

PM35 dl

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

TOM 17-NR 3'90
(197-288)

Postępy Biologii Komórki

WYDAWNICTWO SGGW
FUNDACJA • ROZWÓJ SGGW-AR •

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

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

Rada Redakcyjna:

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

Adres Redakcji: 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. 8,8 Ark. druk. 5,75

Oddano do składu 03.09.1990 r. Podpisano do druku w listopadzie 1990 r. Druk ukończono w grudniu 1990 r.

MECHANIZMY TRANSDUKCJI SYGNAŁU W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION IN THE PROCESS OF PLATELET ACTIVATION

Marian TOMASIAK

Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. W artykule omówiono aktualny stan wiedzy o mechanizmie transdukcji sygnałów w procesie aktywacji płytek krwi. Opisano, jaką rolę w tym procesie pełnią białka *G*, fosfolipaza *C*, cykl fosfatydyloinozytowy, kinaza białkowa *C*, fosfolipaza *A*₂ i metabolity kwasu arachidonowego.

Summary. The review focuses on the current knowledge of the mechanisms of signal transduction during activation of blood platelets. These includes the role of *G* proteins, phospholipase *C*, phosphatidylinositol cycle, protein kinase *C*, phospholipase *A*₂ and metabolites of arachidonic acid.

Wykaz skrótów. *PgD*₂ – prostaglandyna *D*₂, *PgG*₂ – prostaglandyna *G*₂, *PgH*₂ – prostaglandyna *H*₂, *TxA*₂ – tromboksan *A*₂, U44069 – stabilny analog *TxA*₂, U46619 – stabilny analog *PgG*₂, cAMP – cykliczny adenylozynomonofosforan, ADP – adenylozynomonofosforan, GTP – guanozynomonofosforan, GDPβS – guanozyno 5'-0-(2-tiodifosforan), GTPγS – guanozyno 5'-0-(3-tiotrifosforan), *PAF* – czynnik aktywujący płytki krwi, A23187 – jonofor wapniowy, DAG – diacyloglicerol, PI – fosfatydyloinozytol, PI4P – fosfatydyloinozytolo-4-fosforan, PI4,5P₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan, c11:2P – cykliczny myo-inozytolo-1:2-monofosforan, I₁P – myo-inozytolo-1-fosforan, c11:2,4P₂ – cykliczny myo-inozytolo-1:2,4-difosforan, I_{1,4,5}P₃ – myo-inozytolo-1,4,5-trifosforan, IP₃ – myo-inozytolo-trifosforan, I_{1,3,4,5}P₄ – myo-inozytolo-1,3,4,5-tetrafosforan, I_{1,3,4}P₃ – myo-inozytolo-1,3,4-trifosforan, I_{3,4}P₂ – myo-inozytolo-3,4-difosforan, I₃P – myo-inozytolo-3-monofosforan

WSTĘP

Płytki krwi są najmniejszymi komórkami krążącymi we krwi. Powstają w szpiku kostnym i płucach w wyniku fragmentacji megakariocytów i pozostają w krwiobiegu przez okres 9-10 dni [61, 78]. Nieaktywne płytki, tj. takie, które zwykle znajdują się we krwi ludzi zdrowych, mają kształt dysku o gładkiej powierzchni i nie wykazują tendencji do zlepiania się. Uszkodzenie naczynia (przecięcie), które zwykle wywołuje odsłonięcie włókien kolagenu, powoduje szybką aktywację płytek krwi. Komórki te szybko zmieniają swój kształt

na kulisty tworząc pseudopodia, przy pomocy których "przyklejają się" do włókien kolagenu (adhezja), a także zlepiają się ze sobą. Prowadzi to do powstania czopu hemostatycznego i zatrzymania krwawienia.

Miażdżycowo zmieniona ściana naczynia krwionośnego (nie przeciętego) może również aktywować płytki krwi, co może doprowadzać do powstania agregatów płytkowych przylegających do ściany naczynia [76]. Uwalniane ze zagregowanych komórek czynniki wzrostu dyfundują do ściany naczynia, powodując w niej przyspieszenie patologicznych zmian [64]. Tak powstałe agregaty płytek krwi mogą również zahamować przepływ krwi w naczyniu (zawał, zator). Już tylko te dwa przykłady świadczą o tym, jak ważne jest poznanie mechanizmów aktywacji tych komórek.

ODPOWIEDZI PŁYTEK KRWI

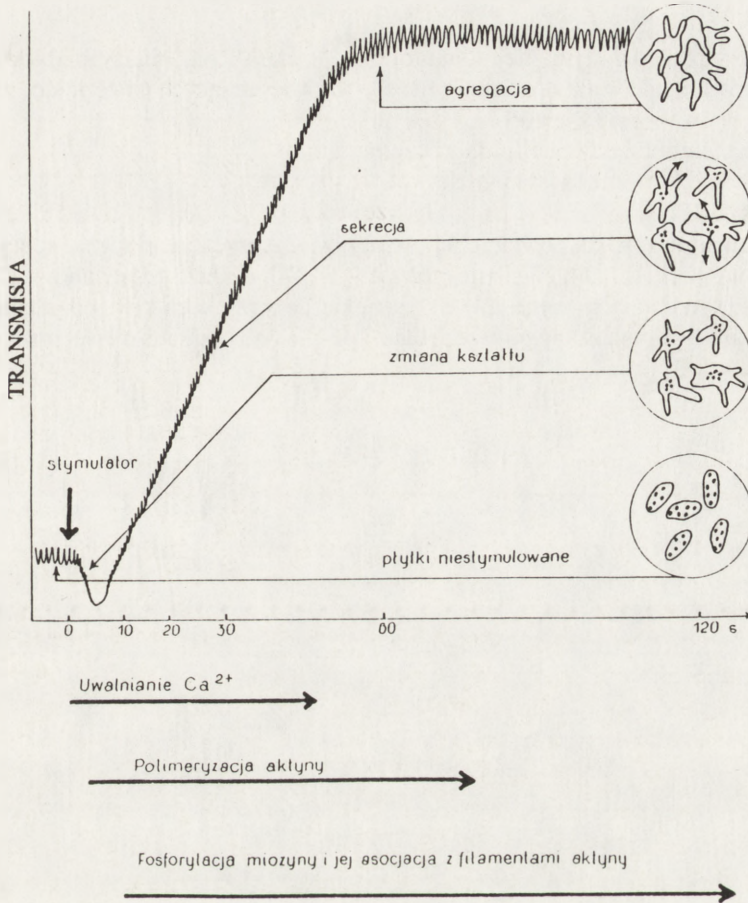
Mimo niezwyklej różnorodności stymulatorów płytek krwi (tab. 1) odpowiedź tych komórek w każdym przypadku przebiega w zasadzie według następującego schematu: płytki krwi zmieniają swój kształt (rys. 1), stają się "lepkie" i jeśli w tym momencie są mieszane, zlepiają się, tj. agregują i wyrzucają (egzocytoza) na zewnątrz komórki zawartość ziarnistości α i ziarnistości gęstych (sekrecja I), a następnie zawartość lizosomów (sekrecja II) [29, 54]. Sekrecja zwykle zachodzi równolegle z agregacją [14]. Silne stymulatory, jak np. trombina (wysokie stężenia), powodują pełną odpowiedź komórki, tj. aż do sekrecji II włącznie [29, 30], słabe – takie jak np. adrenalina – indukują tylko agregację bez zmiany kształtu, zaś w obecności serotoniny i wazopresyny nie obserwuje się sekrecji z lizosomów [29]. Z kolei niskie stężenia niektórych agonistów, np. ADP (1,5 μ M), wywołują zmianę kształtu i tzw. odwracalną agregację [14, 94].

TABELA 1. Stymulatory płytek krwi (sporządzono na podstawie pozycji literaturowych [24, 30, 41, 86, 94])

Konglomeraty cząsteczek	włókna kolagenu, polistyren, szkło, cząstki lateksu
Enzymy proteolityczne	trombina, trypsyna
Substancje drobnocząsteczkowe	ADP, adrenalina, serotonina, GTP γ S, wazopresyna, A1F $^+$
Lipidy	kwas arachidonowy, TxA $_2$, PgD $_2$, PgG $_2$, PgH $_2$, czynnik aktywujący płytki krwi – PAF, stabilny analog TxA $_2$ - U466119
Jonofory wapniowe	A23187, jonomycyna
Aktywatory kinazy białkowej C	estry forbolu, 1-oleilo-2-acetyloglicerol

Pełna odpowiedź płytek krwi, aktywowanych kolagenem, ADP czy niskimi stężeniami trombiny, zależy od uruchomienia przez stymulatory syntezy TxA $_2$, PgG $_2$ i PgH $_2$ (z uwalnianego z fosfolipidów błonowych kwasu arachidonowego) oraz od wyrzucenia (sekrecja I) na zewnątrz komórki zmagazynowanego w ziarnistościach gęstych ADP [14, 41, 86, 94]. Sekrecja może przebiegać bez uruchomienia metabolizmu kwasu arachidonowego, jeśli płytki krwi stymuluje się wysokimi stężeniami trombiny lub kolagenu [14]. W tym przypadku sekrecja rozpoczyna się natychmiast po zmianie kształtu: przebiega równolegle z agregacją lub jeśli płytki nie są mieszane, może nawet zachodzić bez procesu agregacji.

Szczegółowe omówienie odpowiedzi płytek krwi znajdzie Czytelnik w artykule przeglądowym [86].



Rys. 1. Aktywacja płytek krwi in vitro, zapis, zmiany morfologiczne i biochemiczne: schematycznie przedstawiony zapis aktywacji płytek krwi wykonany za pomocą agregometru optycznego; instrument mierzy zmiany transmisji światła (600 nm) przechodzącego przez zawiesinę mieszanych komórek w 37°C; transmisja rośnie, kiedy płytki krwi agregują; zmiana kształtu widoczna jest jako szybki i przejściowy wzrost transmisji światła; zmiany morfologiczne obejmują przekształcenie dyskoidalnych komórek w kuliste z pseudopodiami i z przemieszczonymi do środka ziarnistościami (zmiana kształtu); zawarte w ziarnistościach substancje uwalniane są do środowiska (sekrecja); po sekrecji lub równoległe z nią płytki krwi zlepiają się (agregują); prawie natychmiast (milisekundy) po dodaniu stymulatora rośnie w cytoplazmie płytek krwi poziom Ca^{2+} ; w ciągu następujących 10 s rozpoczyna się polimeryzacja aktyny i aktywacja miozyny; powstałe filamenty aktyny i aktomiozyna umożliwiają reorganizację cytoszkieletu

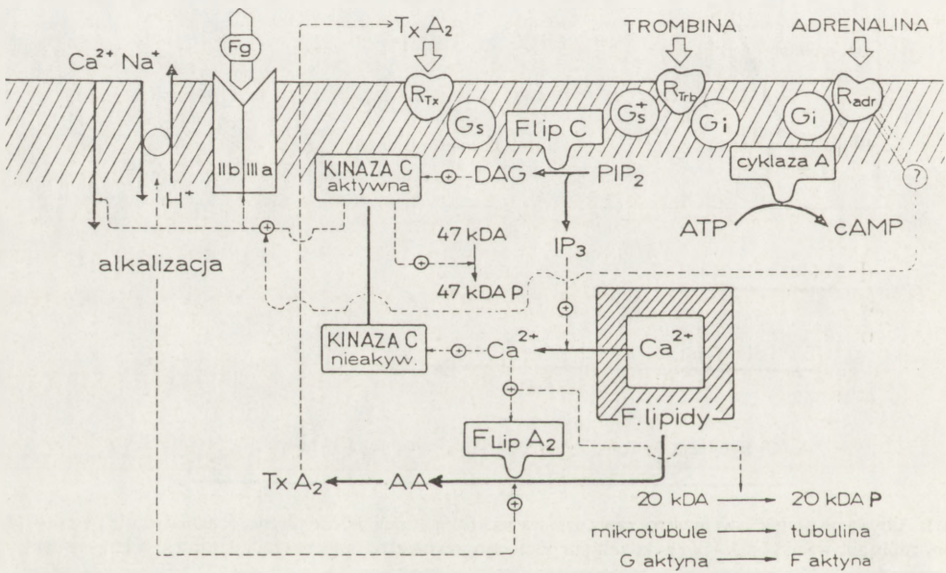
MECHANIZM TRANSDUKCJI SYGNAŁU W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Aktywacja płytek krwi rozpoczyna się od interakcji jednego lub więcej agonistów ze zlokalizowanymi w błonie plazmatycznej receptorami i zwykle kończy się na sekrecji zawartości ziarnistości, ekspresji receptorów fibrynogenu i na powstawaniu powiązanych przez fibrynogen wielokomórkowych agregatów płytkowych [11, 24, 95]. Proces aktywacji

jest wypadkową procesów stymulacji i hamowania (patrz "Rola kinazy białkowej C"), zachodzących równolegle w aktywowanej płytce krwi i obejmujących następujące zmiany:

- stężenia jonów wapnia w cytosolu,
- szybkości metabolizmu fosfolipidów błonowych,
- stopnia ufosforylowania wielu białek,
- stężenia cAMP.

