, 1978.
[91] ZAJĄCZKOWSKI S., WODZICKI T. J., BRUINSMA J., A possible mechanism for whole-plant morphogenesis, *Physiol. Plant.*, **57**: 306–310, 1983.

Otrzymano: 10 lipca 1989 r.
Przyjęto: 24 sierpnia 1989 r.
Adres autorki: ul. Kremerowska 2, 31-130 Kraków

http://rcin.org.pl

http://rcin.org.pl

WSPÓŁZALEŻNOŚCI MIĘDZY ORGANIZACJĄ MIKROFILAMENTÓW I METABOLIZMEM W KOMÓRKACH NIEMIĘŚNIOWYCH

MUTUAL INTERACTIONS OF ACTIN FILAMENTS AND METABOLISM IN NON-MUSCLE CELLS

Jan KAJSTURA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. Jana Zurzyckiego, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie. Zebrano wyniki badań świadczących, że mikrofilamenty, prócz wypełniania funkcji związanych z ruchliwością i właściwościami mechanicznymi komórki, mogą być zaangażowane w wielu innych procesach. Przedyskutowano wzajemne związki między mikrofilamentami a metabolizmem energetycznym komórek. Wskazano na znaczenie zjawiska adsorpcji enzymów glikolitycznych i rybosomów na F-aktynie. Przytoczono wyniki prac wskazujących, że mikrofilamenty mogą brać udział w procesach regulujących rozmnażanie komórek.

Summary. The paper presents the results of experiments, which provide data suggesting that actin filaments can be involved in many cellular processes, extending their role far beyond that of the "driving force" of cell migration or the factor determining the mechanical properties of a cell. Mutual dependence of F-actin organization and energy metabolism is discussed. The adsorption of glycolytic enzymes and ribosomes on F-actin and its significance for cellular metabolism is pointed out. The experimental evidence in favour of the hypothesis that actin filaments may participate in processes controlling DNA synthesis is recapitulated.

WSTĘP

Aktyna stanowić może do 10% wszystkich białek zawartych w komórkach niemięśniowych [15, 44]. Ponad połowa aktyny zawartej w komórce występuje w formie spolimeryzowanej (F-aktyna), tworząc mikrofilamenty [44, 94]. Mikrofilamenty często zorganizowane są w wiązki, zwane fibrylami (*stress fibers*, włókna naprężeniowe). Prócz F-aktyny w ich skład wchodzą: miozyna, tropomiozyna, α-aktynina, filamina, kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kaldesmon (białko wiążące kalmodulinę) [63]. Wiązki mikrofilamentów przyczepione są do błony plazmatycznej przez białko winkulinę. Spełniają one w komórce dwie

http://rcin.org.pl

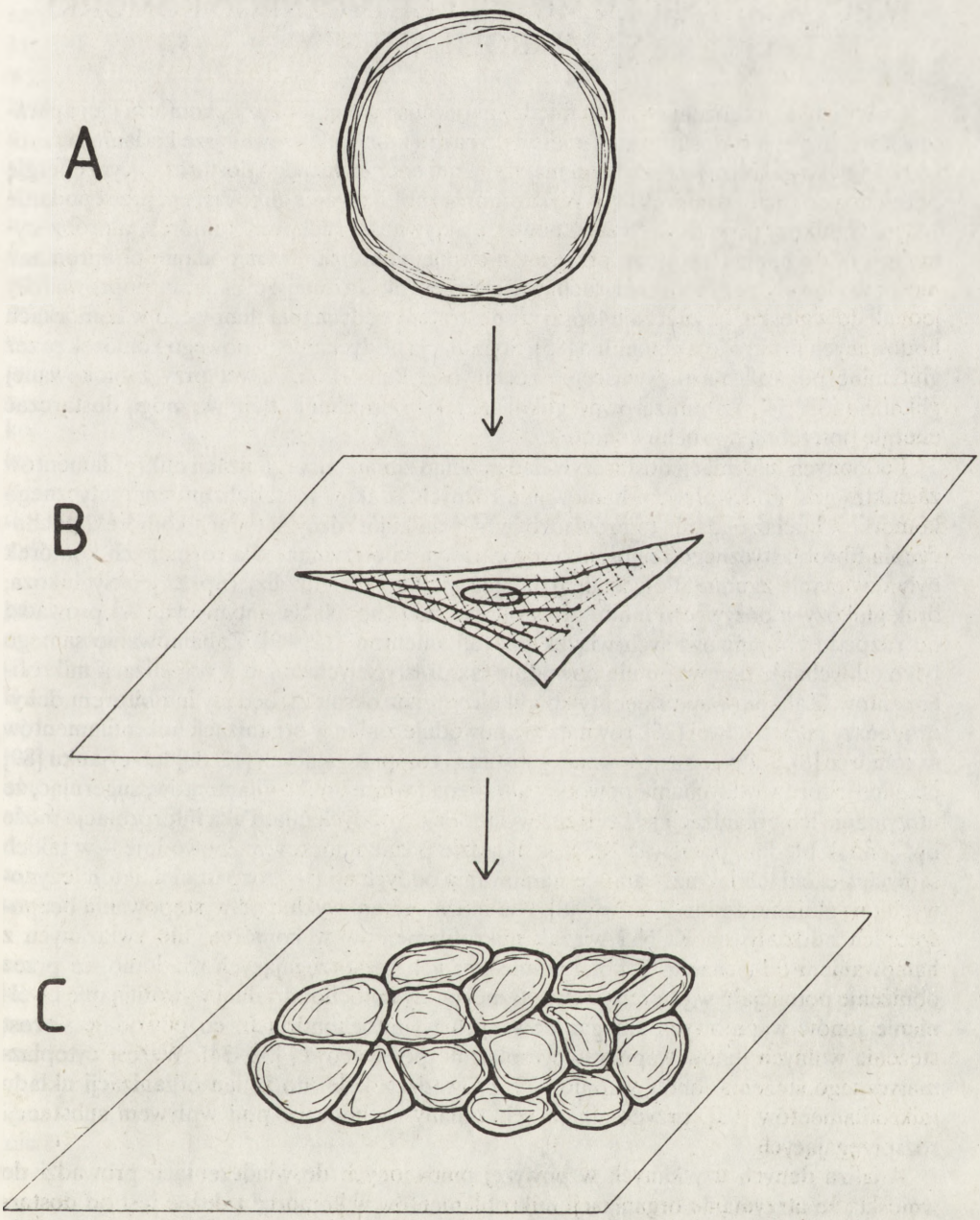
zasadnicze funkcje: biorą udział w determinowaniu mechanicznych właściwości komórek oraz wraz z innymi białkami tworzą system kurczliwy komórki. Na tych funkcjach mikrofilamentów skoncentrowana jest większość prowadzonych badań. W ostatnich latach zbiera się jednak coraz więcej dowodów na to, że mikrofilamenty zaangażowane są także w innych procesach zachodzących w komórkach. Wskazywać mogą na to korelacje aktywności ruchowej, a więc czynności bezpośrednio związanej z organizacją mikrofilamentów, z innymi aktywnościami komórek. Od dawna znana jest korelacja aktywności ruchowej z glikolizą i oddychaniem tlenowym [13, 57] oraz z intensywnością rozmnażania komórek [18, 42, 58]. Występowanie takich korelacji wydaje się wskazywać, że rola mikrofilamentów może wykraczać poza udział w zjawiskach związanych z różnymi formami ruchliwości i determinowaniem mechanicznych właściwości komórki.

Istnienie korelacji między stanem organizacji mikrofilamentów i regulacją metabolizmu komórki ilustrować mogą dwa przykłady, związane z podstawowymi problemami biologii komórki, a których mechanizm do tej pory nie został jeszcze poznany.

Pierwszy przykład dotyczy mechanizmu zjawiska zależności wzrostu komórek od przyczepienia do podłoża stałego (ang. *anchorage dependence*) [91]. Zjawisko to polega na tym, że komórki prawidłowe pozostające w zawiesinie nie są zdolne do rozmnażania [76] i pozostają zatrzymane w fazie G_1 cyklu komórkowego [59, 80]. Przeniesieniu komórek do płynnej pożywki towarzyszą zmiany w organizacji mikrofilamentów w komórce (rys. 1). Komórki pozostające w zawiesinie nie mają możliwości aktywnej lokomocji, a mikrofilamenty są w nich zlokalizowane jedynie w postaci sieci umiejscowionej pod błoną komórkową, przy czym nie są one zorganizowane w fibryle [100]. Dla fibroblastów zarodka kurczęcia stwierdzono ponadto, że zawartość F-aktyny jest czterokrotnie niższa w komórkach zawieszonych w płynnym środowisku niż w komórkach rozpłaszczonych na podłożu stałym [55].

Drugie ze wzmiankowanych zjawisk to tzw. "kontaktowe zahamowanie rozmnażania" [99]. Zjawisko to polega na tym, że komórki hodowane in vitro po utworzeniu zwartej warstwy komórek i utworzeniu wzajemnych kontaktów – czemu towarzyszy zahamowanie lokomocji – przestają się namnażać. I w tym przypadku obserwuje się zmiany organizacji mikrofilamentów (rys. 1) wyrażające się obniżeniem liczby wiązek mikrofilamentów oraz spadkiem ilości F-aktyny w komórkach [7]. Pomimo wielu wątpliwości wysuwanych wobec tłumaczenia zahamowania rozmnażania komórek przez ich wzajemne kontakty [28, 46, 92], związek ruchliwości komórek z aktywnością podziałową wydaje się być dobrze udokumentowany [18, 42, 53, 54, 81, 105]. Aktywność ruchowa komórki jest związana z funkcjonalnym stanem mikrofilamentów w komórce. Wydaje się zatem, że dokładniejsze poznanie wpływu organizacji układu mikrofilamentów na metabolizm komórki, i odwrotnie, wpływu metabolizmu komórki na zachowanie się mikrofilamentów może wyjaśnić niektóre zjawiska zachodzące w hodowli komórek in vitro, w szczególności te, które dotyczą korelacji między różnymi przejawami aktywności ruchowej a metabolizmem, czy nawet kontrolą syntezy DNA w komórkach. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie aktualnych tendencji w tej dziedzinie badań.

http://rcin.org.pl



Rys. 1. Rozkład filamentów aktynowych w komórce prawidłowej hodowanej in vitro: a) przekrój przez komórkę zawieszoną w płynnym środowisku, b) komórka rozpłaszczona na podłożu stałym, c) komórki zahamowane we wzroście w zagęszczonej hodowli

http://rcin.org.pl

WPŁYW METABOLIZMU ENERGETYCZNEGO KOMÓRKI NA MIKROFILAMENTY

Oczywistym podłożem związku między aktywnością metaboliczną komórki i jej aparatem kurczliwym jest dostarczanie energii do ruchu komórek. Dawniejsze badania sugerowały, że tylko glikoliza jest szlakiem metabolizmu energetycznego dostarczającym energię potrzebną do ruchu komórek [41]. Wykazano, że zablokowanie glikolizy, np. przez podanie 2-deoksyglukozy powodowało zahamowanie aktywności ruchowej komórek, a próby stymulacji oddychania tlenowego przy zahamowanej glikolizie przez podanie pirogronianu nie powodowały przywrócenia ruchliwości komórek. Późniejsze badania doprowadziły jednak do wniosku, że znacznie lepszym substratem oddychania tlenowego w komórkach hodowanych in vitro jest glutamina [85]. Stymulacja oddychania tlenowego komórek przez glutaminę pozwala na przywrócenie ruchliwości komórkom nawet przy zablokowanej glikolizie [53, 54]. Zatem zarówno glikoliza, jak i oddychanie tlenowe mogą dostarczać energię potrzebną do ruchu komórek.

Podobnych informacji dostarczyły badania nad zmianami organizacji mikrofilamentów zachodzącymi pod wpływem hamowania różnych szlaków metabolizmu energetycznego komórki. Chociaż badania te prowadzone były na kilku różnych typach komórek, pochodzenia fibroblastycznego i nabłonkowego, to wyniki otrzymane dla rozmaitych komórek były wzajemnie zgodne. Połączone działanie inhibitorów glikolizy (np. 2-deoksyglukoza, brak glukozy w pożywce) i inhibitorów oddychania (np. NaN_3, antymycyna A) prowadzi do rozpadu zorganizowanych wiązek mikrofilamentów [12, 89]. Zahamowanie samego tylko oddychania tlenowego nie powoduje tak drastycznych zmian w organizacji mikrofilamentów. Zahamowanie samej tylko glikolizy przez oksamid, będący inhibitorem dehydrogenazy mleczanowej [26], również nie powoduje zmian w organizacji mikrofilamentów w komórce [8]. Jedynie zastosowanie substancji rozsprzęgających [12, 89] lub cyjanku [89] jako inhibitorów oddychania powodowało rozpad wiązek mikrofilamentów, sugerując, że utrzymanie ich organizacji jest zależne wyłącznie od oddychania. Taka interpretacja może być jednak błędna, ponieważ KCN w układzie pozakomórkowym powoduje – w takich samych stężeniach jak używane do hamowania oddychania – rozpad nici aktomiozynowych i uwalnianie z nich F-aktyny [8]. Nie można zatem wykluczyć występowania bezpośrednich oddziaływań KCN i wiązek mikrofilamentów w komórce, nie związanych z hamowaniem oddychania. Z kolei o substancjach rozsprzęgających wiadomo, że przez obniżenie potencjału w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej wywołują one uwolnienie jonów wapniowych zmagazynowanych w mitochondriach, co powoduje wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie podstawowej [33, 34]. Wzrost cytoplazmatycznego stężenia jonów wapniowych prowadzi z kolei do zmian organizacji układu mikrofilamentów [93], przypominających zmiany zachodzące pod wpływem substancji rozsprzęgających.

Analiza danych uzyskanych w powyżej omówionych doświadczeniach prowadzi do wniosku, że utrzymanie organizacji mikrofilamentów w komórce zależne jest od dostarczenia energii, przy czym energia ta może pochodzić zarówno z glikolizy, jak i z oddychania tlenowego. Wnioski te pozostają w zgodzie z wnioskami wynikającymi z doświadczeń, w których badano szybkość migracji komórek. Stwierdzono, że szybkość migracji jest taka sama w komórkach, w których aktywna jest tylko glikoliza, jak w komórkach, w których

http://rcin.org.pl

aktywne jest tylko oddychanie tlenowe [53, 54]. Co więcej, w obu tych przypadkach szybkość migracji komórek jest o około 40% niższa niż szybkość migracji komórek, w których żaden szlak metabolizmu energetycznego nie został zablokowany. Interesujące wyniki uzyskano w doświadczeniach, w których poddawano komórki działaniu cytochalazyny B lub D i obserwowano, jak hamowanie poszczególnych szlaków metabolizmu energetycznego wpływa na zmiany organizacji mikrofilamentów indukowane przez cytochalazyny. Cytochalazyna D powoduje przecinanie wiązek mikrofilamentów, powstające krótsze fragmenty wiązek nie mając kontaktu z błoną komórkową kurczą się izotonicznie [62], wskutek czego dochodzi do tworzenia się lokalnych agregatów zawierających F-aktynę. Proces ten wymaga dostarczenia energii [43, 90] i towarzyszy mu spadek wewnątrzkomórkowego stężenia ATP [98]. ATP zużywane jest najprawdopodobniej w reakcji refosforylacji ADP pojawiającego się na utworzonych wolnych końcach mikrofilamentów w wyniku ich rozcinania przez cytochalazynę D [98], jest też zużywane przez ATP-azę miozynową podczas izotonicznego skurczu wiązek mikrofilamentów. Wykazano, że obecność cytochalazyny D nie wpływa na intensywność oddychania komórek. Jeżeli jednak w komórkach zablokowana zostanie glikoliza, oddychanie zwiększa się po dodaniu cytochalazyny D. Na podstawie tego doświadczenia sugerowano, że do reakcji skurczowej wiązek mikrofilamentów energia dostarczana jest wyłącznie przez glikolizę. Tego typu badania dotyczą jednak szybkich zmian w konsumpcji ATP przez kurczące się izotonicznie wiązki mikrofilamentów.

Zmiany te mają charakter przejściowy [98] i nie mogą być w pełni porównywalne z procesami zużycia ATP przez układ aktomiozynowy podczas migracji komórek, kiedy osiągany jest stan równowagi stacjonarnej między procesami zużycia i produkcji energii [20]. Wykazano ponadto, że jeżeli komórki preinkubuje się przed działaniem cytochalazyny B z azydkiem sodu (inhibitor transportu elektronów w łańcuchu oddechowym) lub oligomycyną (inhibitor ATP-azy mitochondrialnej), zmiany w organizacji mikrofilamentów zachodzą o wiele wolniej [11, 12]. Przy równoczesnym blokowaniu glikozy i oddychania komórek dochodzi również do zahamowania reakcji mikrofilamentów na działanie cytochalazyny D [43]. Zatem wyniki badań dotyczące reakcji wiązek mikrofilamentów na działanie cytochalazyn wskazują, że energia również dla tej reakcji może być dostarczana zarówno przez glikolizę, jak i oddychanie tlenowe, podobnie jak energia do lokomocji i do utrzymania organizacji mikrofilamentów w komórce.

Większość omówionych powyżej badań dotyczyła wpływu zahamowania metabolizmu energetycznego na zachowanie się tych mikrofilamentów, które związane są z lokomocją lub zachowaniem kształtu komórek. Inne zbadane formy organizacji F-aktyny – pierścień podziałowy i jądrowe fibryle aktynowe indukowane sulfotlenkiem dimetylu [37] – nie są naruszane przez obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia ATP [89].

Interesujące wyniki uzyskano w doświadczeniach dotyczących wpływu trombiny na zachowanie się mikrofilamentów w płytkach krwi. Wykazano, że 4,5-difosforan fosfatydyloinozytolu, który pośredniczy jako składnik cyklu fosfatydyloinozytoli w reakcji płytek na trombinę, powoduje uwolnienie związanej z profiliną monomerycznej aktyny i tworzenie nowych mikrofilamentów [64, 65]. Dane te wskazują zatem, że cykl fosfatydyloinozytoli, odgrywający rolę w transdukcji sygnałów z receptorów błonowych [10], może bezpośrednio wpływać na mikrofilamenty.

http://rcin.org.pl

WPŁYW MIKROFILAMENTÓW NA METABOLIZM KOMÓRKI

Większość doświadczeń, których wyniki przedstawione zostały powyżej, koncentrowała się na wpływie metabolizmu energetycznego na zachowanie się mikrofilamentów w komórce. Z drugiej strony istnieje wiele danych dotyczących wpływu mikrofilamentów na metabolizm komórki. W komórkach migrujących zarówno glikoliza, jak i oddychanie są bardziej intensywne w porównaniu z komórkami nieruchomymi, niezależnie od tego, czy ruch komórek zahamowany jest przez wzajemne kontakty komórek [13, 57, 75], czy przez zawieszenie komórek w płynnym środowisku [57]. Powstaje zatem pytanie, czy taka zmiana metabolizmu komórek może być związana ze zmianami w funkcji mikrofilamentów? Dane przedstawione na początku pracy sugerują, że tak może być w istocie. Zarówno glikoliza, jak i oddychanie tlenowe dostarczają energii do ruchu komórek. Zwiększony metabolizm energetyczny migrujących komórek może być wobec tego wytłumaczony istnieniem zależności glikozy i oddychania od potencjału fosforylacyjnego i ładunku energetycznego komórki [3, 30]. Aktywność produkcji ATP w glikolizie i w oddychaniu tlenowym jest zależna od aktywności ATP-azowej hydrolizującej ATP do ADP i P_i i w ten sposób wpływającej na ładunek energetyczny i potencjał fosforylacyjny [3, 20, 30, 84]. Układ aktomiozynowy tworzony przez białka wchodzące w skład wiązki mikrofilamentów jest jednym z układów ATP-azowych komórki. Sprzężenie zwrotne między produkcją ATP i jego hydrolizą przez aktomiozynę może być zatem odpowiedzialne za stymulację metabolizmu energetycznego w migrujących komórkach [20, 53, 61].

Bliższego wyjaśnienia wymaga problem, czy wysoki metabolizm energetyczny komórek migrujących jest rzeczywiście warunkowany aktywnością układu kurczliwego. Kontaktowemu zahamowaniu ruchu towarzyszy bowiem najczęściej zahamowanie innych procesów, w tym także syntezy makromolekuł. Intensywna synteza makromolekuł jest często uważana za czynnik stymulujący wysoki metabolizm energetyczny komórek [38, 77]. Rzeczywiście, badania przeprowadzone na komórkach HeLa i L wydają się potwierdzać taką zależność [50, 87]. Hamowanie syntezy białka w różnych fazach cyklu komórkowego lub hamowanie syntezy DNA w fazie S powodowało spadek metabolizmu energetycznego tych komórek. Uogólnianie wyników tych badań może jednak budzić zastrzeżenia, ponieważ przeprowadzono je na komórkach o charakterze nowotworowym, a więc o zmienionej organizacji mikrofilamentów, przy tym pomiary oddychania prowadzone były w zawiesinie, a więc komórki nie mogły wykazywać aktywnej lokomocji.