Kompleksy receptorowe na powierzchni płytki krwi są sprzężone poprzez specyficzne białka *G* z fosfolipazą *C* [11, 24, 77], fosfolipazą *A*₂ [11, 74], cyklazą adenylnową [11, 17], a być może także kanałami jonowymi [24]. Sugeruje się, że w płytkach krwi jeden kompleks receptorowy może być powiązany poprzez różne specyficzne białka *G* nawet z więcej niż jednym efektem [11] (rys. 2).



Rys. 2. Model mechanizmu aktywacji płytek krwi: R_{Tx} , R_{Trb} , R_{Adr} – receptory (błona komórkowa) odpowiednio dla tromboksanu A_2 , trombiny i adrenaliny; Ib i $IIIa$ – luźno rozmieszczone w błonie glikoproteidy, tworzące w czasie aktywacji komórki kompleksy Ib - $IIIa$ będące receptorami fibrynogenu (Fg); G_s i G_s^+ – białka *G* łączące fosfolipazę *C* ($Flip C$) odpowiednio z receptorami: TxA_2 i trombiny; powodują aktywację enzymu; G_i – białka *G* łączące receptory trombiny i adrenaliny z cyklazą adenylnową (cyklaza *A*); powodują hamowanie enzymu; spadek poziomu cAMP ułatwia powstanie sygnału wapniowego, PIP_2 – fosfolipidy inozytowe degradowane przy udziale aktywnej fosfolipazy *C* do inozytolo-trifosforanu (IP_3) i diacyloglicerolu (DAG); *F*-lipidy – zmagazynowane w błonach retikulum fosfolipidy, z których aktywna fosfolipaza A_2 ($Flip A_2$) uwalnia kwas arachidonowy (AA) następnie przekształcany do tromboksanu A_2 (TxA_2); 20 kDA i 20 kDAP – nieufosforylowany i ufosforylowany substrat kinazy białkowej *C*; Na^+/H^+ – układ wymiany zewnątrzkomórkowego Na^+ na wewnątrzkomórkowy H^+ powodujący alkalizację cytoplazmy

Aktualnie akceptowany przez większość autorów [11, 24, 41, 56, 94] model aktywacji płytek krwi przedstawiono na rysunku 2. Należy tu zaznaczyć, że mimo pewnych odrębności mechanizm aktywacji tych komórek przez większość naturalnych agonistów jest bardzo podobny. Hipoteza Nishizuki [55, 56] zakłada, że aktywacja komórki (także płytki krwi) związana jest ze wzrostem aktywności fosfolipazy *C*. Enzym ten hydrolizuje zmagazyno-

wane w błonach fosfolipidy inozytowe, z których powstają dwa rodzaje wtórnych przekazników, tj. pozostający w błonie diacyloglicerol i przechodzące do cytosolu rozpuszczalne fosforany inozytolu. Te ostatnie powodują uwalnianie Ca^{2+} z magazynów komórkowych, co wraz z otwarciem kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej doprowadza do gwałtownego (1–2 s), przejściowego (kilka sekund do 1 min) wzrostu wolnego Ca^{2+} w cytoplazmie (sygnał wapniowy). Przyjmuje się, że sygnał wapniowy indukuje w płytkach krwi następujące procesy:

- a) depolimeryzację mikrotubul do tubuliny (umożliwia to zmianę kształtu);
- b) powstawanie filamentów aktynowych; umożliwia to powstawanie włókienek aktomiozynowych, co jest istotne dla procesu centralizacji ziarnistości, powstawania pseudopodiów i agregacji;
- c) aktywację kinazy lekkiego łańcucha miozyny przy udziale kalmoduliny (kinaza ta aktywuje miozynę poprzez fosforylację jej lekkiego – 20 kDa łańcucha), co umożliwia powstanie aktomiozyny;
- d) aktywację fosfolipazy A_2 (enzym uwalnia zmagazynowany w fosfolipidach błonowych kwas arachidonowy, następnie szybko przekształcany do TxA_2 , który po opuszczeniu komórki powoduje amplifikację sygnału wapniowego poprzez dalszą aktywację fosfolipazy C (rys. 2);
- e) przemieszczanie nieaktywnej kinazy białkowej C do błony, gdzie jest aktywowana przy udziale diacyloglicerolu (rys. 2).

Z kolei drugi przekaznik wtórny, tj. diacyloglicerol wraz z jonami wapnia aktywuje kinazę białkową C . Aktywna kinaza białkowa C jest konieczna do agregacji i sekrecji, lecz nie do wywołania zmiany kształtu płytek [24]. Dodanie do zawiesiny płytek krwi estrów forbolu lub analogów diacyloglicerolu penetrujących błonę powoduje ich powolną agregację, słabą sekrecję i ledwie widoczną (lub wcale) zmianę kształtu [11, 24]. Te same aktywatory kinazy białkowej C powodowały pełną odpowiedź komórek (zmiana kształtu, agregacja i sekrecja) podobną do tej, jaką wywołuje trombina – jeśli je podano wraz z niewielkimi stężeniami jonoforu A23187 [24, 43, 92]. W badaniach tych obserwowano jednoczesną, intensywną fosforylację białka o masie 47 kDa (substrat kinazy białkowej C) i białka o masie 20 kDa (lekki łańcuch miozyny fosforylowany przy udziale kinazy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny), ale tylko w obecności aktywatorów kinazy białkowej C i jonoforu A23187 . Na tych obserwacjach oparte jest kolejne założenie hipotezy Nishizuki, który zakłada, że sama aktywacja kinazy białkowej C nie wystarcza do wywołania pełnej odpowiedzi płytek krwi i tylko synergistyczne działanie kinazy białkowej C i jonów wapnia wywołuje maksymalny efekt stymulujący [24, 56].

ROLA BIAŁEK G W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Białka G pośredniczą w przepływie informacji od jednostki akceptorowej do jednostki katalitycznej kompleksu receptorowego [11, 13, 17]. Pierwszymi białkami G znalezionymi w płytkach krwi były jednostki regulacyjne G_i i G_s kompleksu receptorowego wytwarzającego cykliczny AMP [17]. Istnieje również powszechnie akceptowany pogląd, zakładający występowanie w płytkach krwi wysoce specyficznych białek G (innych niż G_i i G_s , regulujące cyklazę adenylanową), wiążących funkcjonalnie wiele receptorów na powierzchni

blony ze znajdującą się w komórce fosfolipazą *C* [11, 24, 77]. Pogląd ten potwierdzają następujące obserwacje:

a. W permeabilizowanych płytkach krwi *GTP* i jego stabilny analog *GTP* γ *S* stymulują, zaś *GDP* β *S* (stabilny analog *GDP*) hamuje powstawanie diacyloglicerolu i sekrecję z ziarnistości [11, 24, 25, 37]. *GTP* γ *S* i *GDP* β *S* łączą się z podjednostką α powodując odpowiednio jej nieodwracalną aktywację lub unieczynnienie.

b. W permeabilizowanych płytkach *GDP* β *S* hamuje hydrolizę fosfolipidów inozytowych i sekrecję z ziarnistości, indukowaną trombiną i stabilnym analogiem TxA₂ – tzw. U46619 [12].

c. W preparatach błon izolowanych z ludzkich [2] i króliczych płytek [31] trombina i *GTP* γ *S* aktywują fosfolipazę *C*.

d. Toksyna krztuśca (*Bordetella pertusis*) hamuje w układzie rekonstruowanym (pęcherzyki błonowe zdolne do akumulacji Ca²⁺) uwalnianie Ca²⁺ indukowane trombiną [58]. Toksyna krztuśca *ADP*-rybozyluje podjednostkę α jednostki *Gi* i w ten sposób ją unieczynnia [19].

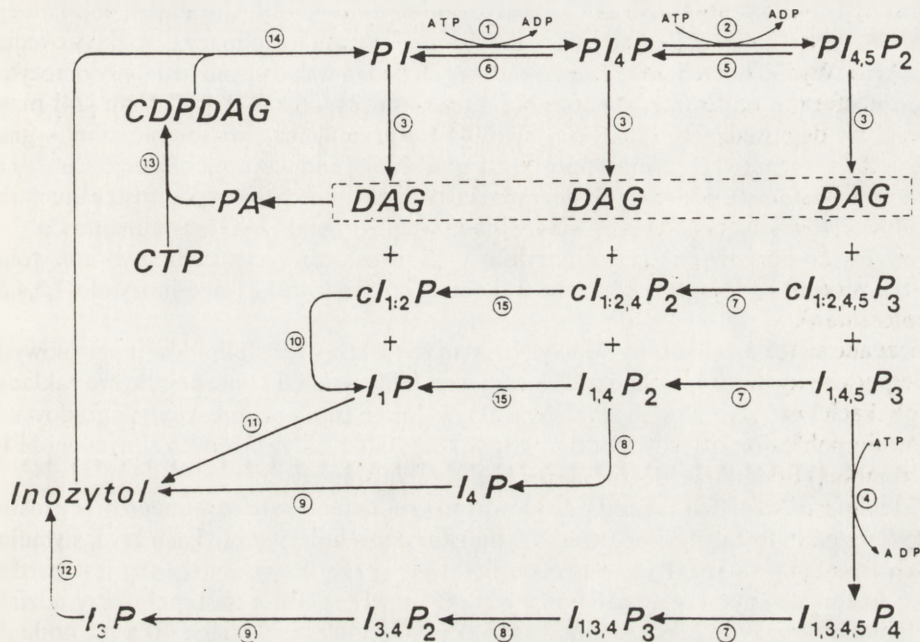
Jednak udział białek *G* w regulacji fosfolipazy *C* w płytkach krwi nie jest jeszcze ostatecznie przesądzony [11, 24]. Próby identyfikacji białka(ek) z zastosowaniem toksyny krztuśca nie powiodły się [11, 24]. Niektórzy autorzy kwestionują zasadność użycia *GDP* β *S* jako specyficznego inhibitora białka *G* [40]. Ostatnio pewne nadzieje wiąże się ze znanymi w płytkach krwi kilkoma rodzajami białek *G* o nieznannej jeszcze funkcji [57].

Innym enzymem, którego aktywność jest w płytkach krwi kontrolowana przez białka *G*, jest – jak się przypuszcza – fosfolipaza A₂ [11, 18, 53, 74]. Wprawdzie enzym ten występuje w płytce krwi głównie w cytosolu, gdzie aktywowany jest przez Ca²⁺ i przez wywołany stymulacją układu wymiany Na⁺/H⁺ wzrost pH cytosolu, ale jego błonowa odmiana, jak sądzą niektórzy autorzy, może być aktywowana bezpośrednio przez bliżej jeszcze nieznanne białko *G* [11, 18, 53, 74].

ROLA FOSFOLIPAZY C W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Aktywacja płytek krwi związana jest z bardzo szybką degradacją i resyntezą zmagazynowanej w błonie plazmatycznej niewielkiej (ok. 5% całkowitej ilości fosfolipidów) frakcji fosfolipidów zawierających w swoich cząsteczkach inozytol [24, 42]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa fosfolipaza *C*. W odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały enzym ten w płytkach krwi bardzo szybko (sekundy) hydrolizuje fosfolipidy inozytowe do DAG i kilku różnych rozpuszczalnych w wodzie fosforanów inozytolu [5, 42, 49] (rys. 3). Po hydrolizie DAG nadal pozostaje w błonie, natomiast fosforany inozytolu przechodzą do cytosolu [56]. Produkty degradacji fosfolipidów inozytowych pojawiają się w płytce na krótko (kilka sekund do 1 minuty), po czym ich poziom szybko spada [44, 49]. Fosforany inozytolu przekształcane są do nieczynnego inozytolu, zaś DAG ulega deacylacji lub fosforylacji [44]. Deacylacja DAG przy C2 prowadzi do uwolnienia kwasu arachidonowego i powstania monoacyloglicerolu, z którego w wyniku fosforylacji tworzy się kwas lizofosfatydowy [44, 60]. Powstały w wyniku fosforylacji kwas fosfatydowy jest następnie wykorzystywany do odtworzenia fosfolipidów inozytowych (rys. 3). Niektóre fosforany inozytolu

powodują uwalnianie Ca^{2+} z magazynów komórkowych [24], kwasy: fosfatydowy i lizofosfatydowy mają, jak sądzą niektórzy autorzy, właściwości jonoforu wapniowego [4, 44], zaś uwolniony kwas arachidonowy może być substratem do produkcji TxA_2 [44].



Rys. 3. Metabolizm fosfolipidów inozytowych i fosforanów inozytoli w aktywowanej płytce krwi: PI – fosfatydyloinozytol; PI₄P – fosfatydyloinozytolo-4-fosforan; PI_{4,5}P₂ – fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan; DAG – diacyloglicerol; PA – kwas fosfatydowy; CDPDAG – CDP – diacyloglicerol; cI_{1:2}P – cykliczny myo-inozytolo-1,2-monofosforan; cI_{1:2,4}P₂ – cykliczny myo-inozytolo-1:2,4-difosforan; cI_{1:2,4,5}P₃ – cykliczny myo-inozytolo-1:2,4,5-trifosforan; I₁P – myo-inozytolo-1-fosforan; I_{1,4}P₂ – myo-inozytolo-1,4-difosforan; I_{1,4,5}P₃ – myo-inozytolo-1,4,5-trifosforan; I_{1,3,4,5}P₄ – myo-inozytolo-1,3,4,5-czterofosforan; I_{1,3,4}P₃ – myo-inozytolo-1,3,4-trifosforan; I_{3,4}P₂ – myo-inozytolo-3,4-difosforan; I₃P – myo-inozytolo-3-monofosforan; I₄P – myo-inozytolo-4-monofosforan; nazwy enzymów: 1 – kinaza PI; 2 – kinaza PI₄P; 3 – fosfolipaza C; 4 – 3-kinaza I_{1,4,5}P₃; 5 – 5-fosfataza PI_{4,5}P₂; 6 – fosfataza PI₄P; 7 – 5-fosfomonoesteraza; 8 – 1-fosfomonoesteraza; 9 – 4-fosfomonoesteraza; 10 – hydrolaza cI_{1:2}P; 11 – fosfataza I₁P; 12 – fosfataza I₃P; 13 – CTP-diacyloglicerolo-3-fosfatydylo-transferaza; 14 – CDPDAG-fosfatydyloinozytolo-transferaza; 15 – 4-fosfomonoesteraza

Wzrost aktywności fosfolipazy C obserwowano w płytkach krwi stymulowanych trombiną [62, 84, 90], czynnikiem aktywującym płytki [71], wazopresyną [70] i kolagenem [59, 90]. Wzrost ten obserwowano przy zahamowanej (przez dodanie aspiryny lub indometacyny) produkcji TxA_2 , co dowodzi, że stymulatory te aktywują fosfolipazę C bezpośrednio. Jednak te same stymulatory powodowały dużo większy wzrost aktywności fosfolipazy C przy niezahamowanej syntezie TxA_2 , co może sugerować, że obecność TxA_2 może w aktywowanej płytce krwi stymulować enzym [59, 67]. Inaczej zachowywały się płytki krwi stymulowane jonoforem A23187 [62]. W tym przypadku zwiększoną aktywność fosfolipazy C obserwowano tylko przy niezahamowanej syntezie TxA_2 . Obserwacje te sugerują, że aktywacja fosfolipazy C w stymulowanej płytce krwi nie jest konsekwencją wzrostu pozio-

mu Ca^{2+} w cytosolu, a związana jest raczej z zajęciem (w tym wypadku przez TxA_2) receptora powiązanego funkcjonalnie z fosfolipazą C [62].

Mimo wielu kontrowersji wydaje się, że substratami fosfolipazy C w aktywowanej płytce krwi mogą być (w różnym stopniu) wszystkie fosfolipidy inozytowe, tj. fosfatydyloinozytol, fosfatydyloinozytolo-4-fosforan i fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan [24, 48]. Istnieją też kontrowersje co do najważniejszego ilościowo substratu fosfolipazy C w aktywowanej płytce krwi. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują na fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforan i na fosfatydyloinozytolo-4-fosforan [24, 68, 70, 80]. Haslam [24] przypuszcza, że degradacja fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu może wytwarzać silny sygnał DAG i słaby sygnał Ca^{2+} (inozytolo-difosforan słabiej indukuje mobilizację Ca^{2+} niż inozytolo-trifosforan), podczas gdy degradacja fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu może powodować równoległą aktywację kinazy białkowej C (sygnał DAG), uwalnianie Ca^{2+} z magazynów komórkowych (myo-inozytolo-1,4,5-trifosforan i cykliczny myo-inozytolo-1,4,5-trifosforan) bądź jego wchodzenie do komórki ze środowiska (myo-inozytolo-1,3,4,5-czterofosforan).

Nieznane są też mechanizmy odpowiedzialne za to, który z fosfolipidów inozytowych jest degradowany przez fosfolipazę C. Siess i wsp. [68] wysunęli koncepcję, która zakłada, że w płytkach krwi, stymulowanych słabym aktywatorem (np. wazopresyną), degradowane są głównie polifosfoinozytydy, podczas gdy w komórkach aktywowanych silnym agonistą (np. trombiną) dodatkowo degradowany jest fosfatydyloinozytol.

Rittenhouse i wsp. [80] sugerują, że głównymi produktami katalizowanego przez fosfolipazę C rozpadu fosfatydyloinozytolo-4,5-difosforanu w ludzkich płytkach krwi, stymulowanych trombiną, są $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ i niewielkie ilości $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$. Powstały $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ jest bardzo szybko fosforylowany przy udziale kinazy $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ do $\text{I}_{1,3,4,5}\text{P}_4$, a następnie przy udziale 5-fosfomonoesterazy przekształcany do $\text{I}_{1,3,4}\text{P}_3$. W rezultacie w ciągu 10 s od podania trombiny obserwowano kilkakrotny wzrost stężenia $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ i $\text{I}_{1,3,4}\text{P}_3$ (więcej $\text{I}_{1,3,4}\text{P}_3$ niż $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$). Obserwowany wzrost stężenia $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ (pięciokrotny w stosunku do podstawowego) jest wystarczający do uwolnienia Ca^{2+} z komórkowych magazynów wapniowych. Dłuższa inkubacja płytek krwi z trombiną (do 60 s) powodowała wzrost udziału $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$ i spadek ilości $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ w całkowitej puli powstałych fosforanów inozytolu. Prawdopodobnie dzieje się tak, dlatego że $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$ nie może być przekształcany do $\text{I}_{1,3,4}\text{P}_3$ (kinaza $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ jest bardzo specyficzna), a 5-fosfomonoesteraza zbyt wolno usuwa nagromadzony $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$. Reasumując, kolejność zdarzeń jest następująca. Hydroliza PIP_2 przy udziale aktywnej fosfolipazy C powoduje bardzo szybkie nagromadzenie $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ i $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$. Ten ostatni związek jest jednak tylko bardzo wolno hydrolizowany do $\text{cI}_{1:2,4}\text{P}_2$ (przy udziale 5-fosfomonoesterazy), co w konsekwencji doprowadza do powolnego wzrostu stężenia tego związku. Z kolei $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ jest niezwykle szybko zamieniany do $\text{I}_{1,3,4,5}\text{P}_4$. Ponieważ $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ i $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$ są, jak to wykazano, zdolne do mobilizacji Ca^{2+} z magazynów komórkowych [5, 34, 91], zaś $\text{I}_{1,3,4,5}\text{P}_4$ do ułatwienia wchodzenia Ca^{2+} ze środowiska do wnętrza komórki [34], przypuszcza się, że w pierwszych sekundach po aktywacji komórki następuje najpierw uwalnianie Ca^{2+} z magazynów komórkowych przy udziale głównie $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$, następnie dochodzi do stymulacji wchodzenia Ca^{2+} ze środowiska przy udziale $\text{I}_{1,3,4,5}\text{P}_4$ i wreszcie ciągle rosnące stężenie wolno degradowanego $\text{cI}_{1:2,4,5}\text{P}_3$ powoduje jakby przedłużenie czasu utrzymywania się podwyższonego poziomu Ca^{2+} w komórce być może nawet wtedy, kiedy poziom $\text{I}_{1,4,5}\text{P}_3$ osiągnie stężenie bazalne.

Rysunek 3 przedstawia zaproponowany w 1987 r. [24] prawdopodobny cykliczny tor przemian fosfatydyloinozytoli w aktywowanej płytce krwi.

KINAZA BIAŁKOWA C I JEJ ROLA W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Kinaza białkowa C należy do grupy kinaz serynowo-treoninowych i do podgrupy kinaz zależnych od Ca^{2+} i fosfolipidów. W obecności Ca^{2+} i fosfatydyloseryny enzym przenosi resztę kwasu fosforowego z ATP na serynę lub treoninę specyficznych (różnych w różnych komórkach) białek [55, 56]. Dodanie sn-1,2-diacyloglicerolu (DAG) do układu zawierającego ATP, kinazę białkową C i substrat (in vitro, najczęściej histon III-S) powoduje dalszą aktywację enzymu przy jednoczesnym obniżeniu koniecznego do jego aktywacji stężenia Ca^{2+} do wartości fizjologicznych (stan spoczynkowy), tj. 0,1–1,0 μM [24, 55, 56].

Z ludzkich płytek krwi wyizolowano dwa izoenzymy kinazy białkowej C [32, 82, 87]. Izoenzymy te mogą być wymywane z kolumny z hydroksylapatytem takim samym stężeniem fosforanu jak typ II i III kinazy białkowej C z mózgu. Ostatnio wykazano, że jeden z tych izoenzymów ma własności kinetyczne identyczne z typem III kinazy białkowej C z mózgu królika [82]. Natomiast własności kinetyczne drugiego izoenzymu były inne niż któregokolwiek z trzech izoenzymów kinazy białkowej C z mózgu. Izoenzym ten był mało wrażliwy na brak jonów wapnia i tylko b. słabo aktywowany był przez diacyloglicerol i fosfatydyloserynę [82].

W roku 1975 Lyons i wsp. [47] po raz pierwszy zaobserwowali, że trombina stymuluje fosforylację dwu różnych białek w płytkach krwi. Dalsze badania wykazały, że podobny efekt wywierał kolagen i jonofor A23187 [28]. Jedno z tych białek o masie ok. 47 000 nazwano P47 [27, 28, 33] lub płytkowym białkiem 40K [55, 65]. Nishizuka i wsp. uważają, że białko P47 jest specyficznym i najważniejszym substratem kinazy białkowej C w płytkach krwi [55, 56, 65]. Fosforylacja tego białka jest w płytkach krwi dobrze skorelowana z agregacją i reakcją uwalniania [26, 27, 65]. Białko P47 zostało niedawno oczyszczone i częściowo scharakteryzowane przez Haslama i wsp. [33, 83].

Drugim białkiem, intensywnie fosforylowanym w aktywowanej płytce krwi jest lekki łańcuch miozyny (białko 20 kDa), który jest również substratem kinazy lekkiego łańcucha miozyny zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny [24, 36]. Jednak aktywna kinaza białkowa C fosforyluje białko 20 kDa w innym miejscu, niż czyni to kinaza zależna od kalmoduliny. Innymi, różnymi od P47 substratami kinazy białkowej C może być, jak to ostatnio sugerują niektórzy autorzy, grupa białek o masie 39–41 kDa [24]. Przypuszcza się, że jednym z tych białek jest białko G łączące receptor(y) aktywatorów płytek krwi z fosfolipazą C [35].

Mechanizm aktywacji kinazy białkowej C przez Ca^{2+} i DAG w płytkach krwi jest identyczny z opisanym w 1986 r. przez Bella [3]. Istnienie takiego mechanizmu aktywacji kinazy białkowej C w płytkach krwi potwierdzają ostatnie badania Siess i Lapetiny [69]. Kinaza białkowa C jest tak długo aktywna, jak długo obecny jest DAG. DAG jest w ludzkich płytkach krwi fosforylowany przy udziale kinazy diacyloglicerolowej [8]. W ten sposób kończy się sygnał potrzebny do aktywacji enzymu.

Aktualnie istnieje powszechnie akceptowany pogląd zakładający, że aktywacja kinazy białkowej C jest konieczna do agregacji i sekrecji, lecz nie do wywołania zmiany kształtu

(indukują ją Ca^{2+}). Istnieje również zgoda co do tego, że najważniejszym (przynajmniej ilościowo) substratem kinazy białkowej C jest P47 i że fosforylacja P47 jest dobrze skorelowana z agregacją i sekrecją. Jednak mimo wielu prób dotychczas nie udało się dokładnie ustalić, w jaki sposób ufosforylowany P47 kontroluje agregację i sekrecję.

Początkowo sugerowano, że rola kinazy białkowej C ogranicza się tylko do kontrolowania procesów prowadzących do aktywacji płytki krwi. I tak kinazie białkowej C przypisywano pewną rolę w regulacji ekspresji GP IIb – GP IIIa (receptory fibrynogenu, patrz rys. 2) w aktywowanej płytce krwi [66]. Jednak rola kinazy białkowej C w tym procesie wydaje się być nadal niejasna, gdyż ADP i adrenalina, które bezpośrednio nie aktywują fosfolipazy C (a tym samym i kinazy białkowej C) powodują ekspresję receptorów fibrynogenu [24].