Do odmiennego wniosku doprowadziły badania prowadzone na komórkach, które mają możliwość aktywnej lokomocji. Otrzymano dane, wskazujące, że w tych warunkach synteza makromolekuł nie jest czynnikiem warunkującym wysoki metabolizm energetyczny komórek. Zahamowanie w migrujących komórkach syntezy DNA przez 2'-deoksyguanozynę nie powoduje istotnych zmian w natężeniu zarówno glikolizy, jak i oddychania, przy czym działanie 2'-deoksyguanozyny nie ma wpływu na szybkość lokomocji komórek [53, 54]. Wykazano ponadto, że zmiany aktywności metabolizmu energetycznego w zagęszczającej się hodowli komórek nie są skorelowane z aktywnością syntezy białka. Po utworzeniu zwartej warstwy komórek, czemu towarzyszy kontaktowe zahamowanie ruchu, spada aktywność glikolityczna i oddychanie [9, 13], natomiast poziom syntezy białka nie ulega zmianie [9]. Powyższe wyniki świadczą o tym, że wysoki poziom metabolizmu energetycznego w migrujących komórkach jest rzeczywiście bezpośrednio wynikiem konsumpcji

http://rcin.org.pl

energii w procesach związanych z migracją. Natomiast zmiany poziomu metabolizmu energetycznego związane z syntezą makromolekuł mogą stać się znaczące tylko wtedy, gdy komórki pozostają w zawiesinie.

W ostatnich latach zwraca się coraz częściej uwagę także na strukturalne powiązania między enzymami glikolizy a elementami cytoszkieletu. Choć dawniej enzymy glikolityczne zaliczano do "enzymów rozpuszczalnych", na początku lat siedemdziesiątych wykazano wiązanie się enzymów glikolizy z F-aktyną w komórkach mięśni prążkowanych [1, 2]. Wszystkie z przebadanych enzymów glikolizy wiązały się z F-aktyną. Zdolność do wiązania się z G-aktyną wykazywała jedynie aldolaza, powodując przy tym jej agregację [1]. Wykazano również, że przyłączenie aldolazy do F-aktyny powoduje aktywację tego enzymu – podwojenie V_{max} i dziesięciokrotny wzrost K_m względem fruktozo-1,6-difosforanu. Dane te sugerowały, że wiązanie się enzymów glikolizy z F-aktyną mogło by mieć znaczenie dla regulacji aktywności glikolizy w komórkach. Równocześnie stwierdzono jednak, że wiele czynników powoduje odrywanie się enzymów glikolitycznych od F-aktyny. Do czynników tych należy fruktozo-1,6-difosforan i inne metabolity pośrednie glikolizy, a także fizjologiczna siła jonowa [2]. Te ostatnie wyniki zadecydowały o tym, że zjawisku wiązania enzymów glikolitycznych z mikrofilamentami przestano przypisywać znaczenie fizjologiczne.

Nowa fala zainteresowania oddziaływaniami enzymów glikolizy z F-aktyną rozpoczęta została badaniami przeprowadzonymi przez Clarke'a i Mastersa [21, 22]. Przebadali oni ponownie oddziaływania enzymów glikolitycznych i F-aktyny i stwierdzili, że jeżeli stężenie F-aktyny jest takie, jakie występuje w komórce, to nawet w wyższej niż fizjologiczna sile jonowej dochodzi do adsorpcji enzymów na F-aktynie. Badając wiązanie enzymów glikolitycznych do oczyszczonej F-aktyny z mięśni bydlęcych stwierdzono, że fosfofruktokinaza, aldolaza fruktozodifosforanowa, kinaza pirogronianowa, dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerolowego oraz izomeraza glukozo-6-fosforanu silnie wiążą się z F-aktyną oraz z kompleksem F-aktyna-tropomiozyna-troponina. Wzrost stężenia jonów wapniowych i fruktozo-6-fosforanu silnie stymuluje przyłączanie się aldolazy, dehydrogenazy mleczanowej i kinazy pirogronianowej. Dla pozostałych enzymów glikolizy: izomerazy triozofosforanowej, kinazy fosfoglicerynianowej, mutazy fosfoglicerolowej, hydratazy fosfopirogronianowej (enolazy) i heksokinazy stwierdzono jedynie niewielkie wiązanie do F-aktyny. W następnych latach doniesiono również o wiązaniu się enzymów glikolitycznych z F-aktyną tkanek niemięśniowych [24]. W cząsteczkach niektórych enzymów glikolizy (fosfofruktokinaza, dehydrogenaza aldehydu difosfoglicerolowego, aldolaza) zidentyfikowano miejsca specyficznego wiązania F-aktyny [48, 49].

Dalsze badania potwierdziły, że enzymy glikolizy nie tylko łączą się w fizjologicznych warunkach z F-aktyną, ale – podobnie jak wykazywano w starszych pracach – również w tych warunkach F-aktyna może wpływać na aktywność enzymów glikolizy. Wykazano, że aldolaza, która wiąże się z aktyną tworząc struktury parakrystaliczne [24], wykazuje wzrost powinowactwa do substratu (difosforan fruktozy) i wzrost szybkości maksymalnej katalizowanej reakcji [104]. Podobnie po przyłączeniu się do F-aktyny kluczowego enzymu glikolizy – fosfofruktokinazy następuje wzrost zarówno K_m i V_{max} dla tego enzymu [69]. Choć nie przebadano tego w fizjologicznej sile jonowej, w niższej sile jonowej adsorpcja na F-aktynie potęguje aktywację fosfofruktokinazy przez AMP i przeciwdziała hamowaniu aktywności tego enzymu przez cytrynian i ATP. Zatem adsorpcja fosfofruktokinazy zmienia nie tylko kinetyczne właściwości enzymu, ale także zdolność do regulacji jego aktyw-

http://rcin.org.pl

ności. Biorąc pod uwagę, że fosfofruktokinaza jest kluczowym enzymem regulującym aktywność szlaku glikolitycznego, należy się spodziewać, że ilość i organizacja mikrofilamentów może wpływać na aktywność glikolityczną komórek.

Wyniki prac dotyczących oddziaływań enzymów szlaku glikolitycznego i F-aktyny wskazują na możliwość tworzenia mikroprzedziałów w komórce przez mikrofilamenty. Mikroprzedziałami określa się obszary cytoplazmy różniące się od siebie stężeniem rozpuszczonych substancji (np. jonów, białek), nie będące jednak odgraniczone od siebie barierą tworzoną przez błonę. Rola mikroprzedziałów w regulacji metabolizmu energetycznego została wykazana dla komórek mięśni gładkich, w których istnieją dwa fizycznie oddzielone od siebie, szlaki glikolizy. Są one regulowane niezależnie od siebie, przy czym jeden z nich jest stymulowany przez ATP-azę Na^+/K^+, a drugi przez ATP-azę aktomiozynową [72]. Prawdopodobna wydaje się zatem możliwość tworzenia mikroprzedziałów dla szlaku glikolitycznego przez mikrofilamenty również w komórkach niemięśniowych [6, 25].

Zjawisko adsorpcji i aktywacji enzymów na F-aktynie może być również jednym z mechanizmów regulujących aktywność glikolityczną komórek. Przykładem zjawiska, w którym uwidacznia się wpływ organizacji mikrofilamentów na aktywność glikolizy, są zmiany w wymaganiach energetycznych zachodzące podczas rozpłaszczania się komórek, do którego dochodzi po zetknięciu się komórki zawieszonej w płynnym środowisku ze stałym podłożem. Rozpłaszczanie się komórek, podczas którego następuje uorganizowanie się cytoszkieletu, w tym mikrofilamentów, jest procesem wymagającym dostarczenia energii [6, 56, 100]. Przy rozpoczęciu rozpłaszczania F-aktyna zlokalizowana jest jedynie w postaci podbłonowej sieci, jej ilość jest znacznie mniejsza niż w komórkach rozpłaszczonych [55]. W tych warunkach działanie na komórki antymycyną A – inhibitorem łańcucha oddechowego – całkowicie hamuje rozpłaszczanie komórek [6]. W miarę jednak postępowania rozpłaszczenia komórek rozwija się uorganizowany szkielet wiązek mikrofilamentów i wzrasta ilość F-aktyny w komórce. Dodanie antymycyny A na tym etapie rozpłaszczania nie powoduje już zahamowania dalszego przebiegu tego procesu. Zależność wczesnych etapów rozpłaszczania wyłącznie od oddychania interpretuje się jako wskaźnik małej aktywności enzymów glikolitycznych w komórce z nie wykształconym cytoszkieletem F-aktynowym [6].

Zaskakujące było odkrycie, że istnieje również możliwość bezpośredniego wpływu enzymów glikolizy na organizację mikrofilamentów w komórce. Wykazano, że po dodaniu fosfofruktokinazy do komórek metodą mikroiniekcji dochodzi do szybkiego zaniku wiązek mikrofilamentów w komórkach [36]. W tym sposobie działania fosfofruktokinaza przypomina jedno z białek regulujących zachowanie się aktyny w komórce – gelsolinę [108] i podobnie jak gelsolina jest zależna od obecności jonów wapniowych [109]. Choć gelsolina nie wykazuje aktywności względem substratu fosfofruktokinazy, to inne liczne podobieństwa biochemiczne i immunologiczne [36] otwierają możliwość domysłów na temat wspólnych ewolucyjnych związków fosfofruktokinazy i gelsoliny, co może także być rozszerzone na inne enzymy glikolizy i pozostałe białka łączące się z mikrofilamentami i regulującymi ich organizację.

Interesujące są również dane dotyczące możliwości odgrywania przez filamenty aktynowe roli w procesie syntezy białka. Pod koniec lat siedemdziesiątych stwierdzono, że polirybosomy i mRNA nie są wymywane z komórki po potraktowaniu jej niejonowym detergentem, np. Tritonem X-100, lecz zostają przyczepione do pozostających w tych

http://rcin.org.pl

warunkach elementów cytoszkieletu [66]. Inkubacja cytoszkieletu wypreparowanego przy użyciu Tritonu X-100, a więc mającego związane mRNA prowadzi w układzie bezkomórkowym do syntezy takiego samego profilu białek, jakie aktualnie syntetyzowane są w komórce, z której wypreparowano cytoszkielet [101]. Również czynniki inicjacji translacji, eIF2, eIF3, eIF4a, eIF4b są wzbogacone we frakcji cytoszkieletowej [47]. Na podstawie tych przesłanek stwierdzono, że przyczepienie polirybosomów do cytoszkieletu jest warunkiem koniecznym dla syntezy białka [19, 47]. Wykazano także, że podczas procesów różnicowania mioblastów linii L6, mRNA kodujące specyficzne dla różnicowania białka mogą służyć do syntezy białka tylko po zaadsorbowaniu na elementach cytoszkieletu [4, 5]. Badania prowadzone z użyciem kolchicyny i cytochalazyny B wykazały, że tylko cytochalazyna B powoduje odczepienie polirybosomów od cytoszkieletu i działa hamująco na biosyntezę białka [47, 66]. Ponieważ cytochalazyna B działa na mikrofilamenty [16], można wnioskować, że to one są tym składnikiem cytoszkieletu, do którego przyczepiają się polirybosomy. Można zatem postulować, że organizacja mikrofilamentów w komórce może mieć wpływ również na poziom biosyntezy białka. Brak jednak do tej pory bardziej szczegółowych badań, szczególnie przeprowadzonych w układzie bezkomórkowym, mogących potwierdzić istnienie tego typu związków.

WPŁYW MIKROFILAMENTÓW NA REGULACJĘ ROZMNAŻANIA KOMÓREK

Wielostronność poznanych już wzajemnych związków między funkcją mikrofilamentów a aktywnością komórki pozwala oczekiwać, że mogą one okazać się elementem zaangażowanym w kontrolę również innych funkcji komórki. Jednym z najbardziej dyskutowanych obecnie problemów jest możliwość udziału mikrofilamentów w regulacji syntezy DNA i podziałów komórek [6, 31]. Warto przy tym zaznaczyć, że udział mikrofilamentów w regulacji rozmnażania komórek sugerowany był, zanim jeszcze powszechnie zaakceptowano występowanie aktyny w komórkach niemięśniowych [58]. Jednym z przykładów przedstawionych we Wstępie niniejszego przeglądu było istnienie zależności między przyczepieniem i rozpłaszczeniem komórek prawidłowych na podłożu a ich zdolnością do podjęcia syntezy DNA i wzrostu. Ponieważ rozpłaszczeniu komórek towarzyszy uorganizowanie cytoszkieletu, sugerowano, że organizacja filamentów aktynowych w komórce może być czynnikiem wpływającym na syntezę DNA. W szeregu prac wykazano, że nie tylko sam fakt przyczepienia, lecz również stopień rozpłaszczenia ma znaczenie dla syntezy DNA w komórkach [17, 35]. Wydaje się jednak mało prawdopodobne, aby sam kształt był wyłącznym czynnikiem kontrolującym rozmnażanie komórek. Wiadomo jednak, że siła adhezji, wpływając z jednej strony na kształt komórki [35] wpływa jednocześnie na organizację mikrofilamentów [52, 60, 106]. Według obecnych poglądów komórka przyczepia się do podłoża w specyficznych miejscach tzw. *focal contact* [40]. Wobec tego można sugerować, że podłoże komórkowe wpływając z jednej strony na kształt komórki, wpływa również na organizację mikrofilamentów i w ten sposób wywiera swoje działanie na syntezę DNA. W badaniach nad stymulacją proliferacji komórek w hodowli w płynie nie zawierającym surowicy wykazano, że niektóre czynniki stymulujące podjęcie syntezy DNA zwiększają stopień rozpłaszczenia komórek, a niektóre zmniejszają go. Wszystkie natomiast

http://rcin.org.pl

przebadane czynniki (surowica, insulina, egzogeniczny ATP) powodują zwiększenie migracji komórek [81]. Zatem również te badania wskazują, że stopień rozpłaszczenia nie jest bezpośrednio związany ze zdolnością komórek do podejmowania syntezy DNA. Na zaangażowanie mikrofilamentów w mechanizmach stymulacji syntezy DNA wskazują również doświadczenia, w których wykazano, że dihydrocytochalazyna B hamuje stymulację syntezy DNA przez czynniki wzrostowe w komórkach 3T3 [73], przy czym istotne jest, że ta pochodna cytochalazyny B nie hamuje transportu glukozy przez błonę komórkową [67].

Znaczne zmiany w organizacji mikrofilamentów w komórce stwierdzono także po stymulowaniu komórek nieproliferujących do syntezy DNA przez peptydowe czynniki wzrostowe. W fibroblastach 3T3 po stymulacji do rozmnażania przez PDGF obserwowano zanik wiązek mikrofilamentów, który poprzedzony był zniknięciem winkuliny z miejsc kontaktu komórki z podłożem [45], przy czym nie obserwowano wpływu stymulacji syntezy DNA na filamenty pośrednie i mikrotubule. W innej pracy przeprowadzonej na takich samych komórkach wykazano, że stymulacja syntezy DNA powoduje rozbicie wszystkich elementów cytoszkieletu, tj. mikrofilamentów, mikrotubul i filamentów pośrednich [14]. Warto w tym miejscu wspomnieć o roli przypisywanej mikrotubulom w regulacji proliferacji [83]. Choć niektórzy autorzy uważają, że zawartość i organizacja mikrotubul nie jest związana z regulacją syntezy DNA [14, 45], inni zakładają, że depolimeryzacja mikrotubul jest etapem koniecznym do zapoczątkowania syntezy DNA [27, 88]. Metodą mikrofluorymetrii skanującej z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciw tubulinie wykazano jednak, że stopień polimeryzacji mikrotubul w komórkach, których rozmnażanie zostało zahamowane przez dużą gęstość w hodowli, pozostaje niezmieniony [51]. Można wobec tego przypuszczać, że – przynajmniej w przypadku mechanizmu zależnego od gęstości zahamowania wzrostu – stopień polimeryzacji mikrotubul nie odgrywa bezpośrednio roli w regulacji rozmnażania komórek.

Również ekspresja genów aktyny wydaje się być skorelowana z regulacją wzrostu komórek. Wykazano, że indukcja syntezy DNA w komórkach 3T3 przetrzymywanych w niskim stężeniu surowicy jest poprzedzona wzrostem syntezy aktyny [86]. Wykazano także, że w komórkach, których wzrost zależny jest od przyczepienia do podłoża, a przetrzymywanych w zawiesinie, synteza aktyny ulega znacznie większemu ograniczeniu niż synteza innych białek. Również po wysianiu komórek przetrzymywanych w zawiesinie na podłoże stale dochodzi do wzrostu syntezy aktyny, przy czym w szczycie tego wzrostu synteza aktyny stanowi 25% ogólnej syntezy białka [31, 32].

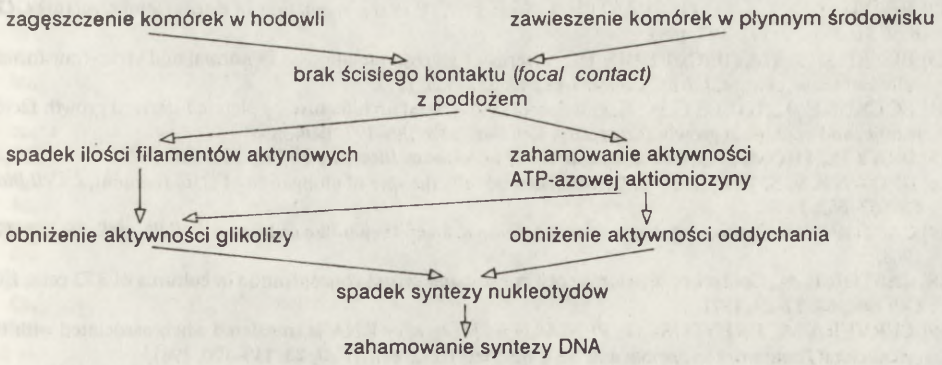
Korohoda i wsp. zwrócili uwagę, że funkcje aparatu kurczliwego komórki indukują również zmiany rozmieszczenia jonów Ca^{2+} wewnątrz komórki [61]. Ponieważ wzrost stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie podstawowej jest czynnikiem zaangażowanym w stymulacji syntezy DNA [29, 82, 102], możliwość wpływu aparatu kurczliwego przez gospodarkę wapniową na procesy regulujące syntezę DNA powinna być także brana pod uwagę.

Istnieje również możliwość oddziaływania mikrofilamentów na syntezę DNA poprzez ich wpływ na metabolizm energetyczny komórek. Wysoki metabolizm energetyczny proliferujących komórek dostarcza metabolitów do syntezy prekursorów syntezy DNA – deoksyrybonukleozydów [53, 54, 70, 78, 79], przy czym synteza tych metabolitów wydaje się być ważniejsza niż sama tylko produkcja energii [68, 71, 110]. Czy rozmiar puli prekursorów jest czynnikiem regulującym podjęcie syntezy DNA, jest pytaniem wciąż otwartym [74, 103], z pewnością jednak ograniczenie puli nukleotydów prowadzi do zahamowania syn-

http://rcin.org.pl

tezy DNA [39, 107]. Interesujące dane wskazujące na współdziałanie metabolizmu energetycznego i mikrofilamentów w regulacji syntezy DNA uzyskano w doświadczeniach, w których badano zmiany metabolizmu energetycznego po stymulacji komórek do syntezy DNA przez czynniki wzrostowe. Wykazano, że stymulacji tej towarzyszy znaczny przejściowy wzrost obrotu ATP (hydrolizy ATP i refosforylacji ADP) [95, 96], przy czym nie jest on związany z pobudzeniem ATP-azy Na^+/K^+, stymulacją syntezy RNA lub białka [95]. Wykazano natomiast, że cytochalazyna D znosi zarówno stymulację obrotu ATP, jak i syntezy DNA przez czynniki wzrostowe, przy czym nie hamuje ona obrotu ATP w komórkach nie stymulowanych do syntezy DNA [97]. Można wobec tego wnioskować, że zwiększony metabolizm energetyczny towarzyszący podjęciu syntezy DNA jest związany z funkcją mikrofilamentów.

Powyższe wyniki pozwalają na przedstawienie hipotezy, że mikrofilamenty odgrywają rolę w regulacji syntezy DNA, wpływając na metabolizm energetyczny i związaną z tym syntezę prekursorów DNA. W świetle przytoczonych wyników można zaproponować następujący przebieg wydarzeń, prowadzących do zahamowania syntezy DNA w gęstej hodowli komórek lub w zawiesinie. Po osiągnięciu krytycznego zagęszczenia komórek w hodowli dochodzi do utraty ścisłego kontaktu komórek z podłożem [52], co prowadzi do zaniku wiązek mikrofilamentów [7]. Zagęszczaniu się hodowli towarzyszy ponadto spadek ilości F-aktyny w komórkach [7] i spadek aktywności ruchowej komórek [18]. Również w komórkach pozostających w zawiesinie wiązki mikrofilamentów są nieobecne, a ilość F-aktyny jest znacznie mniejsza niż w komórkach rozpłaszczonych [55]. Spadek ilości mikrofilamentów i zmiana ich organizacji prowadzi do obniżenia metabolizmu energetycznego [13, 57, 75], zarówno z powodu osłabienia oddziaływań F-aktyny z enzymami glikolitycznymi [6] jak i zmniejszenia hydrolizy ATP przez układ aktomiozynowy komórek [53, 54]. Konsekwencją spadku metabolizmu energetycznego jest zahamowanie dostarczania metabolitów do syntezy prekursorów DNA [53, 54, 70, 79] i w konsekwencji zahamowanie syntezy DNA i rozmnażania komórek. Wzajemne powiązania między zjawiskami dotyczącymi powierzchni komórki, mikrofilamentami, metabolizmem i syntezą DNA ilustruje rysunek 2. Opisane doświadczenia [95, 97] wskazujące na udział mikrofilamentów w stymulacji syntezy DNA pozwalają przypuszczać, że podobne mechanizmy mogą odgrywać rolę w mechanizmach stymulacji rozmnażania komórek.



Rys. 2. Wzajemne oddziaływania między mikrofilamentami i metabolizmem komórki i ich udział w mechanizmach rozmnażania komórek prawidłowych w zagęszczonej hodowli i zawieszonych w płynnym środowisku

http://rcin.org.pl

WNIOSKI KOŃCOWE

Wyniki prac omówionych w niniejszym artykule pozwalają przyjąć tezę, że mikrofilamenty mogą spełniać wielorakie funkcje w komórce, wykraczające daleko poza rolę "napędu i rusztowania". Pełne wyjaśnienie wzajemnych zależności między funkcją i organizacją mikrofilamentów i metabolizmu energetycznego może okazać się pomocne w pełniejszym zrozumieniu mechanizmów regulujących aktywność metaboliczną i regulację namnażania komórek.

LITERATURA

[1] ARNOLD H., HENNING R., PETTE D., Quantitative comparison of the binding of various glycolytic enzymes to F-actin and the interaction of aldolase with F-actin, *Eur. J. Biochem.*, **22**: 121–126, 1971.
[2] ARNOLD H., PETTE D., Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase, *Eur. J. Biochem.*, **15**: 360–366, 1970.
[3] ATKINSON D. E., Biological feedback at the molecular level, *Science*, **150**: 851–857, 1965.
[4] BAG J., PRAMANIK S., Attachment of mRNA to the cytoskeletal framework and translational control of gene expression in rat L6 muscle cells, *Biochem. Cell Biol.*, **65**: 565–575, 1987.
[5] BAGCHI T., LARSON D. E., SELLS B. H., Cytoskeletal association of muscle-specific mRNAs in differentiating L6 rat myoblasts, *Exp. Cell Res.*, **168**: 160–172, 1987.
[6] BEREITER-HAHN J. Involvement of microcompartmentation in the regulation of cell proliferation, [w]: D. Jones (red.) Microcompartmentation, CRC Press Inc., str. 56–69, 1988.
[7] BEREITER-HAHN J., KAJSTURA J., Scanning microfluorimetric measurement of TRITC-phalloidin labelled F-actin in culture cells: dependence of F-actin content on density of normal and transformed cells. *Histochemistry*, **90**: 271–276, 1988.
[8] BEREITER-HAHN J., TILLMANN U., VOTH M., Interaction of metabolic inhibitors with actin fibrils, *Cell Tissue Res.*, **238**: 129–134, 1984.
[9] BEREITER-HAHN J., FAVA P., FUHRMANN C., KAJSTURA J., MÜNNICH A., What happens to culture cells when they become confluent? *Eur. J. Cell Biol.*, suppl. 7: 6, 1987.
[10] BERRIDGE M. J., Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 159–163, 1987.
[11] BERSHADSKY A. D., GELFAND V. I., SVITKINA T. M., TINT I. S., Destruction of microfilament bundles in mouse embryo fibroblasts treated with inhibitors of energy metabolism. *Exp. Cell Res.*, **127**: 421–429, 1980.
[12] BERSHADSKY A. D., GELFAND V. I., Role of ATP in the regulation of cytoskeletal structures. *Cell Biol. Int. Rep.*, **7**: 173–187, 1983.
[13] BISSEL M. J., HATIE C., RUBIN H., Patterns of glucose metabolism in normal and virus-transformed cells and tissue culture, *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**: 555–565, 1972.
[14] BOCKUS B. J., STILES C. D., Regulation of cytoskeletal architecture by plateled-derived growth factor, insulin, and epidermal growth factor, *Exp. Cell Res.*, **153**: 186–197, 1974.
[15] BRAY D., THOMAS C., The actin content of fibroblasts, *Biochem. J.*, **147**: 221–228, 1975.
[16] BROWN S. S., SPUDICH J. A., Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament, *J. Cell Biol.*, **83**: 657–662, 1979.
[17] CASTOR L. N., Contact regulation of cell division in an epithelial-like cell line, *J. Cell Physiol.*, **86**: 161–172, 1968.
[18] CASTOR L. N., Control of division by cell contact and serum concentration in cultures of 3T3 cells, *Exp. Cell Res.*, **68**: 17–24, 1971.
[19] CERVERA M., DREYFUSS G., PENMAN S., Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV infected HeLa cells, *Cell*, **23**: 113–120, 1981.
[20] CHANCE B., Transients in metabolism, [w]: T. H. Waterman, H. J., Morowitz (red.): Theoretical and mathematical Biology. Blaisdell Publ. Co., New York, str. 334–343, 1974.

http://rcin.org.pl

[21] CLARKE F. M., MASTERS C. J., On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **381**: 37–46, 1975.
[22] CLARKE F. M., MASTERS C. J., Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes, *Biochem. J.*, **7**: 359–365, 1976.
[23] CLARKE F. M., MORTON D. J., Aldolase binding to actincontaining filaments. Formation of paracrystals, *Biochem. J.*, **159**: 797–798, 1976.
[24] CLARKE F. M., MORTON D. J., Glycolytic enzyme binding in fetal brain – the role of actin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**: 388–393, 1982.
[25] CLEGG J. S., Metabolic compartmentation and "soluble" metabolic pathways, *Bioessays*, **1**: 129–132, 1984.
[26] COLOWICK S. P., NAGARAJAN B., Energy sources for tumour growth. [w]: Pietro A. S., Gest H. (red.) "Horizons of bioenergetics". Acad. Press, New York, London, str. 97–112, 1972.
[27] CROSSIN K. L., CARNEY D. H., Evidence that microtubule depolymerization early in the cell cycle is sufficient to initiate DNA synthesis, *Cell*, **23**: 61–66, 1981.
[28] DULBECCO R., ELKINGTON J., Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures, *Nature*, **246**: 197–199, 1973.
[29] ENGSTRÖM W., ZETTERBERG A., AUER G., Calcium, phosphate, and cell proliferation, [w]: Ions, Cell Proliferation, and Cancer, A. L. Boynton, W. L. McKeehan i J. F. Whitfield (red.), Acad. Press New York-London, str. 245–257, 1982.
[30] ERECIŃSKA M., STUBBS M., MIYATA Y., DITRE C. M., WILSON D. F., Regulation of cellular metabolism by intracellular phosphate, *Biochim. Biophys. Acta*, **462**: 20–35, 1977.
[31] FARMER S. R., Actin, a regulator of cell growth and differentiation, [w] J. W. Shay (red.) Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton, Plenum Press, New York-London, str. 131–149, 1986.
[32] FARMER S. R., WAN K. M., BEN-ZE'EV A., PENMAN S., Regulation of actin mRNA levels and translation responds to changes in cell configuration, *Mol. Cell. Biol.*, **3**: 182–189, 1983.
[33] FISKUM G., COCKRELL R. S., Uncoupler-stimulated release of Ca^{2+} from Ehrlich ascites tumour cell mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**: 723–733, 1985.
[34] FISKUM G., LEHNINGER A. L., The mechanism and regulation of mitochondrial Ca^{2+} transport, *Federation Proc.*, **39**: 2432–2436, 1980.
[35] FOLKMAN J., MOSCONA A., Role of cell shape in growth control, *Nature* **273**: 345–349, 1978.
[36] FÜCHTBAUER A., JOCKUSCH B. M., LEBERER E., PETTE D., Actinsevering activity copurifies with phosphofructokinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 9502–9506, 1986.
[37] FUKUI Y., KATSUMARU H., Nuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in *Amoeba proteus*, *Dictyostelium* and human HeLa cells, *Exp. Cell Res*, **120**: 451–455, 1979.
[38] GAIL M. H., Time-lapse studies on the motility of fibroblasts in tissue culture, [w] Locomotion of Tissue Cells. Ciba Found. Symp. 14, Elsevier-North Holland, Amsterdam, str. 287–310, 1973.
[39] GALVAZI G., SCHENK H., BOOTSMA D., Synchronization of mammalian cells in vitro by inhibition of DNA synthesis. I. Optimal conditions, *Exp. Cell Res.*, **41**: 428–437, 1966.
[40] GEIGER B., AVNUR Z., RINNERTHALER G., HINSSEN H., SMALL V. J., Microfilament organizing centers in areas of cell contact: cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion, *J. Cell Biol.*, **99**: 83–91, 1984.
[41] GIBBINS J. R., Metabolic requirements for epithelial migration as defined by the use of metabolic inhibitors in organ culture, *Exp. Cell Res.*, **71**: 329–337, 1972.
[42] GIERTHY J. F., ROTHSTEIN H., Cell disorganization and stimulation of mitosis in cultured leopard frog lens, *Exp. Cell Res.*, **64**: 170–178, 1971.
[43] GODMAN G., WODA B., KOLBERG R., BERL S., Redistribution of contractile and cytoskeletal components induced by cytochalasin. II. In HeLa and HEp2 cells, *Eur. J. Cell Biol.*, **22**: 745–754, 1980.
[44] HEACOCK C. S., EIDSVOOG K. E., BAMBURG J. R., The influence of contact-inhibited growth and of agents which alter cell morphology on the levels of G- and F-actin in cultured cells. *Exp. Cell Res.*, **153**: 402–412, 1984.
[45] HERMAN B., PLEDGER W. J., Platelet-derived growth factorinduced alterations in vinculin and actin distribution in BALB/c-3T3 cells, *J. Cell Biol.*, **100**: 1031–1040, 1985.
[46] HOLLEY R. W., KIERNAN J. A., Studies on serum factors required by 3T3 cells, [w]: Growth Control in Cell Cultures, Ciba Found. Symp., G. E. W. Wolstenholme, J. Knight (red.), Churchill Livingston, Edinburgh-London, str. 3–15, 1971.
[47] HOWE J. G., HERSHEY J. W. B., Translation initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells, *Cell*, **37**: 85–93, 1984.

http://rcin.org.pl

[48] HUMPHREYS L., REID S., MASTERS C., Studies on the topographical localization of the binding sites for substrate and for actin on the enzymes, glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphofructokinase, *Internat. J. Biochem.*, **18**: 445–451, 1986.

[49] HUMPHREYS L., REID S., MASTERS C., Evidence for the spatial separation of the binding sites for substrate and for cytoskeletal proteins on the enzyme aldolase. *Internat. J. Biochem.*, **18**: 7–13, 1986.

[50] ISHIGURO S., YAMAGUCHI H., OKA Y., MIYAMOTO M., Change in energy metabolism in the cell cycle of mouse L cells, *Cell Struct. Function*, 3: 331–340, 1978.

[51] KAJSTURA J., BEREITER-HAHN J., Scanning microfluorimetric measurement of immunofluorescently labelled microtubules in cultured cells. Dependence of microtubule content on cell density, *Histochemistry*, **88**: 53–55, 1987.

[52] KAJSTURA J., BEREITER-HAHN J., Loss of focal contacts accompanies the density dependent inhibition of cell growth, *Cell Biol. Int. Rep.*, **13**: 337–383, 1989.

[53] KAJSTURA J., KOROHODA W., Cellular metabolism and cell contact reactions. *Studia Biophys.*, **90**: 199–205, 1982.

[54] KAJSTURA J., KOROHODA W., Significance of energy metabolism pathways for stimulation of DNA synthesis by cell migration and serum. *Eur. J. Cell. Biol.*, **31**: 9–14, 1983.

[55] KAJSTURA J., REISS K., Role of F-actin in the osmotic reactions of animal cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1989 (w druku).

[56] KOLODNY G. M., Effect of various inhibitors on readhesion of trypsonozed cells in culture, *Exp. Cell Res.*, **70**: 116–202, 1972.

[57] KOROHODA W., Interrelations of motile and metabolic activities in tissue culture cells. I. Respiration in chicken embryo fibroblasts actively locomoting, contact-inhibited and suspended in a fluid medium. *Folia Biol.* (Kraków), **19**: 41–51, 1971.

[58] KOROHODA W., Some aspects of the interrelation among cell locomotion, contact phenomena and cellular multiplication, *Acta Protozool.*, **11**: 161–172, 1972.

[59] KOROHODA W., Interrelations of motile and metabolic activities in tissue culture cells. III. Semisynchronous growth of chicken embryo cells preincubated in suspension, *Folia Biol.*, **20**: 333–338, 1972.

[60] KOROHODA W., KAJSTURA J., Demonstration of the significance of isometric contraction for the formation of stress fibres in chick embryo fibroblasts, *Folia Histochem. Cytochem.*, **20**: 153–156, 1982.

[61] KOROHODA W., SHRAIDEH Z., BARANOWSKI Z., WOHLFARTH-BOTTERMANN K. E., Energy metabolic regulation of oscillatory contraction activity in *Physarum polycephalum*, *Cell Tissue Res.*, **231**: 675–691, 1983.

[62] KREIS T. E., BIRCHMEIER W., Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell*, **22**: 555–561, 1980.

[63] LANGANGER G., MOEREMANS M., DANEELS G., SOBIESZEK A., DE BRABANDER M., DE MEY J., The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells, *J. Cell Biol.*, **102**: 200–209, 1986.

[64] LASSING I., LINDBERG U., Evidence that the phosphatidylinositol cycle is related to cell motility, *Exp. Cell Res.*, **174**: 1–15, 1988.

[65] LASSING I., LINDBERG U., Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-biphosphate and the profilinactin complex, *J. Cell Biochem.*, **37**: 173–185, 1988.

[66] LENK R., RANSOM L., KAUFMAN Y., PENMAN S., A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells, *Cell*, **10**: 67–78, 1977.

[67] LIN S., LIN D. C., FLANAGAN M. D., Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 329–333, 1978.

[68] LINKER W., LÖFFLER M., SCHNEIDER F., Cell cycle progression of Ehrlich ascites tumor cells grown in glucose-deprived medium supplemented with nucleosides. *Eur. J. Cell. Biol.* suppl. **9**: 18, 1985.

[69] LIOU R.-S., ANDERSON S., Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments, *Biochemistry*, **19**: 2684–2688, 1980.

[70] LÖFFLER M., POSTIUS S., SCHNEIDER F., Anaerobiosis and oxygen recovery: changes in cell cycle distribution of Ehrlich ascites tumour cells grown in vitro, *Virchow's Arch. B. Cell Pathol.*, **27**: 359–368, 1978.

[71] LÖFFLER M., Restimulation of cell cycle progression by hypoxic tumour cells with deoxynucleosides requires ppm oxygen tension, *Exp. Cell Res.*, **169**: 225–261, 1987.

[72] LYNCH R. M., PAUL R. J., Functional compartmentations of carbohydrate metabolism, [w] D. Jones (red.) Microcompartmentation, CRC Press Inc. str. 17–35, 1988.

[73] MANESS P. F., WALSH R. C., Dihydrocytochalasin B disorganizes actin cytoarchitecture and inhibits initiation of DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell*, **30**: 253–262, 1982.

http://rcin.org.pl

[74] MATHEWS C. K., SLABAUGH M. B., Eukaryotic DNA metabolism. Are deoxyribonucleotides channeled to replication sites? *Exp. Cell Res.*, **162**: 285–295, 1986.
[75] MCKAY N. M., ROBINSON B., BRODIE R., ROOKE-ALLEN N., Glucose transport and metabolism in cultured human skin fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **762**: 198–204, 1983.
[76] MCPHERSON I., MONTAGNIER L., Agar suspension culture for selective assay of cells transformed by polyoma virus, *Virology*, **23**: 291–294, 1964.
[77] MITCHISON J. M., The Biology of the Cell Cycle, Cambridge University Press, str. 192–196, 1971.
[78] OLIVOTTO M., PAOLETTI F., The role of respiration in tumour cell transition from the noncycling to cycling state, *J. Cell. Physiol.*, **107**: 243–249, 1981.
[79] OLIVOTTO M., CALDINI R., CHEVANNE M., CIPOLLESCHI M. G., The respiration-linked limiting step of tumour cell transition from the non-cycling to the cycling state: its inhibition by oxidizable substrates and its relationship to purine metabolism. *J. Cell. Physiol.*, **116**: 149–158, 1983.
[80] OTSUKA H., MOSKOWITZ M., Arrest of 3T3 cells in G1 phase in suspension culture, *J. Cell. Physiol.*, **87**: 213–220, 1975.
[81] PIETRZKOWSKI Z., KAJSTURA J., KOROHODA W., Cellular activities associated with the transition of chick embryo fibroblasts from stationary to proliferation state, *Folia Histochem. Cytobiol.* (w druku).
[82] PRAEGER F. C., CRISTOFALO V. J., The growth of WI-38 cells in a serum-free, growth factor-free medium with elevated calcium concentrations, *In Vitro*, **22**: 355–359, 1986.
[83] PUCK T. T., Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system, and cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 4491–4495, 1977.
[84] RACKER E., Why do tumour cells have a high aerobic glycolysis? *J. Cell. Physiol.*, **89**: 597–600, 1976.
[85] REITZER L. J., WICE B. M., KENNEL D., Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells, *J. Biol. Chem.*, **254**: 2669–2676, 1979.
[86] RIDDLE V. G. H., PARDEE A. B., Quiescent cells but not cycling cells exhibit enhanced actin synthesis before they synthesize DNA, *J. Cell. Physiol.*, **103**: 11–15, 1980.
[87] ROBBINS E., MORRILL G. A., Oxygen uptake during the HeLa cell cycle and its correlation with macromolecular synthesis, *J. Cell Biol.*, **43**: 629–633, 1969.
[88] ROZENGURT E., The mitogenic response of cultured 3T3 cells: integration of early signals and synergistic effects in a unified framework. [w] P. Cohen, M. D. Houslay (red.) Molecular mechanisms of transmembrane signalling, Elsevier, Amsterdam, str. 429–454, 1985.
[89] SANGER J. W., SANGER J. M., JOCKUSCH B. M., Differential response of three types of actin filament bundles to depletion of cellular ATP levels, *Eur. J. Cell Biol.*, **31**: 197–204, 1983.
[90] SCHLIWA M., Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks. *J. Cell Biol.*, **92**: 79–91, 1982.
[91] STOKER M. P. G., O'NEILL C., BERRYMAN S., WAXMAN V., Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells, *Int. J. Cancer*, **3**: 683–693, 1968.
[92] STOKER M. P. G., RUBIN H., Density-dependent inhibition of cell growth in culture, *Nature*, **215**: 171–172, 1967.
[93] STOLZ B., BEREITER-HAHN J., Increase of cytosolic calcium results in formation of F-actin aggregates in endothelial cells, *Cell Biol. Int. Rep.*, **12**: 321–329, 1988.
[94] STRZELECKA-GOŁASZEWSKA H., Struktura filamentu aktynowego i jej implikacje biologiczne, *Post. Biologii Komórki*, **13**: 97–124, 1986.
[95] TALHA S., HAREL L., Early effects of growth factors (EGF + insulin) upon ATP-turnover in 3T3 cells, *Exp. Cell Res.*, **149**: 471–481, 1983.
[96] TALHA S., HAREL L., Early stimulation of ATP turnover induced by growth factors, *Exp. Cell Res.*, **158**: 311–320, 1985.
[97] TALHA S., HAREL L., Early effects of growth factors (EGF + insulin) upon ATP-turnover in 3T3 cells. Inhibition by cytochalasin B and D. *Exp. Cell Res.*, **163**: 261–265, 1986.
[98] TILLMANN U., BEREITER-HAHN J., Relation of actin fibrils to energy metabolism of endothelial cells, *Cell Tissue Res.*, **243**: 579–585, 1986.
[99] TODARO G. J., LAZAR G. K., GREEN H., The initiation of cell division in a contact inhibited mammalian cell line, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **66**: 325–334, 1965.
[100] VASILIEV J. M., Spreading of non-transformed and transformed cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **780**: 21–65, 1985.
[101] VENROOIJ W. J. van, SILLEKENS P. T. G., EEKELEN C. A. G., REINDERS R. J., On the association of mRNA with the cytoskeleton in uninfected and adenovirus-infected human KB cells, *Exp. Cell Res.*, **135**: 79–91, 1981.

http://rcin.org.pl

[102] VILLEREAL M. L., OWEN N. E., The involvement of Ca^{2+} in the serum stimulation of Na^{+}influx in human fibroblasts, [w] Ions, Cell Proliferation, and Cancer, A. L., Boynton, W. L. McKeehan i J. F. Whitfield (red.), Acad. Press New York-London, str. 341–357, 1982.
[103] WAGNER K. G., ERDMANN H., HEIM S., MEYER R., On the growth cycle of suspension cultured plant cells. *Eur. J. Cell Biol.*, suppl 9: 29, 1985.
[104] WALSH T. P., CLARKE F. M., MASTERS C. J., Modification of the kinetic parameters of aldolase on binding to the actin-containing filaments of skeletal muscle, *Biochem. J.*, **165**: 165–167, 1977.
[105] WESTERMARK B., BLOMQUIST E., Stimulation of fibroblast migration by epidermal growth factor, *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**: 649–654, 1980.
[106] WILLINGHAM M. C., YAMADA K. M., YAMADA S. S., POUYSSEGUR J., PASTAN I., Microfilament bundles and cell shape are related to the adhesiveness to substratum and are dissociable from growth control in cultured fibroblasts, *Cell*, **10**: 375–380, 1977.
[107] XEROS N., Deoxyriboside control and synchronization of mitosis, *Nature*, **194**: 682–683, 1962.
[108] YIN H. L., STOSSEL T. P., Purification and properties of gelsolin, a Ca^{2+}-activated regulatory protein of macrophages, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9490–9493, 1980.
[109] YIN H. L., ZANER K. S., STOSSEL T. P., Ca^{2+} control of actin gelation, *J. Biol. Chem.*, **255**: 9494–9500, 1980.
[110] ZAPOROWSKA-SIWIAK E., MICHALIK M., KAJSTURA J., KOROHODA W., Density-dependent survival of Ehrlich ascites tumour cells in the presence of various substrates for energy metabolism, *J. Cell Sci.* **77**: 75–85, 1985.