W roku 1987 Halenda i wsp. [20] zaproponowali możliwość udziału kinazy białkowej C w regulacji uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych przez fosfolipazę A₂. Prawdopodobny mechanizm tej regulacji miałby polegać na fosforylacji lipokortyny przy udziale aktywnej kinazy białkowej C. Lipokortynę znaleziono w płytkach krwi, a jej ufosforylowana postać jest nieaktywna [81]. Jej aktywna (tj. nieufosforylowana) postać jest naturalnym inhibitorem fosfolipazy A₂.

Siffert i Akkerman [72] wykazali niedawno, że kinaza białkowa C aktywuje przenośnik Na^+/H^+ znajdujący się w błonie plazmatycznej płytek krwi. Wymiana zewnątrzkomórkowego Na^+ na wewnątrzkomórkowy H^+ doprowadza do bardzo szybkiej alkalizacji cytosolu, co z kolei, jak sugerują autorzy, ma ułatwiać uwalnianie Ca^{2+} z magazynów komórkowych. Sugerowano także udział kinazy białkowej C w regulacji stopnia polimeryzacji aktyny G [23] poprzez fosforylację białka wiążącego aktynę (białko to po ufosforylowaniu jest nieczynne).

Mimo to jednak precyzyjna rola kinazy białkowej C w aktywowanej płytce krwi jest niejasna. Wyniki uzyskane przez wiele grup badawczych wskazują także, że aktywacja kinazy białkowej C (przez estry forbolu i DAG) związana jest z zahamowaniem hydrolizy PIP₂ [24, 63, 88], osłabieniem sygnału wapniowego [39] i przyśpieszeniem degradacji inozytolo-trifosforanu [24], jeśli płytki krwi następnie stymulowano trombiną, kolagenem, PAF, wazopresyną i A1F₄. Ten hamujący wpływ kinazy białkowej C na degradację fosfolipidów inozytolowych obserwowano w płytkach krwi aktywowanych różnymi agonistami (trombina, kolagen, PAF, wazopresyna, A1F₄), co ma sugerować, że hamowanie procesu aktywacji komórki nie następuje na etapie interakcji receptor – agonista [88]. Hamowanie hydrolizy PIP₂ prawdopodobnie zachodzi poprzez fosforylację białek G wiążących receptor z fosfolipazą C lub też poprzez zahamowanie samej fosfolipazy C. Obniżona mobilizacja Ca^{2+} może być spowodowana zahamowaniem hydrolizy PIP₂, z przyśpieszonym wyrzucaniem Ca^{2+} z komórki do środowiska lub też z przyśpieszeniem hydrolizy inozytolo-trifosforanów [16, 24, 51]. Ta ostatnia sugestia wydawała się bardzo atrakcyjna, gdyż zakładała, że kinaza białkowa C fosforyluje 5-fosfomonoesterazę myo-inozytolo-1,4,5-trifosforanu, tj. enzym degradujący czynny IP₃ do nieczynnego (lub b. mało aktywnego) IP₂. Ufosforylowany enzym ulegał aktywacji, przez co powodował szybszą degradację IP₃ i osłabienie sygnału wapniowego. Ponieważ, jak się okazało, enzym ten miał masę cząsteczkową równą 47 kDa, sugerowano, że jest to poszukiwany główny substrat kinazy białkowej C w aktywowanej płytce krwi. Poglądu tego nie podzielają jednak Haslam i wsp. [33, 83], którzy niedawno wykazali, że substratem kinazy białkowej C w płytkach krwi nie jest 5-fosfomonoesteraza myo-inozytolo-1,4,5-trifosforanu, nie jest nim też lipokortyna, czy też jak to wcześniej sugerowano, podjednostka dehydrogenazy pirogronianowej [15].

Niezależnie od tego przypuszczano również, że aktywna kinaza białkowa C w sposób niezależny od cAMP stymuluje magazynowanie Ca^{2+} w błonach gęstego układu kanalików [93].

Przedstawione tu obserwacje sugerują istnienie w procesie aktywacji płytek krwi czegoś w rodzaju ujemnego sprzężenia zwrotnego, w którym to mechanizmie ważną rolę spełnia kinaza białkowa C, która w początkowej fazie aktywacji komórki stymuluje agregację i sekrecję, a w jej późniejszych fazach osłabia ją poprzez zahamowanie hydrolizy PIP_2 i stymulację degradacji IP_3 .

Należy wreszcie wspomnieć o ostatnich obserwacjach Watson i wsp. [89]. Autorzy ci, stosując nowy i jak sądzą bardzo specyficzny inhibitor kinazy białkowej C (staurosporyna), wykazali, że enzym ten nie zmienia aktywności fosfolipazy C i 5-fosfomonoesterazy mioinozytolo-1,4,5-trifosforanu w aktywowanej płytce krwi. Autorzy ci sugerują także, że aktywacja płytek krwi, choć bardzo upośledzona, jest możliwa także bez jakiegokolwiek udziału nie tylko kinazy białkowej C, ale również i kinazy lekkiego łańcucha miozyny. Taką niezależną od kinazy białkowej C aktywację płytek krwi przez kwas arachidonowy, PAF i jonofor A23187 + indometacyna uprzednio sugerowali inni autorzy [24]. Być może kontrowersje dotyczące roli kinazy białkowej C spowodowane są, jak to sugerują Watson i wsp., występowaniem w płytkach krwi więcej niż jednej formy molekularnej tego enzymu.

FOSFOLIPAZA A₂ I JEJ ROLA W PROCESIE AKTYWACJI PŁYTEK KRWI

Fosfolipaza A₂ pełni bardzo ważną rolę w procesie aktywacji płytek krwi, szczególnie tej indukowanej np. przez ADP, adrenalinę lub kolagen [11, 46, 50, 52]. Świadczy o tym choćby fakt, że produkt katalizowanej przez ten enzym reakcji – kwas arachidonowy jest bardzo silnym aktywatorem tych komórek, wywołującym ich pełną odpowiedź [11, 24, 46, 50]. W aktywowanych komórkach enzym ten uwalnia kwas arachidonowy ze zmagazynowanych w błonach fosfolipidów [46, 50]. Kwas arachidonowy jest następnie bardzo szybko metabolizowany m.in. do P_gG_2 i TxA_2 , tj. związków, które mogą aktywować komórkę bezpośrednio poprzez indukcję sygnału Ca^{2+} lub pośrednio poprzez aktywację fosfolipazy C (metabolity kwasu arachidonowego po opuszczeniu komórki aktywują receptory związane funkcjonalnie z fosfolipazą C – por. rys. 2).

Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań wskazują na istnienie dwu form fosfolipazy A₂, tj. formy nierozpuszczalnej, mocno związanej z błoną i formy rozpuszczalnej, prawdopodobnie nie związanej z błoną [28, 45]. Obie formy oczyszczonego enzymu wykazują podobną specyficzność substratową (fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna i w niewielkim stopniu fosfatydocholina), podobne optimum pH (alkaliczne) i są aktywne tylko w obecności milimolowych stężeń Ca^{2+} [28, 45]. Wzajemne relacje między tymi formami fosfolipazy A₂, jak też ich precyzyjna wewnątrzkomórkowa lokalizacja nie są jeszcze znane.

Istnieją też kontrowersje co do lokalizacji tej puli fosfolipidów, z których w aktywowanej płytce krwi uwalniany jest kwas arachidonowy [1].

Mechanizm aktywacji fosfolipazy A₂ nie jest całkowicie jasny. W ludzkich płytkach krwi obserwowano wzrost aktywności fosfolipazy A₂, kiedy komórki aktywowano fizjologicznymi stymulatorami bądź też jonoforem wapniowym – A23187 [50]. Ta ostatnia obserwacja,

jak również fakt, że aktywność oczyszczonego enzymu zależy od obecności jonów wapnia, sugeruje ważną rolę tych jonów w procesie aktywacji enzymu [29, 38]. Potwierdzają to również ostatnie doniesienia, z których wynika, że do aktywacji enzymu *in vivo* konieczny jest nie tylko Ca^{2+} uwolniony z magazynów komórkowych w pierwszej fazie aktywacji komórki, ale także Ca^{2+} , który wchodzi do aktywowanej płytki krwi ze środowiska [9].

Z kolei inni autorzy wykazali niedawno, że w płytkach krwi aktywowanych jonoforem A23187 uwalnianie kwasu arachidonowego przez fosfolipazę A_2 było stymulowane przez aktywatory kinazy białkowej C: estry forbolu i 1-oleilo-2-acetylglicerol [21]. Być może kinaza białkowa C aktywuje enzym, natomiast jony Ca^{2+} pełnią rolę kofaktora.

Pewną rolę w regulacji aktywności enzymu *in vivo* może odgrywać pH. Optimum pH fosfolipazy A_2 leży w zakresie pH 8–10 [46]. Niektórzy autorzy sugerują, że aktywacja płytek krwi związana jest z przyspieszeniem wymiany Na^+/H^+ przez błonę, co prowadzi do alkalizacji wnętrza komórki [73]. W związku z tym przypuszcza się, że aktywacja enzymu w stymulowanej płytce krwi zależy od dwu równoległe zachodzących procesów, tj. mobilizacji Ca^{2+} i od przyspieszenia wymiany Na^+/H^+ [79]. Nie wyklucza się też istnienia formy fosfolipazy A_2 , której aktywność nie zależy od Ca^{2+} . Aktywność takiego enzymu mogłaby być regulowana przez specyficzne białko G [11, 53, 74].

Najważniejszym (ilościowo) metabolitem kwasu arachidonowego w stymulowanej płytce krwi jest bardzo nietrwały ($T_{1/2} = 30\text{--}40$ s) TxA_2 , który samorzutnie przekształca się w trwały TxB_2 [50, 61]. TxA_2 indukuje wszystkie odpowiedzi płytki krwi (zmiana kształtu, agregacja i sekrecja).

Mechanizm(y) stymulacji płytek krwi przez TxA_2 nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony. Wiadomo, że izolowana frakcja błon płytkowych bogata w błony gęstego układu kanalików produkuje TxA_2 i uwalnia Ca^{2+} po dodaniu egzogenego kwasu arachidonowego [46]. Badania z zastosowaniem Quin 2 i chlorotetracykliny (wskaźniki fluorescencyjne stosowane do oznaczania Ca^{2+} odpowiednio w cytosolu i związanego w błonach) wykazały, że również w stymulowanej płytce krwi TxA_2 powoduje wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu bądź to w wyniku uwalniania Ca^{2+} z błon, bądź też poprzez otwarcie zależnych od receptorów kanałów wapniowych w błonie plazmatycznej [10, 22, 24]. Biorąc pod uwagę fakt, że w płytkach krwi zmagazynowane jest bardzo dużo kwasu arachidonowego, TxA_2 może być ważnym czynnikiem utrzymującym w cytosolu przez dłuższy czas wysoki poziom Ca^{2+} . Ostatnio pojawiły się sugestie, że TxA_2 może aktywować płytkę krwi również w sposób niezależny od wzrostu stężenia Ca^{2+} [24, 75].

Sugeruje się, że mobilizacja Ca^{2+} przez TxA_2 związana jest z wiązaniem się TxA_2 z jego specyficznym receptorem znajdującym się w błonach układu kanalików gęstych [10, 85].

TxA_2 prawdopodobnie nie jest też jedynym metabolitem kwasu arachidonowego powodującym aktywację płytek krwi, gdyż zahamowanie syntetazy tromboksanowej przez dazoksyben niekoniecznie związane jest z hamowaniem agregacji płytek krwi. W związku z tym przypuszcza się, że TxA_2 może być zastąpiony przez Pgd_2 [6].