Otrzymano: 9 maja 1989
Przyjęto: 14 września 1989
Adres autora: Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

http://rcin.org.pl

WSPÓŁCZESNE POGLĄDY NA WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK NERWOWYCH I GLEJOWYCH HODOWANYCH IN VITRO

NEW INSIGHTS INTO THE BIOLOGY OF NEURONS AND GLIAL CELLS IN TISSUE CULTURE IN VITRO

Anna BAL-KLARA[1] i Józef KAŁUŻA[2]

[1]Instytut Farmakologii PAN, Kraków, [2]Pracownia Neuropatologii, Instytut Neurologii AM, Kraków

Streszczenie. W ostatnich latach został dokonany znaczny postęp w hodowli tkankowej i komórkowej. Hodowla tkanki nerwowej stała się ważnym narzędziem w badaniach neurobiologicznych. Omówione są tu badania in vitro obejmujące morfologię, biochemię i elektrofizjologię tkanki nerwowej hodowanej w warunkach in vitro. Autorzy opisują również współczesne metody stosowane w badaniach in vitro łącznie z kokulturami, które są modelami odzwierciedlającymi do pewnego stopnia funkcjonalne zależności pomiędzy różnymi strukturami. Ponieważ możliwy jest rozdział neuronów i różnych typów komórek glejowych, hodowle komórek glejowych umożliwiły bliższy wgląd w biologię gleju. Omówiono występowanie receptorów na neuronach i komórkach glejowych, a także ich rolę fizjologiczną. Opierając się na przytoczonych doświadczeniach można wnioskować, że neurony i komórki glejowe wykazują podobne cechy strukturalne i funkcjonalne in vitro, jak i in vivo.

Summary. Since the significant progress in cell and tissue culture has been done during the last years the nervous tissue culture has become an important tool in neurobiological research. Experimental studies in vitro involving morphology, biochemistry and electrophysiology of the nervous tissue in culture are discussed here. The authors describe the modern methods used in in vitro studies including the co-cultures which are the models reflecting to some degree the functional relationship between the different structures. It is possible to select neurons and the different classes of glial cells for culture purposes. Cell culture of the different populations of glial cells has given new insights into their biology. This review has focused on transmitter receptors on neurons and glial cells in primary cultures and their functional role. Based on the quoted investigations it can be concluded that the neurons and glial cells show similar structural and functional properties in vitro like those observed in vivo.

http://rcin.org.pl

WPROWADZENIE

Hodowla komórek in vitro stwarza dogodne warunki do obserwacji zachowania się komórek w układach pozaustrojowych. Równocześnie nasuwa się pytanie, czy dojrzewanie komórek nerwowych i glejowych przebiega pod względem morfologicznym, biochemicznym i funkcjonalnym w warunkach in vitro w sposób podobny jak in vivo. Wiele badań, które wykonano, dotyczy korelacji pomiędzy właściwościami morfologicznymi, elektrofizjologicznymi i biochemicznymi charakteryzującymi komórki in vitro, a tymi samymi właściwościami tkanki nerwowej in vivo.

Morfologia i ultrastruktura są bardzo ważnym kryterium oceny stanu funkcjonalnego komórki. Już po 8 dniach hodowania tkanki nerwowej, komórki skupione w agregatach tworzą wypustki; aksony i dendryty, które skupiają się w grube wiązki. Po 2 tygodniach agregaty te połączą się z sobą nawzajem siecią wypustek (rys. 1A). Pewna część komórek pozostaje jednak w hodowli w postaci pojedynczych neuronów również poza agregatami komórkowymi (rys. 1B). Obserwowane w mikroskopie świetlnym komórki wykazują duże podobieństwo do siebie i trudno jest odróżnić czasami komórkę nerwową od komórek glejowych. Dotyczy to zwłaszcza początkowego okresu rozwoju w hodowli. Pomocnym może być mikroskop elektronowy, w którym neurony wykazują charakterystyczną budowę, co pozwala łatwo odróżnić je od innych komórek. W wyraźnie widocznym jądrze chromatyna jest równocześnie rozmieszczona. Organele komórkowe, a mianowicie cysterny aparatu Golgiego, mitochondria, lizosomy wtórne (lizosomy pierwotne są trudne do rozpoznania), siateczka śródplazmatyczna ziarnista, rybosomy wolne wykazują typową budowę. Co jednak odróżnia komórki nerwowe od innych komórek to obecność neurofilamentów i mikrotubul. Są one rozmieszczone w włóknach osiowych w postaci równolegle przebiegających struktur.

Dendryty cechuje zmniejszona ilość organeli komórkowych w plazmie i delikatniejsza struktura mikrotubul, co różni je od włókna osiowego. Inną ważną właściwością komórek nerwowych w warunkach in vitro jest tworzenie synaps, które powstają po 8 dniach hodowli. W części presynaptycznej obserwuje się pęcherzyki synaptyczne. Podobnie jak in vivo w warunkach in vitro powstają dwa rodzaje synaps: symetryczne i asymetryczne. W synapsach asymetrycznych widać wyraźną impregnację materiałem elektronowogęstym błony pre- i postsynaptycznej (rys. 1C). W synapsach symetrycznych materiał elektronowogęsty rozmieszczony jest na powierzchni błony pre- i postsynaptycznej, a także w szczelinie synaptycznej. Zakłada się, że synapsy asymetryczne mają charakter pobudzający, a symetryczne hamujący. Podobnie jak in vivo synapsy tworzone są na perikarionach, dendrytach i aksonach (synapsy akso-somatyczne, akso-dendrytyczne i akso-aksonalne). W hodowli podobnie jak in vivo zachodzi zjawisko internalizacji błony pre- i postsynaptycznej, w wyniku czego powstają tzw. pęcherzyki opłaszczone (*coated vesicles*). Tworzą się one w procesie inwaginacji błony. W części presynaptycznej opłaszczone pęcherzyki są ponownie wykorzystywane w procesie tworzenia pęcherzyków synaptycznych, a w części postsynaptycznej wzmożony proces tworzenia się opłaszczonych pęcherzyków związany jest ze zjawiskiem *down* regulacji receptorów zlokalizowanych na błonie postsynaptycznej (rys. 1D).

Również komórki glejowe można łatwo odróżnić od komórek nerwowych w mikroskopie elektronowym. Charakterystyczną cechą astrocytów jest nierównomiernie rozmiesz-

http://rcin.org.pl

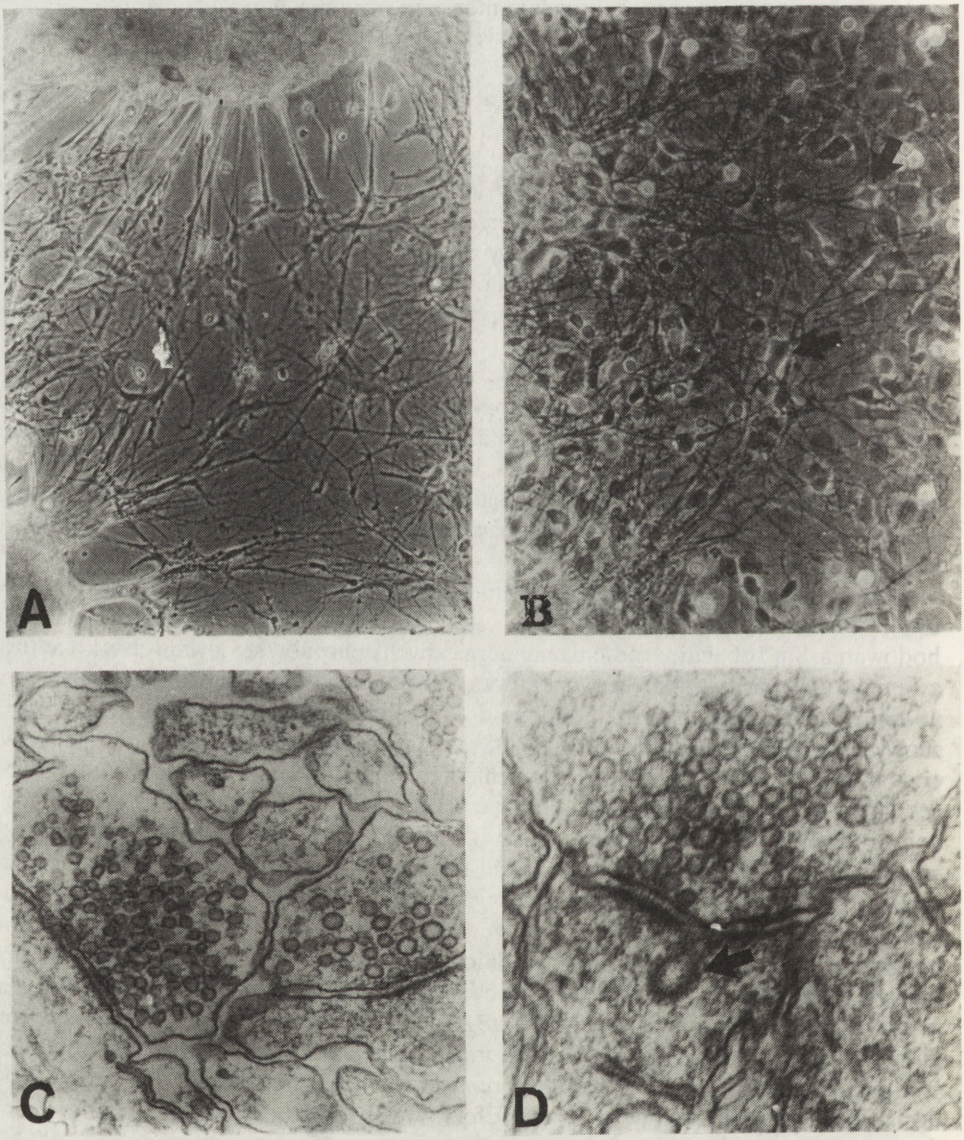
czona chromatyna w jądrze, zaś w cytoplazmie oprócz organelli komórkowych obecne są włókienka glejowe (rys. 2A), których wygląd morfologiczny pozwala je odróżnić od mikrotubul i neurofilamentów typowych dla neuronów (rys. 2B). Drugi typ komórek glejowych, oligodendrocyty (rys. 2C) wytwarzają osłonkę mielinową wokół aksonów, co świadczy o zachowaniu prawidłowej funkcji tych komórek w warunkach in vitro. Można zatem powiedzieć, że morfologia komórek nerwowych i glejowych w warunkach in vitro i in vivo jest bardzo zbliżona.

Nowym kierunkiem rozwoju badań są próby odtworzenia struktur układów funkcjonalnych mózgu in vitro. Próby te polegają na hodowli dwóch różnych struktur i stworzeniu warunków do rekonstrukcji połączeń między tymi strukturami podobnych do tych, które istnieją in vivo. Są to tzw. kokultury. W kokulturach można odtworzyć np. połączenia pomiędzy eksplantatem hipokampa i przegrody, między siatkówką i nakrywką, istotą czarną a prążkowiem czy miejscem sinawym a korą. Hodowla kokultur jest ilustracją dużej złożoności układu doświadczalnego poza ustrojem, bowiem dotyczy utrzymania przy życiu nie tylko pojedynczych komórek lub grup komórek tego samego typu, lecz także odtwarzania układów czynnościowych.

Oprócz weryfikacji morfologicznej hodowli można przeprowadzać również weryfikację biochemiczną, elektrofizjologiczną i farmakologiczną. Potrzeba elektrofizjologicznej weryfikacji hodowli tkanki nerwowej pojawiła się zaraz na początku badań, kiedy to Harrison [5] obserwował kurczenie się miocytów hodowanych razem w kokulturze z rdzeniem kręgowym. Doświadczenia alektrofizjologiczne w tych badaniach były konieczne, ponieważ pozwoliły ocenić, w jakim stopniu rozwinęły się neuromięśniowe połączenia w warunkach in vitro.

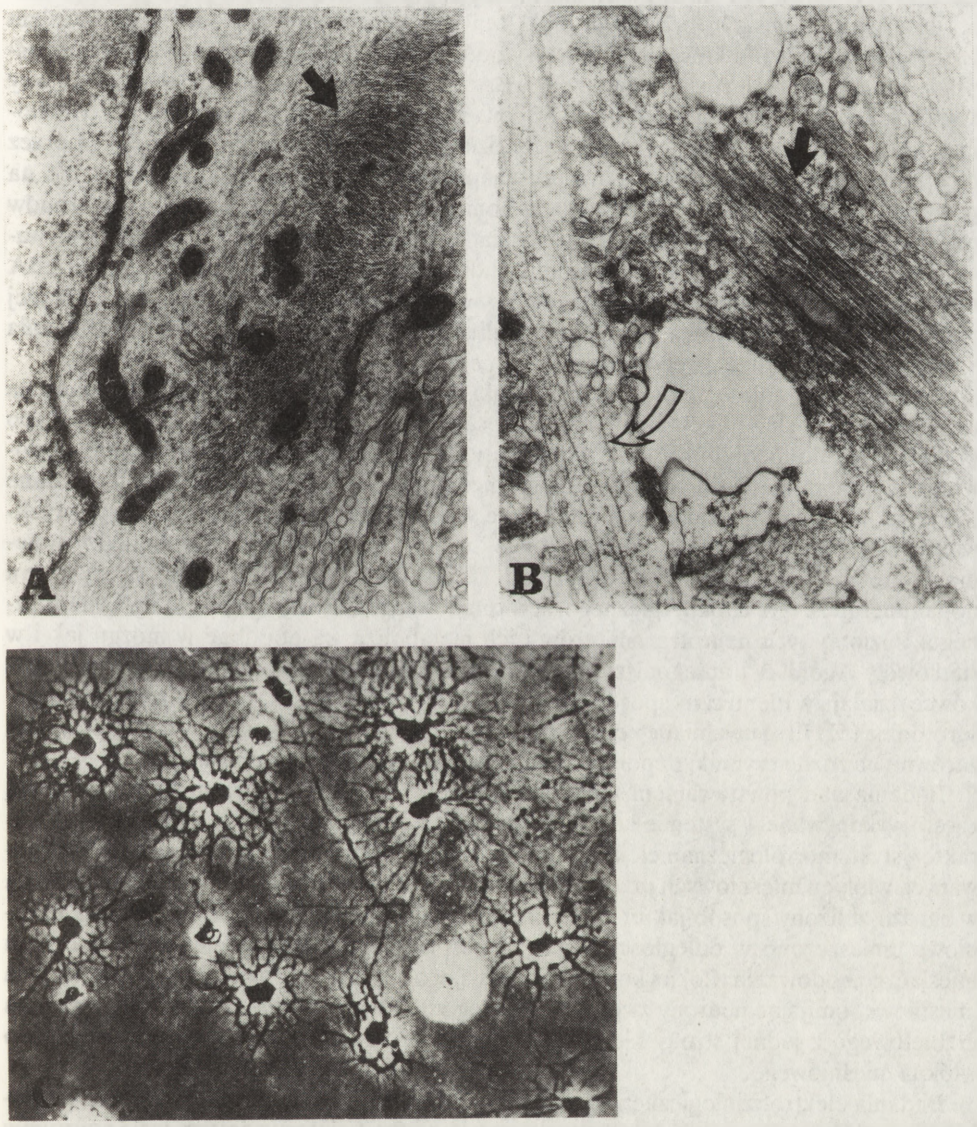
W poszukiwaniu modelu doświadczalnego połączeń nerwowo-mięśniowych zwrócono uwagę na komórki nerwowe siatkówki oka, która jest względnie łatwa do pobrania i hodowania. Stąd obecnie źródłem cholinergicznych neuronów stosowanych w kokulturach z komórkami mięśniowymi jest siatkówka, której zawiesinę komórkową pochodzącą z 10-dniowych zarodków kurzych dodano do uprzednio założonej hodowli komórek mięśniowych co najmniej 7-dniowej [26]. Po 48 godz. wykonywano zapisy przy pomocy wewnątrzkomórkowej elektrody. W kokulturach o względnie niskiej gęstości komórek siatkówki jedna komórka mięśniowa była unerwiona przez jedną komórkę nerwową. W hodowli tej rejestrowano uwalnianie acetylocholiny (Ach) z pojedynczych synaps utworzonych pomiędzy neuronami siatkówki a włóknami mięśniowymi, które stanowiły w tym układzie część postsynaptyczną dla tych cholinergicznych neuronów siatkówki. Zapisywanie postsynaptycznej odpowiedzi udowodniło, że neurony siatkówki pochodzenia zarodkowego mogą tworzyć synapsy z komórkami mięśniowymi, które po pewnym czasie w hodowli miały dużą gęstość cholinergicznych receptorów. Model takiej kokultury posłużył do badania wpływu kwasu γ-aminomasłowego (GABA) i jej agonistów na spontaniczną aktywność komórek nerwowych. Dodanie GABA miało w 80% hamujący wpływ na spontaniczną synaptyczną aktywność neuronów, które tworzyły synapsy z komórkami mięśniowymi. Muscimol i glicyna działały podobnie. Efekt wywoływany przez GABA był odwracalnie blokowany przez bikukulinę (względnie specyficzny antagonista receptorów GABA). W doświadczeniach tych wykazano także, że zwiększone uwalnianie acetylocholiny pod wpływem kwasu glutaminowego, które było odwracalnie blokowane przez dietyloester kwasu glutaminowego (selektywny antagonista receptorów glutaminergicznych). Zjawisko to było również odwracalnie blokowane przez zmniejszoną zawartość jonów wapnia w śro-

http://rcin.org.pl



Rys. 1. Dwutygodniowa hodowla kory mózgowej pobrana z 18-dniowych embrionów szczura: A – utworzone agregaty komórkowe łączą się siecią wypustek (pow. x 150); B – pojedyncze neurony często zlokalizowane są na zewnątrz agregatów (pow. x 250); C – synapsy asymetryczne w komórkach kory hodowanych in vitro (E. M., pow. x 35000); D – tworzenie się opłaszczonego pęcherzyka poprzez inwaginacje błony postsynaptycznej synapsy symetrycznej (E. M., pow. x 40000)

http://rcin.org.pl



Rys. 2. Dwutygodniowa hodowla kory mózgowej pobrana z 18-dniowych embrionów szczura: A – gliofibryle w cytoplazmie astrocyta (E. M., pow. x 15000); B – gliofibryle w wypustce astrocyta (pełna czarna strzałka) i delikatna sieć mikrotubul w aksonie (pusta czarna strzałka) (E. M., pow. x 25000); C – wzbogacona hodowla oligodendrocytów przygotowana z mózgu 10-dniowego szczura (pow. x 400)

http://rcin.org.pl

dowisku, co stanowi dowód na zależność neurotransmisji w synapsach od jonów wapnia. Ponieważ receptory benzodwuazepinowe są ściśle powiązane z receptorami GABA, badano wpływ benzodwuazepin na hamowanie transmisji w synapsach komórek nerwowych siatkówki i mięśni [1]. Przed podaniem GABA hodowle inkubowano z flurazepamem. Związek ten potęgował bardzo wyraźnie hamujący wpływ GABA na cholinergiczną transmisję w tych synapsach, przy czym efekt ten był długotrwały, ale odwracalny. Celem bliższego poznania, na którą część synapsy oddziałuje GABA, wykonano kontrolne doświadczenia, w których stwierdzono, że GABA nie ma wpływu na potencjał spoczynkowy komórek mięśniowych ani nie zmienia odpowiedzi komórek mięśniowych na acetylocholinę. W związku z tym przyjęto, że GABA oddziałuje na cholinergiczną transmisję poprzez receptory GABA zlokalizowane na presynaptycznych neuronach siatkówki, a nie na postsynaptyczne komórki mięśniowe. Za homogennością badanej populacji neuronów cholinergicznych przemawia fakt, że w 91% siatkówkowo-mięśniowych synaps otrzymywano identyczny wynik w postaci hamowania cholinergicznej transmisji po podaniu GABA oraz nasilenie uwalniania ACh po stymulującym działaniu kwasu glutaminowego. Z wyżej przytoczonych badań wynika, że system kokultur jest modelem odpowiednim dla badania wpływu GABA na funkcje cholinergicznych neuronów siatkówki.

U kręgowców (płazy, gady i niektóre ssaki, np. króliki) siatkówka jest odżywiana na zasadzie dyfuzji składników odżywczych z przyległych naczyń włosowatych, dlatego po przeniesieniu do medium warunki, w jakich się znajduje, przypominają naturalne środowisko, w którym bytuje in vivo. Morfologiczne, metaboliczne i elektrofizjologiczne dane wskazują, że izolowana siatkówka zachowuje właściwości fizjologiczne, łącznie z wrażliwością na światło. Udowodniono, że istnieje duże prawdopodobieństwo pomiędzy systemami neurotransmisyjnymi w mózgu i siatkówce [23]. Dotyczy to systemu dopaminergicznego, cholinergicznego, serotoninowego, GABAergicznego i glicynergicznego. Poziomy tych neurotransmiterów i ich metabolizm są podobne w mózgu jak i w siatkówce. Agoniści i antagoniści wymienionych neurotransmiterów w izolowanej siatkówce działają w identyczny sposób jak w mózgu. Dopamina (DA), ACh, GABA, glicyna, serotonina (5HT) są uwalniane z części presynaptycznej neuronów siatkówki w odpowiedzi zarówno na różne czynniki depolaryzacyjne, jak i na specyficzne substancje.

Badania nad powstawaniem funkcjonalnej neurotransmisji w warunkach in vitro są często wykonywane w systemie kokultur rdzenia kręgowego i mięśni prążkowanych. Charakterystyka morfologiczna i elektrofizjologiczna hodowli wykazała, że unerwienie izolowanych włókien mięśniowych przez włókna korzeni nerwów rdzenia kręgowego przebiega w bardzo zbliżony sposób jak in vivo [3]. Pierwotnie, zakładając hodowle, włókna mięśniowe umieszczono w odległości 1 mm od eksplantatu rdzenia kręgowego. Po dwóch miesiącach hodowania włókna korzonka brzusznego rdzenia kręgowego unerwiają włókna mięśniowe, omijając neurony zwoju korzonka grzbietowego. Włókna ze zwoju korzonka grzbietowego z jednej strony biegną do rogu tylnego rdzenia kręgowego, z drugiej do włókna mięśniowego.

Badania elektrofizjologiczne wykazały dobrą korelację pomiędzy morfologiczną organizacją a właściwościami bioelektrycznymi tych kokultur. Selektywna stymulacja neuronów ruchowych przedniego rogu rdzenia kręgowego powodowała widzialny gołym okiem skurcz włókien mięśniowych. Potencjały czynnościowe mięśni rejestrowano wewnątrzkomórkowymi mikroelektrodami i występowały one z kilku milisekundowym okresem latencji w stosunku do wyładowań, jakie rejestrowano w rdzeniu. Efekt d-tubokuraryny i eseryny

http://rcin.org.pl

na bioelektryczną aktywność mięśniowo-rdzeniowych kokultur wskazywał, że neuromięśniowa transmisja jest mediowana przez synapsy cholinergiczne. Podanie do medium d-tubokuraryny (0,3–10 μg/ml) (bloker receptorów cholinergicznych) powodowało natychmiastowe zahamowanie skurczu włókna mięśniowego, natomiast nie wpływała ona na wyładowania elektryczne rejestrowane z rdzenia. Podanie eseryny (antycholinesterazowy związek) wpływało pobudzająco na włókna mięśniowe. Podobne efekty uzyskano podając strychninę. Badania te udowodniły, że neurony rdzenia kręgowego w warunkach in vitro tworzą pełnosprawne połączenia nerwów z mięśniami szkieletowymi.

Model opisany powyżej jest często stosowany w badaniach zjawiska atrofii mięśni na wskutek denerwacji, którą łatwo wykonać przecinając połączenie pomiędzy tymi dwoma kokulturami. Oprócz hodowli rdzenia kręgowego można hodować różne struktury mózgu, które w zależności od potrzeb możemy hodować samodzielnie albo w odpowiednich kokulturach. Na przykład hodowla interneuronów GABAergicznych i komórek ziarnistych móżdżku służy do badania układu GABAergicznego i glutaminergicznego. Hodowla miejsca sinawego i kory może być modelem do badania układu noradrenergicznego a hodowla istoty czarnej i prążkowia do badania układu dopaminowego.

Oceniając właściwości komórek nerwowych istoty czarnej przeprowadzono doświadczenia na hodowli istoty czarnej oraz na hodowli istoty czarnej w kokulturze z tkanką prążkowia [25]. Po dwóch tygodniach hodowania neurony istoty czarnej miały potencjał spoczynkowy -42 do -78 mV. Potencjał czynnościowy wywoływano poprzez wewnątrzkomórkową depolaryzację. Amplituda EPSPs (postsynaptyczny potencjał pobudzający) i IPSPs (postsynaptyczny potencjał hamujący) zależała od wyjściowego potencjału spoczynkowego. Komórki nerwowe istoty czarnej wykazywały wrażliwość w stosunku do antagonistów różnych receptorów. Haloperidol (bloker receptorów dopaminowych) podany do środowiska powodował depolaryzację i blokował EPSPs, podobnie działał nalokson. Bukukulina blokowała IPSPs. Atropina nie zmieniała spontanicznej aktywności tych neuronów, a blokowała synaptyczną aktywność spowodowaną jontoforetycznymi podaniami acetylocholiny.

Często neurony istoty czarnej są hodowane z neuronami prążkowia jako kokultury i wykorzystywane do badania układu dopaminowego [31]. Po 3 tygodniach trwania takiej kokultury obserwowano spontaniczne uwalnianie dopaminy. Zwiększone uwalnianie dopaminy pojawiło się w odpowiedzi na inkubację w depolaryzującym środowisku zawierającym 50-milimolowy roztwór jonów K^+. Uwalnianie to było zależne od jonów wapnia. Substancja P i amfetamina także zwiększały uwalnianie dopaminy. TTX (tetrotoxyna, blokująca kanały Na^+) hamowała spontaniczne uwalnianie DA. Te obserwacje sugerują, że neurony zachowały swoją aktywność podobną do posiadanej in vivo.

Celem zbadania, jak ważna jest obecność struktury docelowej in vitro dla rozwoju neuronów dopaminowych istoty czarnej i obszaru brzusznego nakrywki, hodowano te struktury w obecności striatum lub kory frontalnej [30]. Pomiary uwalnianej dopaminy poprzedzono najpierw inkubacją ze znakowaną dopaminą. Po wielokrotnych płukaniach i ustabilizowaniu się spontanicznego uwalniania DA, hodowle inkubowano przez 8 min w depolaryzacyjnym środowisku (50 mM K^+). Inkubacja ta powodowała zwiększone uwalnianie DA z kokultur brzusznego obszaru nakrywki i kory czołowej, a zmniejszone uwalnianie obserwowano w hodowli istoty czarnej i prążkowia. Kiedy hodowle inkubowano w buforze, w którym $CaCl_2$ zastąpiono $CoCl_2$, uwalnianie dopaminy stymulowane 50 mM K^+ zostało zahamowane w 78% w obydwu typach kokultur.

http://rcin.org.pl

Komórki istoty czarnej hodowane z korą czołową uwalniały więcej dopaminy w odpowiedzi na 50 mM K^+ stymulację niż w hodowli z prążkowaniem. Zjawisko to tłumaczono obecnością w szlaku nigrostriatalnym autoreceptorów DA, które przez *feedback* mogły hamować uwalnianie DA. Projekcja mezokortykalna z obszaru brzusznego nakrywki nie ma takich autoreceptorów. Być może to decyduje o zróżnicowanym uwalnianiu DA z tych kokultur. Obecność prążkowia i kory czołowej jako docelowych struktur odpowiednio dla istoty czarnej i brzusznego obszaru nakrywki nasilała spontaniczną aktywność neuronów DA w istocie czarnej i brzusznego obszaru nakrywki i nasilała wrażliwość tych neuronów na TTX.

Badania te dowiodły, że neurony dopaminowe substancji czarnej i brzusznego obszaru nakrywki in vitro zachowują spontaniczną aktywność, odpowiadają w podobny sposób jak neurony in vivo na substancje stymulujące i hamujące.

Obecność docelowych struktur w hodowli, do których badane neutrony wysyłają swoje wypustki (dendryty i aksony), wpływa na dojrzałość morfologiczną tych neuronów. Prawidłowo wykształcone aksony neuronów DA istoty czarnej rozwijały się tylko w obecności prążkowia. Samodzielnie hodowane neurony istoty czarnej tworzyły aksony niedorozwinięte, krótkie, grube, podobne do dendrytów. Obecność w hodowli komórek ze striatum przedłuża znacznie żywotność komórek dopaminowych z substancji czarnej (4 x więcej przeżyło komórek dopaminowych istoty czarnej hodowanej razem z prążkowiem w porównaniu do hodowli tylko istoty czarnej). Na komórkach nerwowych w hodowli in vitro stwierdzono obecność wszystkich tych typów receptorów, które występują w mózgu in vivo. Opisano obecność receptorów adrenergicznych, dopaminowych, serotoninowych, histaminowych, glutaminergicznych, adenozynowych, GABAergicznych. Pod względem elektrofizjologicznym i biochemicznym, odpowiedź tych receptorów na zastosowanie klasycznych agonistów i antagonistów jest taka sama jak w warunkach in vivo.

HODOWLE KOMÓREK GLEJOWYCH

Badania przeprowadzone na hodowli komórek glejowych zwróciły większą uwagę na rolę gleju w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego sugerując, że glej pełni bardziej złożoną funkcję niż do tej pory zakładano. Obecnie możliwy jest bardzo dokładny rozdział komórek glejowych na populacje astrocytów i oligodendrocytów in vitro, dlatego możemy określić dość dokładnie właściwości tych dwóch typów komórek [20]. Zastosowanie odpowiednich reakcji immunocytochemicznych pozwala identyfikować poszczególne typy komórek glejowych. Przeciwciała przeciwko GFAP (kwaśne białko włókienkowe astrocytów) i syntezie glutaminowej pozwalają zidentyfikować astrocyty, natomiast przeciwko MBP (zasadowe białko mieliny) identyfikują oligodendrocyty.

Wiele badań [6, 10, 28] sugeruje, że komórki glejowe mogą modulować pobudliwość neuronów poprzez akumulowanie i metabolizowanie neurotransmiterów i aktywnych aminokwasów. Wzbogacone hodowle oligodendrocytów bardzo intensywnie gromadziły GABA [29], a w bardzo niskich stężeniach kwas glutaminowy i asparaginowy [28]. Hodowle astrocytów natomiast wchłaniały duże ilości wyżej wymienionych aminokwasów, a bardzo niechętnie gromadziły GABA. Jak z tego wynika, poszczególne rodzaje gleju różnią się od siebie ilością wchłaniania poszczególnych substancji. Podstawowym mechanizmem

http://rcin.org.pl

unieczynniania GABA jest *reuptake* do zakończeń presynaptycznych neuronów. Pomocne mogą tutaj być oligodendrocyty, które akumulując GABA usuwają ten neurotransmiter ze szczeliny synaptycznej. Wchłanianie aminokwasów pobudzających, kwasu glutaminowego i asparaginowego przez astrocyty odzwierciedla szybkość, z jaką te aminokwasy są uwalniane z neuronów do przestrzeni synaptycznej. Upośledzone wchłanianie aminokwasów przez astrocyty, zlokalizowane w pobliżu zakończeń, może zmieniać stężenie i czas działania tych aminokwasów w przestrzeni synaptycznej. Inna jest rola oligodendrocytów satelitarnych, które umiejscowione są w warunkach in vivo wokół poszczególnych komórek nerwowych. Polega ona prawdopodobnie na redukcji stężenia aminokwasów w pobliżu ciał komórkowych, a także wokół aksonu. Wskazuje na to fakt, że morfologicznej i biochemicznej dojrzałości komórek glejowych towarzyszą równoległe zmiany w zawartości poszczególnych aminokwasów, które po 2 tygodniach hodowania osiągają stężenie na poziomie wartości in vivo. Pobieranie różnych neurotransmiterów przez komórki zarówno nerwowe, jak i glejowe w hodowli in vitro zostało opisane już w 1977 roku przez Kałużę i współpracowników [16]. Kimelberg [18] wykazał, że hodowle pierwotne astrocytów, pochodzących z różnych struktur mózgowych, wykazują zróżnicowaną zdolność do wchłaniania różnych monoamin w zależności od struktury, z której astrocyty pochodzą i jakim neuronom służą. Noradrenalina była najchętniej wchłaniana przez hodowle astrocytów izolowanych z kory, w mniejszym stopniu przez strocyty striatalne. Serotonina natomiast była gromadzona w najwyższym stężeniu przez astrocyty pochodzące ze striatum, w mniejszym stopniu przez astrocyty pobrane z kory czy hipokampa. Badania biochemiczne, autoradiograficzne i elektrofizjologiczne hodowanych komórek glejowych udowodniły obecność różnych typów receptorów na astrocytach i oligodendrocytach. Spośród prac dotyczących receptorów astrocytów duża część została wykonana na linii komórkowej wyprowadzonej z guza glejowego oznaczonego symbolem C6. Jest bardzo prawdopodobne, że duża część informacji uzyskana w badaniach nad tymi komórkami dotycząca receptorów adrenergicznych może mieć odniesienie do czynności prawidłowych astrocytów. W linii komórkowej C6 natomiast stwierdzono między innymi wzrost cAMP po dodaniu katecholamin, histaminy i adenozyny [24]. Tę zdolność reagowania astrocytów w hodowli in vitro na różne substancje dodawane do środowiska hodowlanego wykorzystano do badania ich właściwości czynnościowych. Wiele badań receptorowych wykonano na hybrydach komórkowych C6TK, uzyskanych w wyniku połączenia komórek guza wywodzącego się z komórek nerwowych (neuroblastoma) i glejaka akumulującego cAMP [22]. Hybrydy te posłużyły do określenia udziału receptorów adrenergicznych w formowaniu w astrocytach różnych białek i enzymów na przykładzie dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Stwierdzono, że swoista aktywność LDH jest dwukrotnie wyższa, gdy dodano L-noradrenalinę do środowiska hodowlanego komórek linii C6TK. Nie stwierdzono natomiast tego zjawiska w hodowlach komórek nieglejowych.

W komórkach glejowych in vitro opisano ponadto obecność licznych receptorów między innymi adrenergicznych alfa i beta [1, 7], serotoninowych $5HT_1$ i $5HT_2$ [12], dopaminowych D_1 i D_2 [11], histaminowych H_1 i H_2 [14], muskarynowych [27], adenozynowych [13], benzodwuazepinowych [2]. Spośród receptorów adrenergicznych beta, astrocyty mają przede wszystkim receptory typu $beta_1$ w przeciwieństwie do hodowanych neuronów, na których opisano obecność głównie receptorów typu $beta_2$. W jaki sposób receptory zlokalizowane na astrocytach reagują na podane do środowiska różne egzogeniczne neurotransmitery i inne substancje, pokazują badania elektrofizjologiczne.

http://rcin.org.pl

Dodanie NA lub fenylefryny (agonista receptorów alfa adrenergicznych) w stężeniu 10^{-7} M do hodowli astrocytów z kory wywoływało depolaryzację tych komórek [11]. Depolaryzacja była odwracalnie blokowana przez fentolaminę (10^{-6} M). Działanie beta agonisty izoproterenolu w hodowli astrocytów w stężeniu 10^{-7} M wywoływało hiperpolaryzację, a stężenie 10^{-5} M wywoływało polaryzację. Beta antagonista (atenolol), który nie wpływał na depolaryzację wywołaną NA i fenylefryną, blokował hiperpolaryzację wywołaną izoproterenolem. Ponieważ oba efekty, tzn. depolaryzacja wywołana NA i hiperpolaryzacja wywołana izoproterenolem, występowały na tych samych komórkach, Hösli sugeruje, że alfa i beta receptory adrenergiczne występują na tych samych astrocytach. Obecność receptorów histaminowych stwierdzono w badaniach elektrofizjologicznych i autoradiograficznych w hodowli astrocytów, pochodzących z móżdżku, pnia mózgowego i rdzenia kręgowego, ze struktur, w których to histamina mogłaby działać jako neurotransmiter lub jako neuromodulator [11].

Histamina w stężeniu 10^{-4} M powodowała depolaryzację astrocytów, stężenie 10^{-5} M wywoływało zarówno efekt depolaryzacji, jak i hiperpolaryzację, a w stężeniu 10^{-6} M histamina wywoływała tylko hiperpolaryzację. Pyrylamina (H_1 antagonista) głównie blokowała depolaryzację, a H_2 antagonista, cimetydyna, odwracalnie blokowała hiperpolaryzację. Sugeruje to, że depolaryzacja została wywołana stymulacją receptorów H_1, a hipopolaryzacja była mediowana przez receptory H_2. Istnienie receptorów H_1 i H_2 udowodniono także autoradiograficznie [12]. Receptory dopaminowe zlokalizowano na astrocytach również w badaniach elektrofizjologicznych i autoradiograficznych [11]. Okazało się bowiem, że podanie dopaminy lub jej agonisty apomorfiny w stężeniu 10^{-5} M lub 10^{-6} M powodowało hiperpolaryzację większości badanych astrocytów. Cis-flupenthixol (10^{-6} M) blokował hiperpolaryzację wywołaną dopaminą na wszystkich astrocytach. Celem wykluczenia wpływu dopaminy na receptory adrenergiczne i receptory serotoninowe, środowisko zawierało także alfa i beta antagonistów jak fentolaminę i atenolol, a także antagonistę serotoniny ketanserynę. Antagoniści ci nie wpływali na hiperpolaryzację wywołaną dopaminą, co świadczy, że dopamina specyficznie aktywowała receptory dopaminowe i nie interferowała z innymi monoaminowymi receptorami. W badaniach autoradiograficznych receptory dopaminowe zróżnicowano na typ D_1 i D_2. Wykazano mianowicie wiązanie przez astrocyty znakowanego spiperonu (antagonista receptorów typu D_2) i wiązanie znakowanego cis-flupenthixolu (uznanego antagonisty receptorów D_1). W hodowli astrocytów opisano także obecność receptorów serotoninowych [11]. Serotonina 10^{-5} M wywoływała hiperpolaryzację większości testowanych astrocytów. Dodanie ketanseryny (antagonista serotoniny) do środowiska blokowało stan hiperpolaryzacji. Ponieważ działanie serotoniny nie było znoszone przez antagonistów dopaminy i adrenaliny, a blokowane przez ketanserynę, wydaje się, że serotonina działała specyficznie poprzez receptory serotoninowe. Obecność receptorów serotoninowych w pierwotnej hodowli astrocytów udowodniono także autoradiograficznie. W hodowli komórek glejowych wyróżnicowano receptory typu 5-HT_1 i 5-HT_2, ale mało jest informacji na temat różnych podtypów tych receptorów. Receptory cholinergiczne w hodowli tkanki nerwowej wykryto w doświadczeniach, w których ligand muskarynowy QNB (*quinuclidinyl benzilate*) wiązał się z wysokim powinowactwem zarówno do hodowli neuronów, jak i astrocytów. Wiązanie do błon astrocytów jest całkowicie blokowane przez atropinę, a słabo przez nikotynę, co potwierdza muskarynowy charakter tych receptorów [27].

http://rcin.org.pl

Hodowla pierwotna astrocytów i neuronów okazała się być dobrym narzędziem do badania reakcji receptorów na różne podane z zewnątrz do środowiska leki. Ponieważ udowodniono istnienie na astrocytach różnego typu receptorów, Hertz i Richardson [8, 9] badali wpływ leków przeciwdepresyjnych na receptory adrenergiczne. Przewlekła (ale nie krótkotrwała) ekspozycja hodowli astrocytów na działanie amitriptyliny, dezipraminy lub tranylcyprominy (inhibitor MAO) powodowała obniżenie akumulacji cAMP stymulowanej isoproterenolem, a także prowadziła do "*down*" regulacji receptorów beta adrenergicznych [4]. Wyniki te sugerują, że leki przeciwdepresyjne przynajmniej częściowo działają jako agoniści receptorów adrenergicznych beta umiejscowionych na astrocytach i że beta "*down*" regulacja obserwowana in vivo po przewlekłym podawaniu leków przeciwdepresyjnych w dużym stopniu dotyczy receptorów zlokalizowanych na astrocytach. Autoradiograficznie udowodniono, że 2-tygodniowa inkubacja hodowli astrocytów z 1 μM stężeniem amitriptyliny prowadziła do zahamowania wchłaniania NA [19] i dopaminy [32].

Z wyżej przytoczonych badań biochemicznych, elektrofizjologicznych i farmakologicznych wynika, że odpowiedź hodowli komórek nerwowych i glejowych na specyficzne substancje jest podobna jak w warunkach in vivo. Pomimo że środowisko, w którym znajduje się hodowla, jest całkowicie sztuczne, hodowana tkanka nerwowa w dużym stopniu zachowuje prawidłową funkcję. Dużą zaletą hodowli jest możliwość wykonywania doświadczeń na bardzo prostym modelu, jakim jest pojedyncza komórka, a także możliwość wzbogacenia układu doświadczalnego poprzez eksplantat czy hodowanie kilku struktur w tzw. kokulturach. Hodowla stwarza również możliwość wykonywania badań na czystych populacjach komórek nerwowych i glejowych z możliwością rozdziału komórek glejowych na populacje astrocytów i oligodendrocytów.

LITERATURA

[1] AGARGH E., YEN H. H., HERRMANN R., PURO D. G., γ-Aminobutyric acid mediated inhibition at cholinergic synapses formed by cultured retinal neurons, *Brain Res.*, **330**: 323–328, 1985.

[2] BENDER A. S., HERTZ L., Evidence for involvement of the astrocytic benzodiazepine receptor in the mechanism of action of convulsant and anticonvulsant drugs, *Life Sci.*, **43**: 477–484, 1988.

[3] CRAIN S. M., Neurophysiologic studies in tissue culture, rozdział IV, Spinal cord and innervation of muscle, wyd., Raven Press, str. 43–132, 1976.

[4] FISHMAN P. H., FINBERG J. P. M., Effect of the tricyclic antidepressant desipramine on β-adrenergic receptors in cultured rat glioma C6 cells, *J. Neurochem.*, **49**: 282–289, 1987.

[5] HARRISON R. G., Observations on the living developing nerve fiber, *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.* **241**: 140–150, 1907.

[6] HENN F. A., Neurotransmission and glial cells: a functional relationship? *J. Neurosci. Res.*, **2**: 271–282, 1976.