LITERATURA

- [1] ADAMS GA. Platelet aggregation. [w] The platelets: physiology and pharmacology. (red.) Longenecker G, Academic Press Inc., 1985: 1–14.
- [2] BALDASSARE JJ, FISHER GJ. Regulation of membrane-associated and cytosolic phospholipase C activities in human platelets by guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 1986; **261**: 11942–11944.
- [3] BELL R. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 1986; **45**: 631–632.
- [4] BENTON AM, GERRARD JM, MICHIEL T, KINDOM SE. Are lysophosphatidic acids or phosphatidic acids involved in stimulus activation coupling in platelets? *Blood* 1982; **60**: 642–649.
- [5] BERRIDGE MJ, IRVINE RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; **341**: 1–9.
- [6] BERTELE V, FALANGA A, TOMASIAK M, CHIABRANDO C, CERLETTI C, DE GAETANO G. Pharmacologic inhibition of thromboxane synthetase and platelet aggregation: modulatory role of cyclooxygenase products. *Blood* 1984; **63**: 1460–1466.
- [7] BILLAH MM, LAPETINA EG, CAUTRECAŞAS P. Phospholipase A₂ and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity. Ca²⁺ requirement, pH dependence, and cellular localization. *J Biol Chem* 1980; **255**: 10227–10231.
- [8] BISHOP WR, GANONG BR, BELL R. Attenuation of sn-1,2 diacylglycerol second messengers by diacylglycerol kinase. *J Biol Chem* 1986; **261**: 6993–7000.
- [9] BLACKIE D, CIVATTI M. Rat platelet arachidonate metabolism in the presence of Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺: studies using intact platelets semi-purified phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1987; **921**: 541–551.
- [10] BRACE LD, VENTON DL, LE BRETON GC. Thromboxane A₂/prostaglandin H₂ mobilizes calcium in human blood platelets. *Am J Physiol* 1985; **249**: H1–H7.
- [11] BRASS LF. Regulation of biological responses in platelets. [w] Meyer P, Marche P (red.) Blood cells and arteries in hypertension and atherosclerosis. New York: Raven Press, 1989: 60–92.
- [12] BRASS LF, SHALLER CC, BELMONTE EJ. IP₃-induced granule secretion in platelets: evidence that the activation of phospholipase C which occurs via thromboxane receptors involves a G protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1269–1275.
- [13] CASEY PJ, GILMAN AG. G protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2577–2580.
- [14] CHARO IF, FEINMAN RD, DETWILER TC. Interrelations of platelet aggregation and secretion. *J Clin Invest* 1977; **60**: 866–873.
- [15] CHIANG TM, HANG ES, HANG AH. Identification of 42K phosphoprotein of platelets modulated by collagen: the α -subunit of pyruvate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1986; **252**: 15–23.
- [16] CONNOLLY TM, LAWING WJ, MAJERUS PW. Protein kinase C phosphorylates human platelet inositol trisphosphate 5'-phosphomono-esterase, increasing the phosphatase activity. *Cell* 1986; **46**: 951–958.
- [17] FERRY N, ADNOT S, INESL PA, HANOUNE J. Le système adénylate cyclasique des plaquettes humaines. *Nouv Rev Fr Hematol* 1983; **25**: 343–353.
- [18] FUSE I, TAI H-H. Stimulations of arachidonate release and inositol 1,4,5-trisphosphate formation are mediated by distinct G-proteins in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 659–665.
- [19] GILMAN AG. G proteins: transducer of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 615–649.
- [20] HALENDA SP, REHM AG. Thrombin and C-kinase activator potentiate calcium-stimulated arachidonic acid release in human platelets. *Biochem J* 1987; **248**: 471–475.
- [21] HALENDA SP, ZAVOICO GB, FEINSTEIN MB. Phorbol esters and oleoyl acetyl glycerol enhance release of arachidonic acid in platelets stimulated by Ca²⁺ ionophore A23187. *J Biol Chem* 1985; **260**: 12484–12491.
- [22] HALLAM TJ, RINK TJ. Agonists stimulate divalent cation channels in the plasma membrane of human platelets. *FEBS Lett* 1985; **186**: 175–179.
- [23] HASHIMOTO K, HASHIMOTO K, IM T, TATSUMI N, OKUDA K, YUKIOKA M. Modulation of actin polymerization by 47,000-Dalton protein of human platelets. *Biochem Inter* 1987; **14**: 759–767.
- [24] HASLAM RJ. Signal transduction in platelet activation. [w] Vestre M, Vermeylen J, Lijnen HR and Arnout J (red). Thrombosis and Haemostasis. Leuven: Int Soc Thromb Haemost and Leuven University Press, 1987: 147–174.
- [25] HASLAM RJ, WILLIAMS KA, DAVIDSON MML. Receptor-effector coupling in platelets: roles of guanine nucleotides. [w] Vestwick J, Scully MF, Mac Intyre DE and Kakkar VV (red). Mechanisms of stimulus-response coupling in platelets. New York: Plenum Publishing Corp, 1985: 265–280.

- [26] HASLAM RJ, DAVIDSON ML. Potentiation by thrombin of the secretion of serotonin from permeabilized platelets equilibrated with Ca^{2+} buffers. *Biochem J* 1984; **222**: 351–361.
- [27] HASLAM RJ, LYNHAM JA. Relationship between phosphorylation of blood platelet proteins and secretion of platelet granule constituents. Effects of different aggregating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; **77**: 714–722.
- [28] HASLAM RJ, LYNHAM JA, FOX JEB. Effects of collagen, ionophore A23187 and prostaglandin E_1 on the phosphorylation of specific proteins in blood platelets. *Biochem J* 1979; **178**: 397–406.
- [29] HAYAKAWA M, KUDO I, TOMITA M, INOVE K. Purification and characterization of membrane-bound phospholipase A₂ from rat platelets. *J Biochem* 1988; **103**: 263–266.
- [30] HOLMSEN H. Platelet secretion. [w] Haemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman E (red.) JB Lippincott Comp., 1982: 390–403.
- [31] HROBOLICH JK, CULTY M, HASLAM RJ. Activation of phospholipase C associated with isolated rabbit platelet membranes by guanine 5'(β -thio) triphosphate and thrombin in the presence of GTP. *Biochem J* 1987; **243**: 457–465.
- [32] HUANG K-P. The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci* 1989; **12**: 425–432.
- [33] IMAOKA T, LYNHAM JA, HASLAM RJ. Purification and characterization of the 47,000-dalton protein phosphorylated during activation of human platelets. *J Biol Chem* 1983; **258**: 11404–11414.
- [34] IRVINE RF, LETCHER AJ, HESLOP JP, BERRIDGE MJ. The inositol tris/tetrakis phosphate pathway – demonstration of Ins-(1,4,5) P_3 3-kinase activity in animal tissues. *Nature* 1986; **320**: 631–634.
- [35] KATADA T, GILMAN AG, WATANABE Y, BAUER S, JAKOBS KH. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase. *Eur J Biochem* 1985; **151**: 431–437.
- [36] KAWAMOTO S, BENGUR AR, SELLERS JR, ADELSTEIN RS. In situ phosphorylation of human platelet myosin heavy chains by protein kinase C. *J Biol Chem* 1989; **264**: 2258–2265.
- [37] KNIGHT DE, SCRUTON MC. Effects of guanine nucleotides on the properties of 5-hydroxytryptamine secretion from electroporabilized human platelets. *Eur J Biochem* 1986; **160**: 183–190.
- [38] KRAMER RM, CHECANI GC, DEYKIN A, PRITZKER CR, DEYKIN D. Solubilization and properties of Ca^{2+} -dependent platelet phospholipase A₂. *Biochim Biophys Acta* 1986; **878**: 394–403.
- [39] KRISHNAMURTHI S, JOSEPH S, KAKKAR VV. Synergistic potentiation of 5-hydroxytryptamine secretion by platelet agonists and phorbol myristate acetate despite inhibition of agonist-induced arachidonate/thromboxane and β -thromboglobulin release and Ca^{2+} mobilization by phorbol myristate acetate. *Biochem J* 1986; **238**: 193–199.
- [40] KRISHNAMURTHI S, PATEL Y, KAKKAR VV. Inhibition of agonist-induced platelet aggregation, Ca^{2+} -mobilization and granule secretion by guanine 5'-(β -thio) diphosphate and GDP in intact platelets. *Biochem J* 1988; **250**: 209–214.
- [41] KROLL MH, SCHAFFER AL. Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; **74**: 1181–1195.
- [42] LAPETINA EG. Inositide-dependent and independent mechanism in platelet activation. [w] Phosphoinositides and receptor mechanisms. Putney JW (red), Alan R Liss Inc, 1986: 271–286.
- [43] LAPETINA EG, REEP B, GANONG BR, BELL RM. Exogenous sn-1,2-diacylglycerols containing saturated fatty acids functions as bioregulators of protein kinase C in human platelets. *J Biol Chem* 1985; **260**: 1358–1361.
- [44] LAPETINA EG, WATSON SP. Relative importance of diacylglycerol, phosphatide, lysophosphatide, inositol triphosphate and arachidonate metabolism in platelet receptor signalling. *Nouv Rev Fr Hematol* 1985; **27**: 235–238.
- [45] LOEB LA, GROSS RW. Identification and purification of sheep platelet phospholipase A₂ isoforms. *J Biol Chem* 1986; **261**: 10467–10470.
- [46] LONGENECKER G. Platelet arachidonic acid metabolism. [w] The platelets: physiology and pharmacology. Longenecker G. (red), Academic Press Inc., 1985: 1–14.
- [47] LYONS RM, STANFORD N, MAJERUS PW. Thrombin-induced protein phosphorylation in human platelets. *J Clin Invest* 1975; **56**: 924–936.
- [48] MAJERUS PW, CONNOLLY TM, BANSAL VS, INHORN NC, ROSS TS, LIPS DL. Inositol phosphates: synthesis and degradation. *J Biol Chem* 1988; **263**: 3051–3054.
- [49] MARCHE P. Polyphosphoinositides and cell activation. *Nouv Rev Fr Hematol* 1985; **27**: 239–242.
- [50] MARCUS AJ. The role of lipids in platelet function: with particular reference to the arachidonic acid pathway. *J Lipid Res* 1978; **19**: 793–826.
- [51] MOLINA y VEDIA LM, LAPETINA EG. Phorbol 12,13-dibutyrate and 1-oleoyl 2-acetyl diacylglycerol stimulate inositol triphosphate dephosphorylation in human platelets. *J Biol Chem* 1986; **261**: 10493–10495.

- [52] NAKANO T, TERAWAKI A, ARITA H. Signal transduction in collagen-stimulated rat platelets is composed of three stages. *J Biochem* 1987; **101**: 1169–1180.
- [53] NAKASHIMA S, TOCHIMATSU T, HATTORI H, SUGANUMA A, NOZAWA Y. Guanine nucleotides stimulate arachidonic acid release by phospholipase A₂ in saponin permeabilized human platelets. *J Biochem* 1987; **101**: 1055–1058.
- [54] NIEWIAROWSKI S, HOLT JC. Platelet α -granule proteins: biochemical and pathological aspects [w] The platelets: physiology and pharmacology. Longenecker G (red), Academic Press Inc., 1985: 1–14.
- [55] NISHIZUKA Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; **308**: 693–698.
- [56] NISHIZUKA Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; **233**: 305–312.
- [57] OHMORI T, KIKUCHI A, YAMAMOTO K, KIM S, TAKAI Y. Small molecular weight GTP-binding proteins in human platelet membranes. Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 22 000. *J Biol Chem* 1989; **264**: 1877–1881.
- [58] O'ROURKE, ZAVOICO GB, SMITH LH, FEINSTEIN MB. Stimulus-response coupling in a cell-free platelet membrane system. *FEBS Lett* 1987; **214**: 176–180.
- [59] POLLOCK WK, RINK TJ, IRVINE RF. Liberation of ³H arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in Fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem J* 1986; **235**: 869–877.
- [60] PRESCOT SM, MAJERUS PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of arachidonyl-monoglycerol intermediate. *J Biol Chem* 1983; **258**: 764–769.
- [61] RADOMSKI M, GRYGLEWSKI RJ. Fizjologiczna rola osi megakariocyty płytki krwi w procesie hemostazy naczyniowej. [w] Kawiak J, Osuchowska Z, Przełęcka A (red) Ultrastruktura i funkcja komórki. t. 4, Warszawa PWN, 1989: 111–148.
- [62] RITTENHOUSE SE. Activation of human platelet phospholipase C by ionophore A23187 is totally dependent upon cyclooxygenase products and ADP. *Biochem J* 1984; **222**: 103–110.
- [63] RITTENHOUSE SE, SASSON JP. Mass changes in myo-inositol trisphosphate in human platelets stimulated by thrombin. *J Biol Chem* 1985; **260**: 8657–8661.
- [64] ROSS R, RAINES EW, BOWN-POPE DF. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 1986; **46**: 155–169.
- [65] SANO K, TAKAI Y, YAMANISHI J, NISHIZUKA Y. A role of calcium activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. *J Biol Chem* 1983; **258**: 2010–2013.
- [66] SHATTIL SJ, BRASS LF. Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J Biol Chem* 1987; **262**: 992–1000.
- [67] SIESS W, CUATRECASAS P, LAPETINA EG. A role for cyclooxygenase products in the formation of phosphatidic acid in stimulated human platelets. *J Biol Chem* 1983; **258**: 4683–4686.
- [68] SIESS W. Evidence for the formation of inositol 4-monophosphate in stimulated human platelets. *FEBS Lett* 1985; **185**: 151–156.
- [69] SIESS W, LAPETINA EG. Ca²⁺ mobilization primes protein kinase C in human platelets. Ca²⁺ and phorbol esters stimulate platelet aggregation and secretion synergistically throughout protein kinase C. *Biochem J* 1988; **255**: 309–318.
- [70] SIESS W, STIFEL M, BINDER H, WEBER PC. Activation of V1-receptors by vasopressin stimulates inositol phospholipid hydrolysis and arachidonate metabolism in human platelets. *Biochem J* 1986; **233**: 83–91.
- [71] SIESS W, WEBER PC, LAPETINA EG. Activation of phospholipase C is dissociated from arachidonate metabolism during platelet shape change induced by thrombin or platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1984; **259**: 8286–8292.
- [72] SIFFERT W, AKKERMAN JWN. Protein kinase C enhances Ca²⁺ mobilization in human platelets by activating Na⁺/H⁺ exchange. *J Biol Chem* 1988; **263**: 4223–4227.
- [73] SIFFERT W, AKKERMAN JWN. Activation of sodium-proton exchange is a prerequisite for Ca²⁺ mobilization in human platelets. *Nature* 1987; **325**: 456–458.
- [74] SILK ST, CLEJAN S, WITKOM K. Evidence of GTP-binding protein regulation of phospholipase A₂ activity in isolated human platelet membranes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 21466–21469.
- [75] SIMPSON AWM, HALLAM TJ, RINK TJ. Low concentrations of the stable prostaglandin endoperoxide U44069 stimulate shape change in Quin 2-loaded platelets without a measurable increase in Ca²⁺. *FEBS Lett* 1986; **201**: 301–305.
- [76] SINZIGER H. Role of platelets in atherosclerosis. *Semin in Thromb and Hemostasis* 1986; **12**: 124–133.