[7] HERTZ L., SCHOUSBOE I., HERTZ L., SCHOUSBOE A., Receptor expression in primary cultures of neurons or astrocytes, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat.*, **8**: 521–527, 1984.

[8] HERTZ L., RICHARDSON J. S., Acute and chronic effect of antidepressant drugs on β-adrenergic function in astrocytes in primary cultures: an indication of glial involvement in affective disorders? *J. Neurosci.*, **9**: 173–182, 1983.

[9] HERTZ L., MUKERJI S., RICHARDSON J. S., Down-regulation of β-adrenergic activity in astroglia by chronic treatment with an antidepressant drug, *Eur. J. Pharmacol.*, **72**: 267–268, 1981.

[10] HERTZ L., Functional interactions between neurons and astrocytes I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters, *Prog. Neurobiol.*, **13**: 277–323, 1979.

http://rcin.org.pl

[11] HÖSLI L., HÖSLI E., Electrophysiologic and autoradiographic evidence for receptors for biogenic amines on astrocytes in explant cultures of rat CNS, Gial Cell Receptors, H. K. Kimelberg wyd., Raven Press, str. 77–93, 1988.
[12] HÖSLI E., HÖSLI L., Autoradiographic localization of binding sites for 3H-ketanserin on neurons and astrocytes of cultured rat brainstem and spinal cord, *Exp. Brain Res.*, **65**: 486–490, 1987.
[13] HÖSLI L., HÖSLI E., UHR M., BRIOTTA G. D., Electrophysiological evidence for adenosine receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system, *Neurosci. Let.*, **79**: 108–112, 1987.
[14] HÖSLI L., HÖSLI E., SCHNEIDER U., WIGET W., Evidence for the existance of histamine H_1 and H_2 receptors on astrocytes of cultured rat central nervous system, *Neurosci. Let.*, **48**: 287–291, 1984.
[15] HÖSLI L., HÖSLI E., ZEHNTNER C., LEHMANN R., LUTZ T. W., α and β-adrenoceptors on cultured glial cells, Molecular Pharmacology to Behaviour, P. Mandel i F. V. DeFeudis, wyd., Raven Press, str. 417–420, 1983.
[16] KAŁUŻA J., KOWALSKA Z., Uptake of L-DOPA by the cells of organotypic culture from chick-embryo brain hemispheres, *Acta Histochem.*, **18**: 121–123, 1977.
[17] KATZ D. M., KIMELBERG H. K., Kinetics and autoradiography of high affinity uptake of serotonin by primary astrocyte cultures, *J. Neurosci.*, **5**: 1901–1908, 1985.
[18] KIMELBERG H. K., KATZ D. M., Regional differences in 5-hydroxytryptamine and catecholamine uptake in primary astrocyte cultures, *J. Neurochem.*, **47**: 1647–1652, 1986.
[19] KIMELBERG H. K., PELTON E. W., High-affinity uptake of (3H)-norepinephrine by primary astrocyte cultures and its inhibition by tricyclic antidepressants, *J. Neurochem.*, **40**: 1265–1270, 1983.
[20] LAERUM O. D., STEINSVAG S., BJERKVIG R., Cell and tissue culture of the central nervous system; recent developments and current applications, *Acta Neurol. Scand.*, **72**: 529–549, 1985.
[21] LEHMANN A., HANSSON E., Amino acid content in astroglial primary cultures from different brain regions during cultivation, *Neurochem. Res.*, **12**: 797–800, 1987.
[22] MEYER R. D., MC MORRIS F. A., Induction of both rat and mouse lactate dehydrogenase in hybrids between inducible rat glioma and iminducible mouse neuroblastoma cells, *J. Cell Physiol.*, **103**: 1–9, 1980.
[23] NOWAK J. Z., The isolated retina as a model of the CNS in pharmacology, *TIPS*, **9**: 80–82, 1988.
[24] ONALI P., SCHWARTZ J. P., HAMBAUER J., COSTA E., Regulation by a beta-adrenergic receptor of a Ca^{+2} independent adenosine 3', 5'-(cyclic) monophosphate phosphodiesterase in C6 glioma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **675**: 285–295, 1981.
[25] ORT C. A., FUTAMACHI K. J., PEACOCK J. H., Morphology and electrophysiology of ventral mesencephalon nerve cell cultures, *Dev. Brain Res.*, **39**: 205–215, 1988.
[26] PURO D. G., YEH H. H., Development of synaptic transmission by cholinergic neurons in culture, *J. Neurosci. Res.*, **10**: 241 –250, 1983.
[27] REPKE H., MADERSPACH K., Muscaric acetylcholine receptors on cultured glia cells, *Brain Res.*, **232**: 206–211, 1982.
[28] REYNOLDS R., HERSCHKOWITZ N., Selective uptake of neuroactive amino acids by both oligodendrocytes and astrocytes in primary dissociated culture: a possible role for oligodendrocytes in neurotransmitter metabolism, *Brain Res.*, **371**: 253–266, 1986.
[29] REYNOLDS R., HERSCHKOWITZ N., Uptake of (3H)GABA by oligodendrocytes in dissociated brain cell culture: a combined autoradiographic and immunocytochemical study, *Brain Res.*, **322**: 17–31, 1984.
[30] SHALABY I. A., HOFFMANN P. C., HELLER A., Release of dopamine from mesencephalic neurons in aggregate cultures: influence of target and non-target cells, **307**: 347–350, 1984.
[31] SHALBY I. A., KOTAKE C., HOFFMANN P. C., HELLER A., Release of dopamine from coaggregate cultures of mesencephalic tegmentum and *corpus striatum*. *J. Neurosci.*, **3**: 1565–1571, 1983.
[32] SEMENOFF D., KIMELBERG H. K., Autoradiography of high affinity uptake of catecholamines by primary astrocyte cultures, *Brain Res.*, **348**: 125–136, 1985.

Otrzymano: 10 maja 1989
Przyjęto: 15 września 1989
Adres autorów: ul. Smętna 12, 31-343 Kraków

http://rcin.org.pl

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI TOM 17, NR 1, 1990 (83–96)

PROCES ANGIOGENEZY W ŻEŃSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

ANGIOGENIC PROCESS IN FEMALE REPRODUCTIVE TRACT

Anna T. GRAŻUL-BILSKA

Zakład Fizjologii Rozrodu Instytutu Nauk Zootechnicznych i Pokrewnych Uniwersytetu Stanowego Północnej Dakoty (Department of Animal and Range Science,NDSU, USA)

Streszczenie. W artykule omówiono proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych, metody badania właściwości angiogenicznych oraz neowaskularyzację w żeńskim układzie rozrodczym. Proces neowaskularyzacji przebiega w kilku etapach i znajduje się pod kontrolą czynników mechanicznych, zewnątrzkomórkowych, czynników wzrostowych oraz innych. Właściwości angiogeniczne bąda się metodami in vivo i in vitro. In vivo stosuje się implanty do kosmówkowo-omoczniowej błony zarodków kurczęcia, rogówki szczura lub królika, policzka chomika, ucha królika, tkanki podskórnej szczura lub myszy. Do grupy metod in vitro należą metody pomiaru liczby migrujących i proliferujących komórek śródbłonkowych, inkorporacji znakowanych aminokwasów przez komórki śródbłonkowe oraz zmiany aktywności aktywatora plazminogenu w komórkach śródbłonkowych, w obecności badanego czynnika. W układzie rozrodczym samicy obserwuje się proces neowaskularyzacji w obrębie rozwijających się pęcherzyków jajnikowych i ciałek żółtych oraz macicy, zarówno w czasie cyklu estralnego jak i ciąży. Tkanki i komórki wymienionych narządów wydzielają czynnik lub czynniki angiogeniczne, którego/których aktywność i/lub ilość zmieniają się w zależności od fazy cyklu płciowego, okresu ciąży i gatunku.

Summary. In the article the process of neovascularization, the methods of investigation of angiogenic properties and angiogenesis in female reproductive tract were described. Neovascularization progresses in a few stages and is regulated by mechanical and intracellular factors, growth factors and others. Angiogenic activity may be evaluated by both in vivo and in vitro methods. The in vivo methods include chick chorioallantoic membrane assay (CAM assay) and the tests of vessel formation in rat or rabbit cornea, pocket of hamster's cheek or rabbit's ear and subcutaneous tissue of rat or mouse. The in vitro methods include migration and proliferation of endothelial cell bioassays, measurement of incorporation of labelled aminoacids into the endothelial cells and activity of plasminogen activator in endothelial cells in the presence of investigated factor. In the female reproductive tract the neovascularization process was observed in developing ovarian follicles, corpora lutea and the uterus, both during the estrous cycle and pregnancy. The tissues and cells of these organs synthesise and/or secrete factor(s) which stimulate angiogenesis.

http://rcin.org.pl

WSTĘP

Angiogenezą nazywamy proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych, czyli neowaskularyzacji. W warunkach fizjologicznych w zdrowym dorosłym organizmie, angiogeneza ma miejsce w układzie rozrodczym żeńskim w obrębie tkanki osłonki wewnętrznej rozwijającego się pęcherzyka jajnikowego, w ciałku żółtym w czasie jego rozwoju, w okresie regeneracji macicy po menstruacji, w trakcie ciąży w macicy (głównie w łożysku) oraz podczas regeneracji lub rozrostu niektórych tkanek (np. regeneracji rogów jelenia lub rozrostu tkanki tłuszczowej). Nowe naczynia krwionośne powstają również w czasie stanów niefizjologicznych, takich jak krótkotrwałe stany zapalne czy gojenie się rany. Ponadto intensywny proces angiogenezy ma miejsce w stanach patologicznych: w trakcie rozwoju tkanki rakowej, chronicznych stanach zapalnych, chorobie reumatycznej, łuszczycy, retinopatii cukrzycowej i innych chorobach oczu.

Badania nad angiogenezą rozpoczęto w powiązaniu z odkryciem faktu, że tkanka rakowa powoduje rozwój nowych naczyń krwionośnych. Pierwsze doniesienia na ten temat ukazały się na początku tego stulecia. Po raz pierwszy użyto terminu angiogeneza w 1935 r. [57] w opisie tworzenia nowych naczyń krwionośnych w łożysku. W latach późniejszych zainteresowanie badaniami procesu angiogenezy systematycznie rozwijało się, głównie w powiązaniu ze stanami patologicznymi. Wiodącym w tej dziedzinie jest ośrodek ze Szkoły Medycznej Uniwersytetu Harvard w Bostonie, USA, kierowany przez prof. Judah Folkman.

PRZEBIEG PROCESU ANGIOGENEZY I JEGO REGULACJA

Proces angiogenezy przebiega w kilku etapach [22, 30, 43]:

1 – początkowa reakcja naczyń, w czasie której naczynia rozszerzają się i stają się bardziej przepuszczalne, następuje retrakcja komórek śródbłonkowych, zmniejszenie liczby połączeń międzykomórkowych, zwiększenie liczby organeli komórkowych;

2 – rozpuszczenie błony podstawnej, spowodowane przez aktywację różnych proteaz, np. plazminogenu i kolagenazy IV typu;

3 – migracja komórek śródbłonkowych ze ściany naczynia poprzez tkankę łączną otaczającą naczynia i parenchymę w kierunku stymulatora, czyli czynnika angiogenicznego;

4 – replikacja komórek śródbłonkowych leżących poza frontem migrujących komórek;

5 – zapoczątkowanie tworzenia światła nowych naczyń kapilarnych;

6 – dalszy rozwój światła naczyń i rozgałęzień, tworzenie się błony podstawnej składającej się z kolagenu IV typu, lamininy i proteoglikanów;

7 – migracja pericytów i fibroblastów do dojrzałych, nowoutworzonych naczyń kapilarnych.

Zmiany degeneracyjne nowoutworzonych naczyń krwionośnych mogą nastąpić przy stałym braku czynnika stymulującego angiogenezę lub czynnika angiostatycznego, przejawiającego się skurczeniem, zwężeniem, ściągnięciem kapilarów przy udziale fibroblastów i miofibroblastów.

http://rcin.org.pl

Na powstawanie nowych naczyń krwionośnych mają wpływ różne czynniki, które można zestawić w kilku grupach:

- czynniki mechaniczne [32, 56, 123];
- międzykomórkowe interakcje [15, 19, 22, 55, 83, 84];
- środowisko zewnątrzkomórkowe [43, 71, 72, 77, 79];
- czynniki wzrostowe (tab. 1);
- inne czynniki (tab. 1 i 2).

Niektóre tkanki i komórki mają właściwości angiogeniczne. Zalicza się do nich: niemal każdą tkankę nowotworową, ale są tu nieliczne wyjątki [4, 31, 34, 69], makrofagi [89], monocyty [58, 59], limfocyty [4, 64, 88, 110, 111], adipocyty [16], maź stawową [4], siatkówkę oka [17, 21, 44], ciało szkliste [17], skórę [80, 124], gruczoły ślinowe [31, 60], nerki [31, 122], tarczycę [31, 45], płyn z gojącej się rany [2], komórki tuczne [5, 34, 81, 82], tkankę z regenerujących rogów jelenia [3], jądra [18, 61], płyn z pęcherzyka jajnikowego [40, 41], komórki ziarniste i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego [66, 67, 73, 117], ciałko żółte [46, 54, 63, 96, 97, 98, 115], łożysko [13, 14, 42, 75, 92, 101, 102].

TABELA 1. Czynniki wpływające na proces angiogenezy sklasyfikowane na podstawie powinowactwa do heparyny

Wyszczególnienie	Pozycja literatury
I. Nie wiążące się z heparyną	
A. O małej masie cząsteczkowej (< 1000)	
pochodzące z niektórych tkanek rakowych	28, 87, 108
miedź	53, 74, 94, 125
prostaglandyny z grupy E	10, 39, 65
B. O dużej masie cząsteczkowej (> 1000)	
pochodzące z płynu gojącej się rany	9
angiogenina	29, 68, 114
transformujący czynnik wzrostowy	7, 37, 38, 91, 107
czynnik nekrozy nowotworów alfa	37, 38, 85
II. Wiążące się z heparyną	
A. Czynnik wzrostu fibroblastów	6, 8, 25, 26, 49
B. Czynnik wzrostu komórek śródbłonkowych	12, 37, 70
C. Nowotworowy czynnik angiogeniczny	35, 109

Niektóre z czynników wykazujących aktywność angiogeniczną, produkowane przez wymienione tkanki i komórki wyizolowano i określono ich pewne właściwości biologiczne i fizyko-chemiczne. Podzielono je na dwie grupy: czynniki nie wiążące się z heparyną i czynniki wiążące się z heparyną [4, 10, 22, 30, 34, 35, 37, 38, 49], przedstawia je tabela 1. Wykaz innych czynników modulujących proces angiogenezy oraz sposób, w jaki mogą na nią oddziaływać, przedstawia tabela 2.

Reasumując przedstawione powyżej dane na temat przebiegu procesu angiogenezy i jego regulacji można stwierdzić, co następuje:

1. Migracja komórek śródbłonkowych jest wczesną angiogeniczną odpowiedzią i może przebiegać niezależnie od proliferacji.

2. Komórki śródbłonkowe mogą reagować różnie na czynnik stymulujący lub ograniczający neowaskularyzację w zależności od środowiska zewnętrznego (podłoża), z którym mają kontakt.

3. Wiele różnych czynników ma właściwości modulowania procesu angiogenezy.

http://rcin.org.pl

4. Wyżej wymienione inne czynniki mogą mieć wpływ na środowisko otaczające lub onę podstawną i w ten sposób oddziaływać na reakcję komórek śródbłonkowych.

TABELA 2. Inne czynniki modulujące proces angiogenezy

Wyszczególnienie	Czynniki o działaniu	
	hamującym	pobudzającym
1. Heparyna	20*, 36, 62, 116	37, 81, 118, 120
2. Adenozyna	52	24
3. Histamina		119
4. Protamina	37, 118	
5. Inhibitory syntezy DNA	116	
6. Czynnik płytkowy 4	35	
7. Interferony	111	
8. Aktywatory kinazy białkowej C	23	
9. Substancje pochodzące z tkanki chrzęstnej	31, 34, 37	
10. Antyneoplastyczne czynniki pochodne antracenu	90	
11. Witamina A	1	

* cyfry w kolumnach oznaczają pozycję literatury

METODY BADANIA WŁAŚCIWOŚCI ANGIOGENICZNYCH

W badaniach aktywności angiogenicznej stosuje się dwie grupy metod biologicznych, pierwsza z nich to metody in vivo, druga – in vitro.

METODY IN VIVO

A. Metoda z użyciem kosmówkowo-omoczniowej błony zarodków kurczęcia *(chorioallantoic membrane assay – CAM assay)*. Używa się tu embrionów kurczęcia z błonami płodowymi zarówno w skorupce jaja, jak i bez. W kilka dni po rozpoczęciu inkubacji (8–9 dzień) zapło[illegible]onych jaj kurzych, na mało ukrwionej części błony płodowej umieszcza się fragment tkanki lub krążek (o średnicy 1 mm) kopolimeru octanu etylenowo-winylowego (elvax) nasyconego ekstraktem z badanej tkanki lub narządu lub określoną substancją. Każdego dnia lub po upływie kilku (4–6) dni po umieszczeniu badanego implantu na błonie płodowej, obserwuje się pod mikroskopem stereoskopowym pojawiające się nowe naczynia krwionośne (lub ich brak). Obserwacje te prowadzi kilka osób (4 lub 5) i każda z nich niezależnie określa stopień unaczynienia w skali od 0 do 4. Jednocześnie wykonuje się zdjęcia obserwowanego fragmentu błony kosmówkowo-omoczniowej w celu powtórnej oceny na podstawie fotografii. Ponadto badany fragment błony płodowej poddaje się analizie komputerowej, za pomocą tzw. analizatora obrazu, w której czasie mierzy się długość nowo powstałych naczyń oraz określa ich liczbę. Uzyskane dane z oceny unaczynienia przez badające osoby oraz z analizy komputerowej poddaje się analizie statystycznej [24, 42, 98, 101, 112, 116, 119, 121].

B. Metoda implantacji fragmentu tkanki lub krążka elvaxu, nasyconego badanym ekstraktem lub substancją do kieszonki rogówkowej szczura [33, 35] **lub królika** [40, 46]. Przez kilka kolejnych dni po implantacji obserwuje się pod mikroskopem stereoskopowym pojawianie się nowych naczyń krwionośnych. Ich liczbę i długość ocenia się podobnie jak w metodzie z użyciem kosmówkowo-omoczniowej błony płodowej zarodka kurczęcia.

http://rcin.org.pl

C. Metody, w których badany fragment tkanki lub krążek elvaxu nasyconego badanym ekstraktem lub substancją implantuje się do kieszonki w policzku chomika lub uchu królika [30] **lub w tkance podskórnej szczura** [14] **lub myszy** [27]. Liczbę i długość nowych naczyń krwionośnych oblicza się i ocenia podobnie jak w dwóch powyżej opisanych metodach.

METODY IN VITRO

W tej grupie metod wykorzystuje się linie komórek śródbłonkowych pochodzących z aorty, żyły pępkowej lub naczyń kapilarnych [34].

A. Metoda liczenia komórek śródbłonkowych migrujących w kierunku badanego czynnika (*migration assay*). Używa się tu tzw. komory Boydena (*Boyden chamber*), składającej się z dwóch części oddzielonych od siebie błoną półprzepuszczalną o porach wielkości 8 μm. W zagłębieniach części dolnej komory umieszcza się roztwór badanego ekstraktu tkankowego lub innej badanej substancji, rozpuszczonych w takim samym środowisku, w którym zawiesza się komórki śródbłonkowe. Na część dolną kładzie się wspomnianą wyżej błonę, a następnie część górną, w której znajdują się otwory odpowiadające zagłębieniom części dolnej. W otworach części górnej umieszcza się komórki śródbłonkowe zawieszone w środowisku w określonej koncentracji. Następnie komorę Boydena inkubuje się przez okres kilku godzin (2–6), po czym z błony zeskrobuje się komórki, które nie przewędrowały w kierunku badanego czynnika. Komórki migrujące utrwala się i wybarwia, po czym błonę przykleja się do szkiełka podstawowego i liczy pod mikroskopem (z reguły za pomocą komputerowego analizatora obrazu) liczbę komórek, które przewędrowały w kierunku badanej substancji i próby kontrolnej. Porównanie liczby komórek w próbie kontrolnej i badanej pozwala na ocenę aktywności angiogenicznej badanego związku [52, 96, 97, 98, 101].

B. Metoda określania liczby komórek śródbłonkowych namnażających się pod wpływem badanego czynnika (*mitogenic assay*). Komórki śródbłonkowe w koncentracji 10000–30000 w 1 ml pożywki umieszcza się w naczyniach inkubacyjnych i inkubuje się przez okres 5–24 godzin w pożywce zawierającej osocze i/lub surowicę krwi, aby ułatwić przyklejanie komórek do dna. Po upływie tego czasu zmienia się pożywkę na taką, która zawiera badany ekstrakt lub związek. Po kilkudziesięciogodzinnej inkubacji (ok. 3 doby) komórki śródbłonkowe oddziela się od podłoża przy użyciu roztworu trypsyny i liczy je za pomocą urządzenia do liczenia komórek. Porównanie liczby komórek po zakończeniu inkubacji w środowisku nie zawierającym badanej substancji i w środowisku ją zawierającym daje ocenę aktywności angiogenicznej [67, 97, 98, 101].