- [77] SPIEGEL AM. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. *Mol Cell Endocrinol* 1987; 49: 1–16.
- [78] STENBERG PE, LEVIN J. Mechanism of platelet production. *Blood Cells* 1989; 15: 23–47.
- [79] SWEATT JD, CONNOLLY TM, LIMBIRD LEW. Evidence that Na^+/H^+ exchange regulates receptor-mediated phospholipase A₂ activation in human platelets. *J Biol Chem* 1986; 261: 8667–8673.
- [80] TARVER AP, KING WG, RITTENHOUSE SE. Inositol 1,4,5-trisphosphate are minor components of total mass of inositol trisphosphate in thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1987; 262: 17268–17271.
- [81] TOUQUI L, ROTHHUT B, SHAW AM, FRADIN A, VARGAFTIG BB, RUSSO-MARIE F. Platelet activation – a role for anti-phospholipase A₂ protein indistinguishable from lipocortin. *Nature* 1986; 321: 177–180.
- [82] TSKUDA M, ASAOKA Y, SEIKIGUCHI K, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y. Properties of protein kinase C subspecies in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155: 1387–1395.
- [83] TYERS M, RACHUBINSKI RA, SARTORI CS, HARLEY CB, HASLAM RJ. Induction of the 47 kDa platelet substrate of protein kinase C during differentiation of HL-40 cells. *Biochem J* 1987; 243: 249–253.
- [84] TYSNES O-B, VERHOEVEN AJ, HOLMSEN H. Phosphate turnover of phosphatidylinositol in resting and thrombin-stimulated platelets. *Biochim Biophys Acta* 1986; 889: 183–191.
- [85] USHIKUBI F, NAKAJIMA M, HIRATA M, OKUMA M, FUJIWARA M, NARUMIYA S. Purification of the thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor from human blood platelets. *J Biol Chem* 1989; 264: 16496–16501.
- [86] WACHOWICZ B. Krwinka płytkowa jako komórka sekrecyjna. *Post Biol Kom* 1978; 5: 109–134.
- [87] WATANABE M, HAGIWARA M, ONODA K, HIDAKA H. Monoclonal antibody recognition of two subtype forms of protein kinase C in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 642–648.
- [88] WATSON SP, LAPETINA EG. 1,2-diacylglycerol and phorbol ester inhibit agonist-induced formation of inositol phosphates in human platelets: possible implications for negative feedback regulation of inositol phospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1985; 2623–2626.
- [89] WATSON SP, Mc NALLY J, SHIPMAN LJ, GODFREY P. The action of the protein kinase C inhibitor staurosporine, on human platelets. *Biochem J* 1988; 249: 345–350.
- [90] WATSON SP, REEP B, Mc CONNELL RT, LAPETINA EG. Collagen stimulates ³H inositol trisphosphate formation in indomethacin-treated human platelets. *Biochem J* 1985; 226: 831–837.
- [91] WILSON DB, CONNOLLY TM, BROSS TM, MAJERUS PW, SHERMAN WR, TYLER AN. Isolation and characterization of the inositol cyclic phosphate products of polyphosphoinositide cleavage by phospholipase C. *J Biol Chem* 1985; 260: 13496–13501.
- [92] YAMANISHI J, TAKAI Y, KAIBUCHI K, SANO K, CASTAGNA M, NISHIZUKA Y. Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 778–786.
- [93] YOSHIDA K, STARK F, NACHMIAS VT. Comparison of the effects of phorbol 12-myristate 13-acetate and prostaglandin E₁ on calcium regulation in human platelets. *Biochem J* 1988; 249: 487–493.
- [94] ZUCKER MB, NACHMIAS VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 2–18.
- [95] ZUCKER MB, PETERSON J. Inhibition of adenosine diphosphate-induced aggregation and other platelet functions by acetylsalicylic acid ingestion. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127: 547–551.

Otrzymano: 21 grudnia 1989

Przyjęto: 7 lipca 1990

Adres Autora: ul. A Mickiewicza 2
15-230 Białystok 8

CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORU TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF)

Elwira STASIAKOWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie. TNF jest zasadniczo cytokiną produkowaną przez aktywowane monocyty lub makrofagi i był pierwotnie zidentyfikowany jako czynnik wywołujący martwicę krwotoczną nowotworów *in vivo* i działający cytotoksycznie bądź cytostatycznie na pewne transformowane linie komórkowe *in vitro*. Poza obiecującym działaniem przeciwnowotworowym TNF wpływa też istotnie na różne komórki i tkanki prawidłowe. Ze względu na bardzo zbliżoną aktywność biologiczną w zakresie pojęcia TNF włączana jest często także limfotoksyna, wydzielana przez limfocyty. TNF wydaje się odgrywać ważną rolę jako mediator odczynu zapalnego, wstrząsu endotoksycznego i kacheksji oraz może być zaangażowany w patogenezę wielu chorób. Prawdopodobnie ma on znaczący udział w immunoregulacji, obronie organizmu przeciwko wirusom i infekcjom pasożytniczym. Poniższa praca prezentuje dane na temat jego struktury, produkcji i aktywności biologicznej.

Summary. TNF is a cytokine produced by activated monocytes or macrophages and was originally identified for its ability to cause a hemorrhagic necrosis of tumors *in vivo* and by its cytotoxic or cytostatic effects against certain transformed cell lines *in vitro*. In addition to its promising antitumor effects TNF revealed important influences on various normal cells and tissues. The term TNF often encloses also lymphotoxin, secreted by lymphocytes, because they share most biological activities. TNF appears to play an essential role as a mediator of inflammation, endotoxic shock and cachexia, and can be implicated in the pathogenesis of many diseases. Probably it contribute to immunoregulation, defense against viruses and parasitic infections. The review presents the data on TNF, its structure, production and biological activities.

WSTĘP

W końcu dziewiętnastego wieku nowojorski chirurg William Coley, na podstawie spostrzeżenia, że do spontanicznych regresji nieoperacyjnych nowotworów dochodziło często w przebiegu infekcji bakteryjnych, np. róży, zaczął swoich pacjentów z nowotworami infekować żywymi bakteriami. Wkrótce opracował on specjalny preparat z zabitych paciorkowców i laseczek gram-ujemnych typu *Serratia*, znany później jako toksyna Coleya. Stosowało ją wtedy wielu lekarzy, jednak jej skuteczność była dość zmienna. Niestety, w

latach trzydziestych obiecujące efekty radioterapii praktycznie wstrzymały dalsze prace nad tym preparatem [75, 108].

Dopiero pół wieku później w 1975 r. grupa badaczy z Elizabeth Carswell na czele odkryła, że endotoksyna (zidentyfikowana wcześniej przez Shear i współpracowników jako najaktywniejszy składnik toksyny Coleya) powoduje martwicę nowotworów pośrednio, działając poprzez czynnik wydzielany do krwi przez makrofagi organizmu gospodarza [17]. Czynnik ten nazwano właśnie czynnikiem martwicy nowotworu, czyli TNF (z ang. *tumor necrosis factor*). Szczepionka BCG (*Bacillus Calmette Guerin*) i *Corynebacterium parvum*, powodujące zwiększenie liczby makrofagów w organizmie, dodatkowo nasilały produkcję endogennego TNF, a tym samym przeciwnowotworowy efekt endotoksyny, co też wykorzystywano w początkowych badaniach [11, 17, 75]. Odkrytą w 1975 r. monokinę nazwano dokładniej TNF α w odróżnieniu od TNF β – określenia przypisanego znanej już w latach sześćdziesiątych limfotoksynie (LT). Dalsze rozważania na temat TNF będą odnosiły się głównie do TNF α .

W 1984 r. sklonowano gen dla TNF i ustalono dokładną sekwencję aminokwasową [81, 133]. Dostępność preparatów uzyskanych metodami inżynierii genetycznej spowodowała wręcz lawinę szczegółowych badań.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA I WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNE

STRUKTURA

Podobieństwo działania TNF α i LT (TNF β), która także wywołuje martwicę krwotoczną nowotworów, jak i lizę pewnych transformowanych komórek [31, 80], może wyjaśnić fakt, że obie cytokiny łączą się ze wspólnym receptorem na komórkach docelowych. Sugeruje się, że zazwyczaj słabszy efekt LT wynika z jej mniejszego powinowactwa do tego receptora [33, 93]. Homologia, jaka zachodzi w sekwencji aminokwasowej między TNF α i LT, sięga ok. 30% (28–35%) i jest najsilniejsza w odcinkach C-końcowych tych cząsteczek [80].

Dojrzałe białko LT składa się ze 171 aminokwasów u człowieka i 169 u myszy, a podczas syntezy poprzedzają go odpowiednio 34 i 33 aminokwasy peptydu sygnałowego. Forma monomeryczna ma 25 kd i ma reszty cukrowe, niekonieczne dla aktywności biologicznej. W odróżnieniu od LT, monomer TNF α o masie cząsteczkowej 17 kd ma jeden mostek siarkowy i nie ulega glikozylacji u człowieka, mimo że występuje ona u innych gatunków. Podobnie jak dla LT, glikozylacja nie jest istotna dla działania TNF α . Charakterystyczny jest brak swoistości gatunkowej w jego aktywności. Dojrzałe białko, złożone ze 157 aminokwasów u ludzi i 156 u myszy zachowało w toku ewolucji 79% homologii, zaś sekwencja liderowa (76 aminokwasów u człowieka i 79 u myszy) pozostała bez zmian aż w 86%. W szczególności do najlepiej zachowanych między gatunkami regionów cząsteczki TNF α i β należy odcinek C-końcowy, a delekcje aminokwasów z tego końca znoszą ich aktywność biologiczną [7, 80, 81]. Natomiast delekcja pierwszych 4 i 7 aminokwasów z N-końcowej części ludzkiego TNF α wzmacniała 2–3-krotnie cytotoksyczność względem wrażliwych komórek nowotworowych, nie zwiększając zarazem toksyczności dla komórek

normalnych [22]. Ogólnie delecje N-końcowe nie znoszą aktywności biologicznej TNF α ani LT [8, 80].

Ostatnio, dokładne badania struktury TNF α ujawniły, że jest on aktywny biologicznie w formie zwartego trimeru [45, 112], którego budowa przestrzenna jest niezwykle podobna do układu białek w kapsydzie pewnych wirusów, jak np. adenowirusów, przypominając najbardziej elementy białkowe małych, sferycznych wirusów roślinnych i pikornawirusów, co być może świadczy o wspólnym ewolucyjnie pochodzeniu tych białek [45].

Od niedawna udowodnione wydaje się istnienie dwóch form aktywności biologicznej TNF α . Oprócz uwalnianej z komórki części wydzielniczej (17 kd), cytotoksyczne działanie wywiera też cała prekursorowa cząsteczka TNF (26 kd), tworząca integralne białko błonowe wskutek nieodłączenia 76-aminokwasowej sekwencji sygnałowej. Aby ujawnić swoje cytotoksyczne własności, cząsteczka ta musi być wbudowana w błonę [52]. Najprawdopodobniej w tej właśnie, błonowej postaci TNF jest mediatorem cytotoksyczności aktywowanych makrofagów w bezpośrednim kontakcie z komórką docelową [27, 52].