C. Metoda polegająca na pomiarze indeksu mitotycznego przy użyciu znakowanej leucyny lub tymidyny oraz pomiaru ilości DNA w namnażających się kulturach komórek śródbłonkowych. Do hodowanych w naczyniach inkubacyjnych komórek śródbłonkowych dodaje się roztwór ekstraktu lub badanej substancji i po upływie kilkudniowej inkubacji (podobnie jak w powyżej opisanej metodzie) komórki oddziela się od podłoża, a na podstawie włączania do DNA znakowanej tymidyny określa się ich tempo namnażania [54, 115, 116].

D. Metoda pomiaru aktywności aktywatora plazminogenu w komórkach śródbłonkowych inkubowanych w obecności badanego czynnika [93].

http://rcin.org.pl

ANGIOGENEZA W ŻEŃSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM

Pod koniec lat siedemdziesiątych ukazały się pierwsze doniesienia o angiogenicznych właściwościach ciałek żółtych [46, 54, 63], ale dopiero od 1983 r. obserwuje się wzrost zainteresowania angiogenicznymi właściwościami również innych tkanek układu rozrodczego samicy.

PĘCHERZYK JAJNIKOWY

Ukrwienie pęcherzyka jajnikowego wzrasta w miarę jego rozwoju [11, 86, 104], co sugeruje, że dojrzewający pęcherzyk może stymulować rozrost dochodzących do niego naczyń krwionośnych poprzez sekrecję czynnika lub czynników angiogenicznych. Potwierdzeniem tego są prace donoszące o wpływie produktów sekrecji komórek ziarnistych, płynu pęcherzykowego i ekstraktów jajnika z fazy pęcherzykowej cyklu płciowego na proces neowaskularyzacji. Makris i wsp. [73] wykazali, że ekstrakty jajnika bez ciałek żółtych pochodzące od świni stymulują zarówno migrację, jak i proliferację komórek śródbłonkowych w warunkach in vitro oraz tworzenie nowych naczyń krwionośnych w błonie kosmówkowo-omoczniowej zarodka kurczęcia w warunkach in vivo. Podobnie ekstrakty jajników pochodzących od myszy po iniekcji PMSG oraz hCG stymulowały proces noewaskularyzacji w warunkach in vivo [106]. Również Koos i LeMaire [66] stwierdzili, że tylko jajniki, zawierające pęcherzyki pochodzące od szczurów po iniekcjach PMSG, stymulowały angiogenezę w warunkach in vivo. W późniejszych doświadczeniach Koos [67] udowodnił, że komórki ziarniste pochodzące z przedowulacyjnych pęcherzyków szczura produkują czynniki angiogeniczne stymulujące proliferację komórek śródbłonkowych, a ich cząsteczka jest mniejsza niż 10000 i większa niż 30000 daltonów, i są wrażliwe na działanie wysokiej temperatury i trypsyny. Ponadto Redmer i Reynolds [100] wykazali, że bydlęce komórki ziarniste z przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych, aktywnych estrogenowo *(estrogen-active)*, tj. o wyższym od 1 stosunku estrogenów do progesteronu w płynie pęcherzykowym, sugerującym, że dany pęcherzyk przeznaczony jest do owulacji, wydzielają czynnik lub czynniki stymulujące proliferację komórek śródbłonkowych in vitro. Natomiast komórki ziarniste z pęcherzyków nieaktywnych estrogenowo (*estrogen-inactive*), tj. o stosunku estrogenów do progesteronu niższym od 1, co sugeruje, że są to pęcherzyki nie przeznaczone do owulacji – pęcherzyki atretyczne, nie mają właściwości angiogenicznych. Natomiast komórki ziarniste pochodzące z dominujących pęcherzyków małp wydzielały czynnik(i) angiogeniczny(e) tylko w obecności FSH i LH [95]. W badaniach na owczych jajnikach stwierdzono, że tylko te komórki ziarniste wydzielają czynnik(i) angiogeniczny(e), które pochodzą z przedowulacyjnych, aktywnych estrogenowo pęcherzyków, natomiast we wcześniejszych okresach rozwoju pęcherzyka jajnikowego, aktywność angiogeniczna pochodzi z komórek osłonki wewnętrznej [117]. Również u innych gatunków: świń [73] i krów [100] komórki osłonki wewnętrznej mają właściwości angiogeniczne. Bydlęce komórki osłonki wewnętrznej wydzielały czynnik stymulujący neowaskularyzację, gdy pochodziły zarówno z aktywnych, jak i nieaktywnych estrogenowo przedowulacyjnych pęcherzyków [100].

Poza właściwościami angiogenicznymi komórek ziarnistych i osłonki wewnętrznej, stwierdzono również angiogeniczną aktywność w płynie pęcherzykowym, pochodzącym od kobiet [40], świń [41] i krów [100], zarówno w warunkach in vivo jak i in vitro. Wyższą

http://rcin.org.pl

zdolność do stymulowania proliferacji i migracji komórek śródbłonkowych wykazywał płyn pęcherzykowy z bydlęcych pęcherzyków przedowulacyjnych, o średnicy większej niż 1,5 cm, aktywnych estrogenowo niż z pęcherzyków o średnicy mniejszej niż 1,5 cm, nieaktywnych estrogenowo. Jednak płyn pęcherzykowy z małych i średnich pęcherzyków jajnikowych również wykazywał pewne właściwości angiogeniczne [badania własne niepublikowane]. Można przypuszczać, że aktywność angiogeniczna płynu pęcherzykowego wynika z aktywności komórek ziarnistych i/lub osłonki wewnętrznej, które mogą wydzielać czynnik(i) angiogeniczny(e) właśnie do wnętrza pęcherzyka.

Powyżej zacytowane dane wskazują, że angiogeniczne właściwości pęcherzyka jajnikowego zmieniają się w czasie jego rozwoju. Komórki osłonki wewnętrznej wydają się wydzielać czynnik lub czynniki stymulujące neowaskularyzację w czasie całego rozwoju pęcherzyka, podczas gdy komórki ziarniste oraz płyn pęcherzykowy wykazują najwyższą aktywność angiogeniczną w okresie przedowulacyjnym, głównie w pęcherzykach przeznaczonych do owulacji.

CIAŁKO ŻÓŁTE

Ciałko żółte charakteryzuje się krótkim okresem trwania, w którego czasie zachodzą dynamiczne zmiany sekrecji progesteronu, masy oraz przepływu krwi. Po owulacji ciałko żółte powstaje w wyniku hipertrofii i hiperplazji komórek pęcherzyka jajnikowego, które jednocześnie przekształcają się w komórki lutealne, a w obrębie powstającego gruczołu tworzą się nowe naczynia krwionośne.

Stwierdzono, że ciałko żółte pochodzące z różnych faz cyklu estralnego i ciąży jest gruczołem mającym wyraźne właściwości angiogeniczne, co wykazano w badaniach na królikach [46], krowach [50, 63, 66, 97, 99], świniach [54], owcach [51, 99], małpach [96] i szczurach [115]. Posługując się trzema odrębnymi metodami in vivo (implantacji do błony kosmówkowo-omoczniowej embrionu kurczęcia, do tkanki podskórnej myszy i policzka chomika) udowodniono w 1977 r. [63], że bydlęce ciałko żółte stymuluje angiogenezę. W latach późniejszych stwierdzono, że aktywnośćć angiogeniczna bydlęcych ciałek żółtych zmienia się w czasie cyklu płciowego [98]. Najsilniejszą zdolność pobudzania neowaskularyzacji wykazuje ciałko żółte z późnej fazy lutealnej, a najmniejszą (ale wyraźną) z wczesnej fazy lutealnej. Aktywność ta może być modulowana przez hormon luteinizujący i prostaglandynę F-2alfa [50, 98]. Natomiast sterydy jajnikowe (progesteron, estradiol i testosteron) oraz prolaktyna nie miały wpływu na właściwości angiogeniczne bydlęcych komórek lutealnych [50]. Aktywność angiogeniczną, podobną do obserwowanej w czasie środkowej i późnej fazy lutealnej, stwierdzono również w ciałkach żółtych pochodzących z różnych okresów ciąży owiec i krów [99]. Prostaglandyna F-2alfa owiec obniżała zdolność tkanki lutealnej do stymulacji proliferacji komórek śródbłonkowych, natomiast LH pozostawał bez wpływu na właściwości angiogeniczne ciałek żółtych u obu badanych gatunków.

Czynnik(i) angiogeniczny(e) produkowany(e) przez bydlęcą tkankę lutealną stymuluje zarówno proliferację, jak i chemotaksję komórek śródbłonkowych, jest termolabilny i ma cząsteczkę większą niż 300 000 daltonów [97]. Nie można jednak wykluczyć możliwości, że może to być związek o mniejszej masie cząsteczkowej, ale związany z nośnikiem o dużej masie.

Ostatnio w badaniach owczego ciałka żółtego wykazano, że małe komórki lutealne oraz komórki niesteroidogeniczne wydzielają czynnik angiogeniczny stymulujący proliferację

http://rcin.org.pl

komórek śródbłonkowych, natomiast duże komórki lutealne tej zdolności nie mają. Stwierdzono też, że LH nie ma wpływu na aktywność angiogeniczną owczych komórek lutealnych [51].

Czynnik(i) angiogeniczny(e) produkowany jest przez ciałko żółte zarówno w czasie cyklu estralnego, jak i ciąży. Obecność czynnika(ów) angiogenicznego(ych) w ciałku żółtym pochodzącym z późnej fazy lutealnej oraz różnych okresów ciąży sugeruje, że bierze on udział nie tylko w procesie neowaskularyzacji w okresie rozwoju ciałka żółtego w czasie wczesnej fazy lutealnej, ale również w podtrzymywaniu funkcji komórek śródbłonkowych we w pełni funkcjonującym ciałku żółtym i być może w procesie regresji naczyń krwionośnych w trakcie luteolizy.

Wielu autorów sugeruje, że czynnikiem angiogenicznym obecnym w ciałku żółtym i komórkach ziarnistych jest czynnik wzrostu fibroblastów (FGF) lub jego pochodne [47, 78, 105]. Wyizolowany z komórek ziarnistych FGF o charakterze zasadowym jest aktywny biologicznie, stymuluje proliferację zarówno komórek śródbłonkowych, jak i ziarnistych i prawdopodobnie wpływa na rozwój unaczynienia w warstwie komórek osłonki wewnętrznej [78]. Natomiast wyizolowany przez Gospodarowicza i wsp. [47] czynnik angiogeniczny z bydlęcych ciałek żółtych wykazuje wysokie podobnieństwo do FGF uzyskanego z przysadki mózgowej i mózgu. Z badań własnych [dane niepublikowane] wynika, że bydlęcy lutealny czynnik(i) angiogeniczny(e) wiąże się z heparyną i może być od niej odłączony przez wymywanie zbuforowanym 2,0-molowym roztworem NaCl, czyli podobnie jak FGF. Kolejnym dowodem na obecność FGF w ciałku żółtym są dane z pracy Stirling i wsp. [113], w której wykazano, że w miarę rozwoju bydlęcego ciałka żółtego wzrasta koncentracja mRNA kodującego zasadowy FGF. Zgadza się to wyraźnie z wynikami pracy Redmera i wsp. [98], w której przedstawiono wzrost aktywności angiogenicznej ciałka żółtego w miarę postępu fazy lutealnej. Powyższe dane wskazują, że FGF jest głównym czynnikiem angiogenicznym w jajniku, jednak nie można wykluczyć roli innych związków, których obecność w jajniku stwierdzono, a mających wyższą lub niższą od czynnika wzrostu fibroblastów masę cząsteczkową [67, 97].

MACICA

Tkanki macicy wpływają bezpośrednio na przeżywalność zarodków oraz ich rozwój. Jednym z głównych czynników decydujących o prawidłowym przebiegu wzrostu i rozwoju zarodka i płodu jest odpowiedni dopływ krwi. Wymaga to dobrze rozwiniętego łożyska naczyniowego w macicy. Wykazano, że tkanki ciężarnej macicy ludzkiej [13, 14, 42, 92], bydlęcej [101, 102] i owczej [75] oraz niecięższarnej macicy bydlęcej [Reynolds, dane niepublikowane] i owczej [75] wykazują aktywność angiogeniczną. Stwierdzono, że błona doczesna [42], łożysko i błona kosmówkowo-omoczniowa [13, 14, 92] ludzkiej macicy ciężarnej stymulują tworzenie nowych naczyń krwionośnych w warunkach in vivo i in vitro. Łożyskowym czynnikiem angiogenicznym może być obecny w ludzkim łożysku czynnik wzrostu fibroblastów [48], ale również wyizolowany przez Burgosa [14] związek o m. cz. pomiędzy 400 i 1100 daltonów, wiążący się z nośnikami białkowymi o masie wyższej niż 100 000. W różnych okresach ciąży, zdolność wywołania neowaskularyzacji wykazuje tylko tkanka łożyska od strony matczynej w macicy bydlęcej, natomiast część płodowa wyraźnie ogranicza proces angiogenezy [101, 102]. Sugeruje to, że rozwój unaczynienia w łożysku krowy jest kontrolowany przez stymulujące i hamujące związki produkowane w jego

http://rcin.org.pl

obrębie. Czynnik angiogeniczny pochodzący z bydlęcego łożyska ma masę cząsteczkową wyższą niż 100 000 daltonów i jest termolabilny [102]. Tkanki łożyska owczego zachowują się odmiennie niż bydlęcego. We wczesnym okresie ciąży (12–22 dni) tkanki części matczynej łożyska stymulowały proces proliferacji komórek śródbłonkowych, natomiast błony płodowe tych właściwości nie wykazywały. W późniejszych okresach ciąży (41–140 dni) tkanki części matczynej łożyska oraz pozałożyszczowa część płodowa łożyska nie miały aktywności angiogenicznej. Łożysko części płodowej nie wykazywało aktywności angiogenicznej w środkowym okresie ciąży (40–90 dni), ale w okresie późnej ciąży (115–120 dni) stymulowało angiogenezę. Czynnik(i) angiogeniczny(e) pochodzący(e) z łożyska owcy ma cząsteczkę o masie większej niż 100 000 daltonów i jest niestabilny w wysokiej temperaturze [75]. Wydaje się, że łożyskowa angiogeneza u owcy, podobnie jak u bydła, modulowana jest przez część matczyną i płodową poprzez syntezę i sekrecję czynników stymulujących i hamujących, zachowujących się jednak różnie w różnych okresach ciąży.

Tkanka endometrium pochodząca z niecięŻarnej macicy bydlęcej wykazuje aktywność angiogeniczną podobną do stwierdzonej w różnych okresach ciąży [Reynolds, dane niepublikowane]. Natomiast tkanka endometrium owczego ze środkowej fazy lutealnej ma właściwości angiogeniczne podobne do endometrium pochodzącego z wczesnego okresu ciąży [75]. Aktywność angiogeniczna tkanek niecięŻarnej macicy może być modulowana przez hormony sterydowe (progesteron i estradiol). Presta [93] sugeruje, że u kobiet aktywność angiogeniczna endometrium może być stymulowana przez estradiol, ale nie przez progesteron. Natomiast w badaniach na owczym endometrium stwierdzono, że progesteron w większym stopniu wpływa na angiogeniczne właściwości tkanek niecięŻarnej macicy niż estradiol [103]. Wydaje się, że czynniki angiogeniczne pochodzące z macicy niecięŻarnej i cięŻarnej spełniają ważną funkcję początkową w przygotowaniu macicy do przyjęcia zarodka, a później w rozwoju zarodka i płodu przez regulowanie rozwoju łożyska naczyniowego.

ZAKOŃCZENIE

W wielu pracowniach trwają intensywne prace zmierzające do wyizolowania i oczyszczenia czynnika(ów) angiogenicznego(ych) z różnych tkanek i komórek. Poznanie jego struktury pozwoli na dokładniejsze scharakteryzowanie jego funkcji, miejsca wytwarzania i mechanizmu działania. Pozwoliłoby również na uzyskanie przeciwciał i stwarzałoby możliwość jego ilościowego i jakościowego oznaczenia. Uzyskanie czynnika angiogenicznego umożliwiałoby kontrolę procesów angiogenezy i stworzyłoby nadzieję w walce z rakiem. Stwierdzono bowiem, że rozwój tkanki nowotworowej postępuje tylko wtedy, gdy jest ona ukrwiona [33]. Zahamowanie więc neowaskularyzacji w obrębie tkanki rakowej poprzez czynnik anty-angiogeniczny (np. przeciwciała) byłoby dużym postępem w leczeniu tej choroby.

LITERATURA

[1] ARENSMAN R. M., STOLAR C. J. H. Vitamin A effect on tumor angiogenesis. *J. Pediatr. Surg.* 14: 809–813, 1979.

http://rcin.org.pl

[2] ARNOLD E., WEST D. C., SCHOFIELD P. F., KUMAR S. Angiogenic activity in human wound fluid. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.*, **5**: 381–386, 1987.
[3] AUERBACH R., KUBAI L., SIDKY Y. A. Angiogenesis induction by tumors, embryonic tissues and lymphocytes. *Cancer Res.*, **36**: 3435–3440, 1976.
[4] AUERBACH R. Angiogenesis-inducing factors: a review. [w]: Pick E., Landy M., red., Limphokines, a Forum for Immunoregulatory Cell Products. New York: Academic Press, **4**: 69–88, 1981.
[5] AZIZKHAN R. G., AZIZKHAN J. C., ZETTER B. R., FOLKMAN J. Mast cell heparin stimulates migration of capillary endothelial cells in vitro. *J. Exp. Med.* **152**: 931–944, 1980.
[6] BAIRD A., BOHLEN P., LING N., GUILLEMIN R. Radioimmunoassay for fibroblast growth factor (FGF): release by bovine anterior pituitary in vitro. *Regulatory Peptides*, **10**: 309–317, 1985.
[7] BAIRD A., DURKIN T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type β-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **138**: 476–482, 1986.
[8] BAIRD A., ESCH F., MORMEDE P., UENO N., LING N., BOHLEN P., YING S-Y., WEHRENBERG W., GUILLEMIN R. Molecular characterization of fibroblast growth factor: distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog. Horm. Res.*, **42**: 143–165, 1986.
[9] BANDA M. J., KNIGHTON D. R., HUNT T. K., WERB Z. Isolation of nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7773–7777, 1982.
[10] Ben EZRA D. Neovasculogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am. J. Ophtalmol.*, **86**: 455–461, 1978.
[11] BRAMBELL F. W. R. Ovarian changes. [w]: Parker A. S. red. Marshall's Physiology of Reproduction. London: Longmans Green, str. 397–542, 1956.
[12] BURGESS W. H., MEHLMAN T., FRIESEL R., JOHANSON W. V., MACIĄG T. Multiple forms of endothelial cell growth factor. Rapid isolation and biological and chemical characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**: 11389–11392, 1985.
[13] BURGOS H. Angiogenic and growth promoting factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur. J. Clin. Investig.*, **13**: 289–296, 1983.
[14] BURGOS H. Angiogenic factor from human term placenta. Purification and partial characterization. *Eur. J. Clin. Investig.*, **16**: 486–493, 1986.
[15] CASTELLOT J. J., ADDONIZIO M. L., ROSENBERG R., KARNOVSKY M. J. Cultured endothelial cells produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle cell growth. *J. Cell. Biol.*, **90**: 372–379, 1981.
[16] CASTELLOT J. J., KARNOVSKY M. J., SPIEGELMAN B. M. Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 5597–5601, 1982.
[17] CHEN C. H., CHEN S. C. Angiogenic activity of vitreous and retinal extract. *Invest. Opthalmol. Vis. Sci.*, **19**: 596–602, 1980.
[18] CRIM J. W., HUSEBY R. A. Initial events in the vascularization of day-old mouse testes implanted into the inguinal mammary gland fat pad: a light microscopic and autoradiographic study. *Microvasc. Res.*, **12**: 141–156, 1976.
[19] CROKER D. J., MURAD T. M., GEER J. C. Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study. *Exp. Mol. Pathol.*, **13**: 51–65, 1970.
[20] CRUM R., SZABO S., FOLKMAN J. A new class of steriods inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science*, **230**: 1375–1378, 1985.
[21] D'AMORE P. A., GLASER B. M., BRUNSON S. K., FENSALAU A. H. Angiogenic activity from bovine retina: partial purification and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3068–3072, 1978.
[22] D'AMORE P. A., THOMPSON R. W. Mechanisms of angiogenesis. *Ann. Rev. Physiol.*, **49**: 453–464, 1987.
[23] DOCTROW S. R., FOLKMAN J. Protein kinase C activators suppres stimulation of capillary endothelial cell growth by angiogenic endothelial mitogens. *J. Cell Biol.*, **104**: 679–687, 1987.
[24] DUSEAU J. W., HUTCHINS P. M., MALBASA D. S. Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane. *Cir. Res.*, **59**: 163–170, 1986.
[25] ESCH F., BAIRD A., LING N., UENO N., HILL F., DENOROY L., KLEPPER R., GOSPODAROWICZ D., BOHLEN P., GUILLEMIN R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6507–6511, 1985.
[26] ESCH F., UENO N., BAIRD A., HILL F., DENOROY L., LING N., GOSPODAROWICZ D., GUILLEMIN R. Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (FGF). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **133**: 554–564, 1985.