LOKALIZACJA I EKSPRESJA GENU

Zarówno TNF α , jak i LT są kodowane przez geny zlokalizowane w ramach głównego układu antygenów zgodności tkankowej (MHC – z ang. *major histocompatibility complex*), znajdującego się na 6. chromosomie u człowieka i na 17. u myszy. Oba geny są to pojedyncze kopie, które leżą bardzo blisko siebie, najbliżej locus HLA-B u człowieka i w odległości 70 kb od locus H-2D u myszy. Oddziela je od siebie zaledwie 1100 par zasad. Geny dla obu cytokin składają się z 4 egzonów rozdzielonych przez 3 introny [66, 80, 113]. Prawdopodobnie powstały one z jednego genu, który uległ w toku ewolucji duplikacji kilka setek milionów lat temu [6].

Zasadniczo TNF α ulega syntezie *de novo* i uwalnianiu z makrofagów dopiero po ich aktywacji, w odpowiedzi na endotoksynę. Transkrypcja genu dla TNF α , wykrywalna w spoczynkowych makrofagach, ulega około 3-krotnemu przyspieszeniu, poziom TNF-mRNA wzrasta w komórce 50–100-krotnie, a sekrecja TNF (praktycznie nie wykrywalna bez stymulacji) rośnie ok. 10000 razy [10, 20, 97].

Regulacja biosyntezy na poziomie posttranskrypcyjnym zależy przynajmniej częściowo od charakterystycznej sekwencji mRNA w regionie 3' nie podlegającym translacji, złożonej z zachodzących na siebie i powtarzanych oktamerów UUA UUU AU, obejmującej w sumie 33 nukleotydy. Analogiczna sekwencja występuje w przypadku innych cytokin, w tym: interferonu (IFN), GM-CSF (z ang. *granulocytomacrophage colony stimulating factor*) i interleukiny 1, czyli IL-1 [6, 10, 16]. Przypuszczalnie sekwencja taka decyduje o nasilonej degradacji mRNA, gdyż jak się wydaje, zawiera miejsce rozpoznania dla selektywnej rybonukleazy [12].

Endogennym, hormonalnym czynnikiem regulującym biosyntezę TNF są glukokortykoidy. Deksametazon hamuje syntezę TNF zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji jednak pod warunkiem podania go przed indukcją tej syntezy. W ten sposób wcześniej podane glukokortykoidy mogą chronić przed toksycznym działaniem endotoksyny [10]. Z drugiej strony sam TNF może zwiększać poziom glukokortykoidów, co świadczyłoby o istnieniu fizjologicznej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego [8].

SEKRECJA

TNF wytwarzany jest i uwalniany przez aktywowane monocyty i makrofagi wszystkich typów. Najsilniejszym bodźcem do jego produkcji jest LPS, czyli lipopolisacharyd bakteryjny, będący w istocie endotoksyną. Poza tym może on być produkowany pod wpływem estrów forbolu, wirusów np. Sendai i grypy, produktów lizy *Trypanosoma* i *Plasmodium*, a także po indukcji niektórymi bakteriami gram-dodatnimi, np. gronkowcami [8, 68]. TNF może być uwalniany pod wpływem pewnych bodźców endogennych np. składnika C5a dopełniacza [74], neuropeptydów [60] oraz glikozylowanych nieenzymatycznie białek [130].

Poza makrofagami, również limfocyty produkowały minimalne ilości TNF po indukcji estrami forbolu i jonoforem wapniowym oraz mitogenami [25], a tymocyty w obecności PHA-P i po stymulacji interleukiną 1, 2 i 4 [90]. Komórki NK także mogą wydzielać TNF pod wpływem inkubacji z komórkami nowotworowymi, chociaż TNF nie jest odpowiedzialny za ich cytotoksyczność [83].

Okazało się nawet, że komórki transformowane odporne na TNF produkowały go konstytucyjnie [92], a inne komórki nowotworowe mogą produkować TNF spontanicznie [21] lub pod wpływem egzogenego TNF [72].

Natomiast w odróżnieniu od TNF α , do produkcji limfotoksyny wymagane są zupełnie inne bodźce, a jej zasadniczym źródłem są aktywowane limfocyty T subpopulacji CD4⁺ i DC8⁺. Uwalniają ją one w odpowiedzi na swoiste antygeny, rozpoznawane w sposób zależny od MHC oraz pod wpływem niespecyficzných bodźców mitogennych (ConA, PHA, IL-2) i estrów forbolu. LT może też być indukowane przez wirusy: EBV, HIV, HTLV, SV40. Poza limfocytami T, produkują ją także komórki B-limfoblastyczne, a wyjątkowo również makrofagi transformowane wirusem SV40 [8, 80].

WPŁYW NA RÓŻNE KOMÓRKI I TKANKI ORGANIZMU
EFEKTY METABOLICZNE

Właściwie wszystkie komórki ssaków z wyjątkiem erytrocytów mają receptor dla TNF, chociaż np. na limfocytach T ujawnia on swą aktywność dopiero po aktywacji komórek. Ilość receptorów na komórkach waha się szeroko od kilkuset do 20000, a nawet do 50000. W zasadzie przyjmuje się, że receptor ten jest glikoproteiną o masie ok. 300 kd, złożoną z podjednostki wiążącej TNF (75 kd) i podjednostki większej (138 kd), która przypuszczalnie warunkuje efekt cytotoksyczny. Po przyłączeniu TNF do receptora dochodzi do jego internalizacji i degradacji [2, 8, 24]. Do wyjaśnienia pozostaje mechanizm dalszych efektów postreceptorowych TNF i ewentualny udział w nim różnych przekaźników. Niedawno doniesiono na przykład, że zarówno TNF, jak IL-1 powodują gwałtowny i przejściowy wzrost poziomu c-AMP w fibroblastach oraz zwiększenie aktywności kinazy proteinowej [136].

Różnorodność oddziaływań TNF, właściwie hormonu tkankowego na tak wiele rodzajów komórek oraz liczne interakcje z całym systemem cytokin służą, jak się wydaje, lokalnej i uogólnionej reakcji obronnej organizmu wobec czynników inwazyjnych, a w szczególności

infekcyjnych. Ten nadrzędny cel TNF realizuje poprzez stymulowanie odczynu zapalnego z wytwórczym włączenie oraz efekty kataboliczne, służące mobilizacji wszystkich rezerw energetycznych i wykorzystaniu ich do zwalczania infekcji.

KOMÓRKI UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Makrofagi/monocyty. Wydzielany przez makrofagi po indukcji endotoksyną TNF, działa w sposób autokrynowy i indukuje zwrotnie w tych komórkach ekspresję swego własnego genu [84]. Ogólnie, aktywuje on makrofagi [39, 120] i wzmacnia ich cytotoksyczność, sam w niej pośrednicząc w postaci błonowej [27, 86, 137]. Poza tym TNF stymuluje uwalnianie IL-1 oraz produkcję prostaglandyny PGE-2 przez spoczynkowe makrofagi [3], wywiera wpływ chemotaktyczny na monocyty [64], umożliwia makrofagom niszczenie schistosomuli i *Mycobacterium avium* [7].

Neutrofile. TNF bardzo silnie aktywuje neutrofile. Wzmacnia on ekspresję receptorów dla składników dopełniacza CR1 i CR3, nasila fagocytozę i adhezję do śródbłonna, częściowo właśnie dzięki zwiększeniu ilości CR3 [1, 36, 106]. Maksymalny efekt adhezji neutrofilii do komórek śródbłonna występuje już po 5 minutach bez potrzeby syntezy białka [36]. TNF stymuluje agregację i degranulację neutrofilii, powoduje uwalnianie nadtlenu wodoru i lizozymu oraz wolnych rodników tlenowych [33, 49, 54]. Wzmacnia on też cytotoksyczność zależną od przeciwciał, a także nasila migrację i działa chemotaktycznie na neutrofile [33, 64, 68].

Limfocyty. TNF moduluje funkcję limfocytów zarówno T, jak i B. Może on działać jako adiuwant *in vivo*, stymulując reakcję przeciw syngenicznym komórkom nowotworowym poprzez nasilenie odpowiedzi limfocytów T cytotoksycznych, jak też odpowiedzi humoralnej limfocytów B [120]. Na limfocytach T powoduje on ekspresję dodatkowych receptorów dla TNF, zwiększa ekspresję antygenów HLA-DR oraz receptora dla IL-2, wzmagając w ten sposób odpowiedź proliferacyjną na IL-2. Nasila też produkcję IFN γ przez limfocyty T [84, 101]. TNF zwiększa ogólnie reaktywność ludzkich limfocytów B, stymuluje ich proliferację i różnicowanie, częściowo w drodze indukcji syntezy IL-6 [44]. Chociaż z drugiej strony donoszono o hamowaniu przez TNF ich proliferacji i różnicowania pod wpływem mitogenu szkarłatki [46], to wiadomo, że może on być nawet autokrynowym czynnikiem wzrostu dla komórek białaczkowych, wywodzących się z komórek B [21].

Dodatkowo, TNF może stanowić czynnik wzrostu również dla tymocytów [90], a LT jest przypuszczalnie mediatorem cytotoxicznego działania cytotoksycznych limfocytów T [80].

Eozynofile. Ulegają one aktywacji pod wpływem TNF m.in. nabywając zdolności zabijania schistosomuli [8, 110].

Komórki typu NC. Prawdopodobnie TNF odgrywa kluczową rolę w mechanizmie cytotoksyczności naturalnych komórek cytotoksycznych typu NC, dla których docelowe są głównie komórki litych guzów nowotworowych, działając jako jej zasadniczy mediator. Nie warunkuje natomiast cytotoksyczności komórek NK [43, 77, 79].

ŚRÓDBŁONEK

Jak się wydaje, właśnie śródbłonek jest kluczowym punktem uchwytu w mechanizmie wywoływania przez TNF martwicy krwotocznej nowotworów. Generalnie, skutkiem działania TNF na śródbłonek jest nadanie mu własności prokoagulacyjnych [71], co być może przyczynia się także do zakrzepicy, towarzyszącej często schorzeniom nowotworowym, czy

też do zespołu uogólnionego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC – z ang. *disseminated intravascular coagulation*), związanego często ze wstrząsem septycznym [65, 109].

Pod wpływem TNF w śródbłonku dochodzi do zwiększenia produkcji czynnika tkankowego, wzmożonego uwalniania i syntezy czynnika aktywacji płytek PAF (z ang. *platelet activating factor*), zahamowania ekspresji trombomoduliny oraz jej nasilonej internalizacji i degradacji [65, 71, 88]. Trombomodulina jest powierzchniowym receptorem dla trombiny i po jej przyłączeniu prowadzi do aktywacji białka C, odpowiedzialnego za uruchomienie fibrynolizy i hamowanie układu krzepnięcia.

TNF prowadzi również do syntezy i uwalniania przez komórki śródbłonka IL-1, która samodzielnie może inicjować koagulację i odczyn zapalny [70]. Wpływ wywierany na śródbłonek przez IL-1 i LT niemal całkowicie pokrywa się z efektami TNF α [88].

TNF wzmacnia ekspresję białek powierzchniowych śródbłonka, które służą do adhezji leukocytów [88]:

1) ELAM-1 (*endothelial leukocyte adhesion molecule*) – pozwalającą na przyłączanie granulocytów,

2) ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) – służącą przyłączeniu limfocytów, a być może także monocytów i granulocytów.

Efekt ten, wraz z natychmiastowym efektem wywieranym na same granulocyty, pozwala na ich wzmożoną migrację z łożyska naczyniowego i wyjaśnia obserwowaną po LPS leukopenię oraz udział TNF w lokalnym odczynie zapalnym i nadwrażliwości opóźnionej [93].

TNF bezpośrednio indukuje też ekspresję antygenów pierwszej klasy zgodności tkankowej [88], hamuje ekspresję tkankowego aktywatora plazminogenu PA (z ang. *plasminogen activator*), nasilając zarazem transkrypcję jego inhibitorów PAI-1 (z ang. *plasminogen activator inhibitor*) i PAI-2 [62], indukuje produkcję GM-CSF [67] oraz aktywność śródbłonkowej fosfolipazy A₂ [7]. Prawdopodobnie w drodze indukowania ekspresji określonych antygenów powierzchniowych, TNF przyczynia się też do komplikacji naczyniowych w zespole Kawasaki, gdyż podobnie jak IL-1 uwrażliwia on endothelium na lizę przez krążące u pacjentów z tą chorobą przeciwciała [59]. Bezpośrednio, TNF może być nawet cytotoksyczny dla komórek śródbłonka i hamować ich wzrost [98, 99]. Wywołuje też dość charakterystyczne zmiany morfologiczne [88, 99, 114], w tym reorganizację filamentów aktynowych, a po wyższych dawkach obrzmienie i obkurczenie komórek śródbłonka z pozostawieniem wypustek dendrytycznych i szczelin międzykomórkowych, co może dodatkowo ułatwiać migrację leukocytów z mikrokrążenia.