http://rcin.org.pl

[27] FAJARDO L. F., KOWALSKI J., KWAN H. H., PRIONAS S. D., ALLISON A. C. Methods in laboratory investigation. The disc angiogenesis system. *Lab. Invest.*, **58**: 718–724, 1988.
[28] FENSALAU A., WATT S., MELLO R. J. Tumor angiogenic factor. Purification from the Walker 256 rat tumor. *J. Biol. Chem.*, **256**: 96005–96011, 1981.
[29] FETT J. W., STRYDOM D. S., LOBB R. R., ALDERMAN E. M., BETHUNDE J. L., RIORDAN J. F., VALLEE B. L. Lyzosome: a major secretory product of a human colon carcinoma cell line. *Biochemistry*, **24**: 965–975, 1985.
[30] FINDLAY J. K. Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocr.*, **111**: 357–366, 1986.
[31] FOLKMAN J., COTRAN R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **16**: 207–248, 1976.
[32] FOLKMAN J., MASCONA A. Role of cell shape in growth control. *Nature*, **273**: 345–349, 1978.
[33] FOLKMAN J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann. NY Acad. Sci.*, **401**: 212–227, 1982.
[34] FOLKMAN J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspec. Biol. Med.*, **29**: 10–36, 1985.
[35] FOLKMAN J. Growth control in capillary endothelium. [w] Browder L. W., Steinberg M. S. red. Developmental Biology. The Cell Surface in Development and Cancer. NY; Raven Press, **3**: 101–110, 1986.
[36] FOLKMAN J., INGBER D. E. Angiostatic steroids. Method of discovery and mechanism of action. *Ann. Surg.*, **206**: 374–383, 1987.
[37] FOLKMAN J., KLAGSBRUN M. Angiogenic factors. *Science*, **235**: 442–447, 1987.
[38] FOLKMAN J., KLAGSBRUN M. A family of angiogenic peptides. *Nature*, **329**: 671–672, 1987.
[39] FORM D. M., AUERBACH R. PGE-2 and angiogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **172**: 214–218, 1983.
[40] FREDERICK J. L., SHIMANUKI T., Di ZERGA G. S. Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science*, **224**: 389–390, 1984.
[41] FREDERICK J. L., HOA N., PRESTON D. S., FREDERICK J. J., CAMPEAU J. D., ONO T., Di ZERGA G. S. Initiation of angiogenesis by porcine follicular fluid. *Am. J. Obst. Gynecol.*, **152**: 1073–1078, 1985.
[42] FUCHS A., LINDENBAUM E., MARCONDAS N. G. Location of the angiogenic activity in the pregnant human uterus. *Acta Anat.*, **124**: 241–244, 1985.
[43] FURCHT L. T. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix and growth factors. *Lab. Invest.*, **55**: 505–509, 1986.
[44] GLASER B. M., D'AMORE P. A., MICHELS R. G., PATZ A., FENSELAU A. Demonstration of vasoproliferative activity from mammalian retina. *J. Cell Biol.*, **84**: 298–304, 1980.
[45] GOODMAN A. L., RONE J. D. Thyroid angiogenesis: endotheliotropic chemoattractant activity from rat thyroid cells in culture. *Endocrinology*, **121**: 2131–2140, 1987.
[46] GOSPODAROWICZ D., THAKRAL K. K. Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the *corpus luteum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 847–851, 1978.
[47] GOSPODAROWICZ D., CHENG J., LUI G. M., BAIRD A., ESCH F., BOHLEN P. *Corpus luteum* angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, **117**: 2283–2391, 1985.
[48] GOSPODAROWICZ D., CHENG J., LUI G. M., FUJII D. K., BAIRD A., BOHLEN P. Fibroblast growth factor in the human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **128**: 554–562, 1985.
[49] GOSPODAROWICZ D., FERRARA N., SCHWEIGERER L., NEUFELD G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.*, **8**: 95–114, 1987.
[50] GRAŻUL A. T., REDMER D. A. Effect of luteinizing hormone (LH), prolactin (PRL), prostaglandin F-2alfa (PGF) and ovarian steroids on angiogenic activity of bovine corpora lutea (CL) from different days of the estrous cycle. The Endocrine Society, Program and Abstracts of 69th Annual Meeting, 232, 1987.
[51] GRAŻUL-BILSKA A. T., REYNOLDS L. P., REDMER D. A. In vitro secretion of angiogenic activity by cell types of ovine corpora lutea. Midwestern Regional Conference on Comparative Endocrinology, Fargo, USA, 14 April, 1989.
[52] HACKETT S. F., FRIEDMAN Z., CAMPOCHIARO P. A. Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate modulates vascular endothelial cell migration in vitro. *Cell Biol. Int. Rep.*, **11**: 279–287, 1987.
[53] HANNAN G. N., McAUSLAN B. R. Modulation of synthesis of specific proteins in endothelial cells by copper, cadmium and disulfiram: an early response to an angiogenic inducer of cell migration. *J. Cell Physiol.*, **111**: 207–212, 1982.
[54] HEDER G., JAKOB W., HALLE W., MAUERSBERGER B., KAMBACH G., JENTZSCH K. D., OEHME P. Influence of porcine *corpus luteum* extract on DNA synthesis and proliferation of cultivated fibroblastst and endothelial cells. *Exp. Path.*, **17**: 493–497, 1979.

http://rcin.org.pl

[55] HEIMARK R. L., SCHWARTZ S. M. The role of membrane-membrane interactions in the regulation of endothelial cell growth. *J. Cell Biol.*, 100: 1934–1940, 1985.
[56] HERMAN I. M., POLLARD T. D., WONG A. J. Contractile proteins in endothelial cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 401: 50–60, 1983.
[57] HERTIG A. T. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib. Embryol.*, 25: 37–48, 1935.
[58] HOCKEL M., SASSE J., WISSLER J. H. Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes, and "tube formation" but not proliferation of capillary endothelial cells in vitro. *J. Cell Physiol.*, 133: 1–13, 1987.
[59] HOCKEL M., JUNG W., VAUPEL P., RABES H., KHALEDPOUR C., WISSLER J. H. Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induced controlled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin. *J. Clin. Invest.*, 82: 1075–1090, 1988.
[60] HOFFMAN H., McAUSLAN B., ROBERTSON D., BURNETT E. An endothelial growth-stimulating factor from salivary gland. *Exp. Cell Res.*, 102: 269–275, 1976.
[61] HUSEBY R. A., BITTNER J. J. Angiogenesis about and within grafts of normal testicular tissue: a comparison with transplanted neoplastic tissue. *Microvasc. Res.*, 10: 396–413, 1975.
[62] INGBER D. E., MADRI J. A., FOLKMAN J. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. *Endocrinology*, 119: 1768–1775, 1986.
[63] JAKOB W., JENTZSCH K. D., MAUERSBERGER B., OEHME P. Demonstration of angiogenesis-activity in the *corpus luteum* of cattle. *Exp. Path.*, 13: 231–236, 1977.
[64] KAMIŃSKI M., MAJEWSKI S., KAMIŃSKA G., BEM W., SZMURLO A. Enhancing effect of x-ray irradiation on a new blood vessel formation in mice tested by lymphocyte-induced angiogenesis assay. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 26: 1075–1078, 1978.
[65] KANAYASU T., NAKAO-HAYASHI J., ASUWA N., MORITA I., ISHII T., ITO H., MUROTA S. Leukotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 159: 572–578, 1989.
[66] KOOS R. D., Le MAIRE W. J. Evidence for an angiogenic factor from rat follicles. [w] Greenwald G. S., Terranova P. F. red. Factors Regulating Ovarian Function. New York: Raven Press, str. 191–195, 1983.
[67] KOOS R. D. Stimulation of endothelial cell proliferation by rat granulosa cell-conditioned medium. *Endocrinology*, 119: 481–489, 1986.
[68] KURACKI K., DAVIE E. W., STRYDOM D. J., RIORDAN J. F., VALLEE B. L. Sequence of the DNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. *Biochemistry*, 24: 5493–5499, 1985.
[69] LIBERMAN T. A., FRIESEL R., JAYE M., LYALL R. M., WESTERMARK B., DROHAN W., SCHMIDT A., MACIĄG T., SCHLESSINGER J. An angiogenic growth factor is expressed as human glioma cells. *EMBO J.*, 6: 1627–1632, 1987.
[70] LOBB R., SASSE Y., SULLIVAN R., SHING Y., D'AMORE P., JACOBS J., KLAGSBRUN M. Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J. Biol. Chem.*, 261: 1924–1928, 1986.
[71] MADRI J. A., WILLIAMS S. K. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.*, 97: 153–165, 1983.
[72] MADRI J. A., PRATT B. M. Endothelial cell-matrix intractions: in vitro models of angiogenesis. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 85–91, 1986.
[73] MAKRIS A., RYAN K. J., YASUMIZU T., HILL C. L., ZETTER B. R. The nonluteal porcine ovary as a source of angiogenic activity. *Endocrinology*, 115: 1672–1677, 1984.
[74] McAUSLAN B. R., REILLY W. G., HANNAN G. N., GOLE G. A. Angiogenic factors and their assay: activity of formyl methionyl leucyl phenylalanine, heparin, copper and bovine endothelium stimulating factor. *Microvasc. Res.*, 26: 323–338, 1983.
[75] MILLAWAY D. S., REDMER D. A., KIRSCH J. D., ANTHONY R. V., REYNOLDS L. P. Angiogenic activity of matternal and fetoplacental tissues of ewes throughout gestation. *J. Reprod. Fert.*, 86: 689–696, 1989.
[76] MONTESANO R. Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an in vitro approach. *Experientia*, 42: 977–985, 1986.
[77] MONTESANO R., VASSALLI J-D., BAIRD A., GUILLEMIN R., ORCI L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 42: 7297–7301, 1983.
[78] NEUFELD G., FERRARA N., SCHWEIGERER L., MITCHELL R., GOSPODAROWICZ D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 121: 597–603, 1987.

http://rcin.org.pl

[79] NICOSIA R., MADRI J. A. The microvascular extracellular matrix. Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model. *Am. J. Pathol.*, **128**: 78–90, 1987.
[80] NISHIOKA K., RYAN T. J. The influence of the epidermis and other tissues on blood vessel growth in the hamster cheek pouch. *J. Invest. Dermatol.*, **58**: 33–45, 1972.
[81] NORRBY K., JAKOBSSON A., SORBO J. Mast-cell-mediated angiogenesis: a novel experimental model using the rat mesentery. *Virchows Arch. (Cell Pathol.)*, **52**: 195–206, 1986.
[82] NORRBY K., JAKOBSSON A., SORBO J. Age-dependent mast-cell-mediated angiogenesis. *APMIS*, **96** (Suppl. 2): 251–261, 1988.
[83] ORLIDGE A., D'AMORE P. A. Cell specific effects of glycosoamino-glycans on the attachment and proliferation of vascular wall components. *Microvasc. Res.*, **31**: 41–53, 1986.
[84] ORLIDGE A., D'AMORE P. A. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **105**: 1455–1462, 1987.
[85] PENNICA D., NEDWIN G. E., HAYFLICK J. S., SEEBURG P. H., DERYNCK R., PALLADINO M. A., KOHR W. J., AGGARWAL B. B., GOEDDEL D. V. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, **312**: 724–729, 1984.
[86] PETERS H., McNATTY K. P. [w] Elek P. red. The Ovary: a Correlation of Structure and Function in Mammals. London: Granada, 1980.
[87] PHILIPS P., KUMAR S. Tumor angiogenesis factor (TAF) and its neutralization by a xenogenic antiserum. *Int. J. Cancer.*, **23**: 82–88, 1979.
[88] POLAKOWSKI I. J., SKOPIŃSKA-RÓŻEWSKA E., WRÓBLEWSKI T., POWIŃSKA M. Angiogeneza indukowana limfocytami ludzkiej krwi obwodowej: badania nad wpływem wieku i płci dawcy na intensywność reakcji. *Pol. Tyg. Lek.*, **19**: 595–596, 1987.
[89] POLVERINI P. J., COTRAN R. S., GIMBRONE M. A. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*, **269**: 804–806, 1977.
[90] POLVERINI P. J., NOVAK R. F. Inhibition of angiogenesis by the antineoplastic agents mitoxantrone and bisantrene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **140**: 901–907, 1986.
[91] POPIK W. Transformujące czynniki wzrostowe. *Post. Biochem.*, **33**: 165–181, 1987.
[92] PRESTA M., MIGNATTI P., MULLINS D. E., MOSCATELLI D. A. Human placental tissue stimulates bovine capillary endothelial cell growth, migration and protease production. *Biosci. Rep.*, **5**: 783–790, 1985.
[93] PRESTA M. Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endomertial adenocarcinoma cells: implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J. Cell Physiol.*, **137**: 593–597, 1988.
[94] RAJU K. S., ALLESANDRI G., ZICHE M., GULLINO P. M. Ceruloplasmin, copper ions and angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**: 1183–1188, 1982.
[95] REDMER D. A., RONE J. D., GOODMAN A. L. Detection of angiotropic activity from primate dominant follicle. The Endocrine Society. Program and Abstracts of 67th Annual Meeting, 151, 1985.
[96] REDMER D. A., RONE J. D., GOODMAN A. L. Evidence for a non-steroidal angiotropic factor from the primate *corpus luteum*: stimulation of endothelial cell migration in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **179**: 136–140, 1985.
[97] REDMER D. A., KIRSCH J. D., GRAŻUL A. T. In vitro production of angiotropic factor by bovine corpus luteum: partial characterization of activities that are chemotactic and mitogenic for endothelial cells. [w]: Mahes V. B., Dhindsa D. S., Anderson E., Kalra S. P. red. Advances in Experimental Medicine and Biology, Regulation of Ovarian and Testicular Function. New York: Plenum Publishing Corp., **219**: 683–688, 1987.
[98] REDMER D. A., GRAŻUL A. T., KIRSCH J. D., REYNOLDS L. P. Angiogenic activity of bovine corpora lutea at several stages of luteal development. *J. Reprod. Fert.*, **88**: 627–634, 1988.
[99] REDMER D. A., GRAŻUL A. T., REYNOLDS L. P. Secretion of angiogenic activity by ovine and bovine corpora lutea throughout pregnancy. *J. Reprod. Fert., Abstract Series*, **1**: 57, 1988.
[100] REDMER D. A., REYNOLDS L. P. Granulosa and theca from preovulatory bovine follicles secrete factor(s) that stimulate proliferation of endothelial and 3T3 cells. Conf. of the Endocrine Society, Program and Abstracts of 71st Annual Meeting, 248, 1989.
[101] REYNOLDS L. P., MILLAWAY D. S., KIRSCH J. D., INFELD J. E., REDMER D. A. Angiogenic activity of placental tissue of cows. *J. Reprod. Fert.*, **81**: 233–240, 1987.
[102] REYNOLDS L. P., REDMER D. A. Secretion of angiogenic activity by placental tissues of cows at several stages of gestation. *J. Reprod. Fert.*, **83**: 497–502, 1988.
[103] REYNOLDS L. P., REDMER D. A. Secretion of angiogenic activity by endometrial tissues of cyclic and ovariectomized, steroid-treated ewes. *J. Reprod. Fert., Abstract Series*, **1**: 43, 1988.

http://rcin.org.pl

[104] RICHARDS J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.*, 60: 51–89, 1980.
[105] RYAN K. J., MAKRIS A. Significance of angiogenic and growth factors in ovarian follicular development. [w] Mahes V. B., Dhindsa D. S., Anderson E., Kalra S. P. red. Advances in Experimental Medicine and Biology, Regulation of Ovarian and Testicular Function. New York: Plenum Publishing Corporation, 219: 203–209, 1987.
[106] SATO E., ISHIBASHI T., KOIDE. Inducement of blood vessel formation by ovarian extracts from mice injected with gonadotropins. *Experientia*, 38: 1248–1249, 1982.
[107] SCHREIBER A. B., WINKLER M. E., DERYNCK R. Transforming growth factor-alfa: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, 232: 1250–1253, 1986.
[108] SHAHABUDDIN S., KUMAR S., WEST D., ARNOLD F. A study of angiogenesis factors from five defferent sources using a radioimmunoassay. *Int. J. Cancer*, 35: 87–91, 1985.
[109] SHING Y., FOLKMAN J., SULLIVAN R., BUTTERFIELD C., MURRAY J., KLAGSBRUN M. Heparin affinity: purification of a tumorderived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 223, 1296–1298, 1984.
[110] SIDKY Y. A., AUERBACH R. Lymphocyte-induced angiogenesis: a quantitative and sensitive assay of the graft-vs.-host reaction. *J. Exp. Med.*, 141: 1084–1100, 1975.
[111] SIDKY Y. A., BORDEN E. C. Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.*, 47: 5155–5161, 1987.
[112] SPANEL-BOROWSKI K., SCHNAPPER U., HEYMER B. The chick chorioallantoic membrane assay in the assessment of angiogenic factors. *Biomed. Res.*, 9: 253–260, 1988.
[113] STIRLING D., WATERMAN M. R., SIMPSON E. R. Expression of mRNA for basic fibroblastic growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J. Reprod. Fert., Abstract Series*, 1: 45, 1988.
[114] STRYDOM D. J., FETT J. W., LOBB R. R., ALDERMAN E. M., BETHUNDE J. L., RIORDAN J. F., VALLEE B. L. Amino acid sequence of human tumorderived angiogenin. *Biochemistry*, 24: 5486–5493, 1985.
[115] TAMURA H., GREENWALD G. S. Angiogenesis and its hormonal control in the *corpus luteum* of the pregnant rat. *Biol. Reprod.*, 36: 1149–1154, 1987.
[116] TANAKA N. G., SAKAMOTO N., TOHGO A., NISHIYAMA Y., OGAWA H. Inhibitory effect of antiangiogenic agents on neovascularization and growth of the chorioallantoic membrane (CAM). – The possibility of a new CAM assay for angiogenesis inhibition. *Exp. Pathol.*, 30: 143–150, 1986.
[117] TARASKA T., REYNOLDS L. P., REDMER D. A. In vitro secretion of angiogenic activity by ovine follicles. [w] Hirshfield A. N. red. Growth Factors and the Ovary. New York, London: Plenum Press, str. 267–272, 1989.
[118] TAYLOR S., FOLKMAN J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*, 297, 307–312, 1982.
[119] THOMPSON W. D., BROWN F. I. Quantitiation of histamine-induced angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane: model of action of histantine is indirect. *Int. J. Microcirc.: Clin. Exp.*, 6: 343–357, 1987.
[120] THORNTON S. C., MUELLER S. N., LEVINE S. M. Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science*, 222: 623–624, 1983.
[121] VU M. T., SMITH C. F., BURGER P. C., KLINTWORTH C. K. Methods in laboratory investigation. An evaluation of methods to quantitiate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis. *Lab. Invest.*, 53: 499–508, 1985.
[122] WARREN B. A., GREENBLATT M., KOMMINENI V. R. C. Tumor angiogenesis: ultrastructure of endothelial cells in mitosis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 53: 216–224, 1972.
[123] WHITE G. E., GIMBRONE M. A., FUJIWARA K. Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.*, 97: 416–424, 1983.
[124] WOLF J. E., HARRISON R. G. Demonstration and characterization of an epidermal angiogenic factor. *J. Invest. Dermatol.*, 61: 130–141, 1973.
[125] ZICHE M., JONES J., GULLINO P. Role of prostaglandin E-1 and copper in angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 69: 475–482, 1982.

Otrzymano: 18 lipca 1989.
Przyjęto po poprawkach: 20 stycznia 1990.
Adres autorki: 198 University Village, Fargo. ND 58102, USA

http://rcin.org.pl

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, nie publikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

2. Artykuły przeglądowe ze wskazaniem kierunków przyszłych badań o objętości do 15 stron maszynopisu i bibliografii z ostatnich 3 lat (do 35 pozycji). Każda pozycja bibliograficzna powinna zawierać dodatkowo 1 zdanie streszczenia, a szczególnie ważne pozycje powinny być oznaczone gwiazdką.

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

4. 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. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

Pierwsza strona nie numerowana przeznaczona jest dla redakcji i powinna zawierać: imiona i nazwiska autorów oraz ich tytuły naukowe, adresy pracy i domowe wraz z telefonem, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rysunków. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję i wysyłającego nadbitki, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następna strona powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, lecz jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, rys. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na rozdziały tytułowane i numerowane (1, 2 itd.) oraz podrozdziały (1.1, 1.2 itd.). Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

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

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

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

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie, poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 nadbitek.

http://rcin.org.pl

TREŚĆ

TRETYN A., J. KOPCEWICZ, A. PAWLAK – Fitochrom – pierwotny mechanizm działania 1
DRELA N. – Interleukina 1 (IL-1) – synteza i struktura 19
KUTERNOZIŃSKA W. – Udział cytoszkieletu w procesie różnicowania ksylemu w roślinach wyższych 39
KAJSTURA J. – Współzależności między organizacją mikrofilamentów i metabolizmem w komórkach niemięśniowych 55
BAL-KLARA A., J. KAŁUŻA – Współczesne poglądy na właściwości komórek nerwowych i glejowych hodowanych in vitro 71
GRAŻUL-BILSKA A. – Proces angiogenezy w żeńskim układzie rozrodczym 83

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumeratę na kraj przyjmuje redakcja ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa. Pieniądze należy wysyłać na konto: Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Bank Gdański, IV Oddział w Warszawie 300-009-6275-132. Cena prenumeraty na 1990 r. wynosi 120 000 zł. Również pojedyncze i archiwalne zeszyty można nabyć w redakcji.

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI is through the local press distributors or directly – Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland, account No: Polskie Towarzystwo Anatomiczne, Bank Gdański, IV Oddział w Warszawie 300-009-6275-132.

Indeks 369705

http://rcin.org.pl