Badania nad wpływem TNF na proces angiogenezy wykazały, że może on ją indukować *in vivo* i *in vitro*, stymulując chemotaksję komórek śródbłonka i indukując tworzenie kapilaro-podobnych struktur, a nawet że odpowiada on za zdolność indukowania angiogenezy przez makrofagi, co mogłoby mieć znaczenie przy gojeniu uszkodzeń tkanek, w przewlekłym procesie zapalnym, ale także dla wzrostu nowotworu [58, 88]. Według innych TNF wręcz hamuje angiogenezę *in vitro* poprzez bezpośrednio cytotoksyczne i cytostyczne działanie na śródbłonek [98], lecz rozbieżności te wynikają prawdopodobnie z różnicy stężeń stosowanego TNF.

WPLYW NA ADIPOCYTY I METABOLIZM – KACHEKSJA

W toku badań nad kachesją – stanem ogólnego wyniszczenia organizmu towarzyszącym wielu przewlekłym schorzeniom, C. A. Rouzer i A. Cerami obserwowali na modelu trypanosomiazы u królików, że utracie apetytu i wagi towarzyszyła hipertriglicerydemia, spowodowana niedoborem aktywności enzymu lipazy lipoproteinowej, czyli LPL [6, 7]. Dalsze badania B. Beutler i A. Cerami oraz ich współpracowników wyjaśniły, że za supresję LPL odpowiedzialny jest produkowany przez makrofagi czynnik, nazwany przez nich kachektyną [7, 75]. Po ustaleniu sekwencji aminokwasowej kachektyny okazało się, że jest ona identyczna z $TNF\alpha$ i wykazuje oczywiście taką samą aktywność biologiczną [6, 9, 75]. Stąd też w doniesieniach zaczęto używać nazwy kachektyna i $TNF\alpha$ jako synonimów.

Hamowana przez TNF na poziomie transkrypcji lipaza lipoproteinowa, syntetyzowana głównie w adipocytach, ale funkcjonująca dopiero po przyłączeniu do powierzchni śród-błonka tkanek pozawątrobowych, umożliwia wykorzystanie egzogennych tłuszczów z trawienia (chylomikrony) i endogennej puli tłuszczów z wątroby (VLDL z ang. *very-low-density lipoproteins*). Hydrolizując te dwie frakcje lipidów osoczowych do postaci kwasów tłuszczowych, udostępnia je ona komórkom tłuszczowym w celu restryfikacji i gromadzenia, a innym jak np. mięśniowym jako źródło energii [29]. Podczas gdy w stanie wyniszczenia enzym ten ulega wyraźnej supresji w tkance tłuszczowej, to np. w mięśniu sercowym i szkieletowych aktywność LPL nawet rośnie, podobnie jak to się dzieje w czasie głodu [8].

Poza lipazą proteinową, TNF hamuje też na poziomie transkrypcji syntezę kilku innych enzymów w komórkach tłuszczowych [8, 47, 76, 122], a w tym:

- karboksylazę acetylo-CoA,
- syntetazę kwasów tłuszczowych – niezbędne do syntezy trójglicerydów *de novo*,
- dehydrogenazę glicero-3-fosforanową, która m.in. umożliwia wykorzystanie glikolizy jako źródła fosfoglicerolu do syntezy lipidów,
- adypsinę – proteazę surowicy,
- a także białka wiążące kwasy tłuszczowe.

Stwierdzono, że TNF powoduje zahamowanie ekspresji enzymów lipogenicznych do poziomu charakterystycznego dla niedojrzałych adipocytów, a podawany przewlekłe nie tylko hamuje różnicowanie komórek tłuszczowych, ale może też wywołać ich odróżnicowanie [122].

TNF wzmaga również uwalnianie glicerolu z adipocytów, co sugerowałoby pewien wpływ także na aktywną wewnątrzkomórkowo lipazę zależną od hormonów [122]. Dodatkowo TNF wywiera też inne efekty metaboliczne, jak nasilenie glikogenolizy oraz wychwyty glukozy poprzez zwiększenie syntezy jej transporterów w komórkach mięśniowych [8, 76]. Wysokie dawki TNF powodują poza tym wzrost poziomu hormonów katabolicznych, takich jak: ACTH, glukagon, catecholaminy i kortyzol, działając zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio poprzez uwolnienie IL-1 [125].

Podsumowując, wszystkie te efekty wydają się służyć ogólnej mobilizacji i utylizacji zasobów energetycznych ustroju, co w przypadku zwalczania czynnika infekcyjnego może mieć korzystne znaczenie dla przetrwania organizmu.

Wiadomo, że około 30% pacjentów z nowotworami złośliwymi ginie z powodu kacheksji [125]. Chociaż supresja LPL przez TNF mogłaby wyjaśniać obserwowaną w stanach

wyniszczenia w przebiegu nowotworów i przewlekłych chorób pasożytniczych hipertriglicerydemii, to rola TNF jako czynnika odpowiedzialnego za kacheksję u ludzi nie jest całkiem udowodniona. Co prawda Oliff i współpracownicy pokazali, że wszczepienie szczerzych komórek nowotworowych, produkujących stale TNF nagim myszom powodowało u 87% tych myszy wystąpienie cech wyniszczenia, to jednak doniesienia na temat obecności TNF w surowicy pacjentów z kacheksją, towarzyszącą nowotworom złośliwym są sprzeczne [76]. Jedni stwierdzali podniesienie jego poziomu w surowicy, drudzy całkowity jego brak. W dotychczasowych próbach klinicznych z ludźmi nie wykazano spadku wagi, lecz jedynie częstą anoreksję po stosowaniu TNF. Z drugiej strony czas ekspozycji był tu bardzo krótki i przerywany, gdyż $T_{1/2}$ wynosi tylko 15–30 min [35, 76].

Pewną rolę w kacheksji mogą również odgrywać IL-1 i IFN, gdyż, jak się okazało, mogą one także hamować aktywność LPL *in vitro* [75].

WPLYW NA INNE TKANKI I KOMÓRKI

Szczególnie różnorodne i rozległe działania wywiera TNF na elementy tkanki łącznej. Przede wszystkim stymuluje on proliferację i wzrost fibroblastów [51, 129], indukuje w nich produkcję IL-6 [51, 136] oraz GM-CSF i G-CSF [50, 67]. Skórne fibroblasty w odpowiedzi na TNF produkują i wydzielają kolagenazę i PGE-2 [26].

TNF zwiększa resorpcję tkanki kostnej, działając bezpośrednio na osteoblasty i pobudzając je do wydzielania czynnika stymulującego osteoklasty, a także pośrednio poprzez uwalnianie IL-1, która sama powoduje wzmożoną resorpcję kości [5]. Stymuluje on proces degradacji proteoglikanów w chrząstkach i hamuje ich syntezę [96] oraz nasila produkcję PGE-2 i kolagenazy przez komórki maziówkowe [26].

Wysokie dawki TNF działają wyraźnie supresyjnie na szpik kostny, hamując wzrost i proliferację komórek prekursorowych erytroblastów, makrofagów i komórek multipotencjalnych [1, 15, 120]. To zahamowanie erytropoezy mogłoby tłumaczyć anemię, towarzyszącą pacjentom w kacheksji [125]. Jednak pośrednio, uwalniając GM-CSF i G-CSF, TNF może nawet odgrywać rolę protekcyjną dla szpiku, gdyż zmniejsza on znacznie letalny efekt totalnych naświetlań promieniami rtg [127]. Podany na 20 godzin przed subletalnym napromieniowaniem ogranicza późniejszą leukopenię, przyspiesza regenerację komórek prekursorowych hemopoezy i normalizację obrazu krwi [111].

W doświadczeniach *in vivo* większość podanego dożylnie TNF lokalizuje się w wątrobie, nerkach, skórze i przewodzie pokarmowym [11], ale sposób jego oddziaływania na te narządy nie został dokładnie określony. Wiadomo, że pod wpływem TNF hepatocyty uwalniają białka ostrej fazy, fibrynogen, czynnik B i C3 dopełniacza, α 1-chymotrypsyny, amyloid A, zaś ogólna biosynteza białek zostaje zahamowana [8, 82].

Działając na komórki mięśniowe, TNF wywołuje spadek spoczynkowej różnicy potencjału błonowego, katabolizm komórkowego glikogenu i wzrost ilości transporterów heksozy, przez co nasila napływ glukozy do komórki, a także indukuje produkcję GM-CSF [56, 123, 125].

TNF okazał się też endogennym pirogenem. Jego podanie wywołuje dwufazową gorączkę

- początkowo wskutek bezpośredniego pobudzenia neuronów ośrodka termoregulacji do produkcji PGE-2,
- w drugiej zaś fazie na skutek uwolnienia IL-1 [28].

DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE

Wielokrotnie wykazano zdolności terapeutyczne TNF na modelu zwierzęcym. Uzyskano m.in. częściowe regresje guzów u nagich myszy z ludzkimi nowotworami i całkowite wyleczenia z doświadczalnych Meth-A fibrosarkom [23], a także regresje eksperymentalnych i spontanicznych przerzutów [121], przy czym najefektywniejszą drogą podania okazały się iniekcje domiejskowe lub dożyłne.

Najszybszym efektem po podaniu TNF i.v. jest martwica krwotoczna guza, do której dochodzi już po 1–4 godzinach. Równie szybko dochodzi do adhezji, a następnie infiltracji granulocytów przez naczynia nowotworu. W ciągu 24–72 godzin występuje już efekt bezpośrednio cytotoksyczny lub cytostatyczny TNF, a po 2–4 tygodniach rozwija się wzmożona, specyficzna odpowiedź immunologiczna [78].

MARTWICA KRWOTOCZNA GUZA

Dochodzi do niej nawet wtedy, gdy same komórki nowotworowe są *in vitro* niewrażliwe na TNF [61]. Dokładny mechanizm tego zjawiska pozostaje w istocie niewyjaśniony. Ustalono, że następuje wybiórcze zniszczenie naczyń wewnątrz nowotworu i ich śródbłonna, a optymalny efekt martwicy występuje dopiero po 7–10 dniach od implantacji guza, co wskazuje na konieczność wcześniejszego rozwoju jego unaczynienia [61, 75, 109]. Obserwowano po TNF precypitację w kapilarach guza substancji fibryno-podobnej, której wytrącenie, a zarazem efekt martwicy znosiło podanie dikumarolu [109]. Wydaje się zatem, że TNF powoduje wykrępowanie w mikrokrążeniu guza, wskutek uszkodzenia śródbłonna i nadania mu silnych własności prokoagulacyjnych (patrz s. 218). W wysokich, toksycznych dawkach oraz w przebiegu wstrząsu septycznego i DIC, TNF ujawnia takie działanie również wobec naczyń w zdrowych narządach, powodując uszkodzenia w nerkach, układzie pokarmowym i innych [7].

DZIAŁANIE BEZPOŚREDNIO CYTOTOKSYCZNE I CYTOSTATYCZNE PROBLEM OPORNOŚCI NA TNF

Niezwykle cenną klinicznie własnością TNF jest fakt, że zasadniczo wywiera on swoje działanie selektywnie, tylko na komórki transformowane [8, 68, 75, 95]. Około 1/3 ludzkich komórek rakowych jest wrażliwa na cytolizę, a dalsza 1/3 – na działanie cytostatyczne, pozostała trzecia część wykazuje względną oporność [38, 116]. Normalne ludzkie komórki są niewrażliwe na TNF [34] albo też jego hamujący wpływ ujawnia się dopiero przy 100–10000 razy wyższych stężeniach [17, 116].

Istota i mechanizm tego działania na komórki nowotworowe nie zostały jeszcze ustalone, chociaż powstało już szereg obserwacji. Przykładowo, po zadziałaniu TNF na wrażliwe komórki ma miejsce dość charakterystyczna fragmentacja DNA, której towarzyszy uwolnienie go z jądra i na zewnątrz komórki [80, 103]. Brak tego efektu po bezpośredniej mikroiniekcji TNF do jądra świadczy o działaniu pośrednim. Fragmenty DNA są w przybliżeniu wielokrotnością 180 bp, co sugeruje, że do cięć jego łańcucha dochodzi pomiędzy nukleosomami, a są to miejsca najbardziej odstępnięte na działanie endonukleaz.

Cytotoksyczność TNF nie jest uwarunkowana syntezą białka *de novo*. Prawdopodobnie, jest ona związana z aktywacją fosfolipazy A₂ [115] i następnie uwolnieniem kwasu arachi-

donowego wraz z jego metabolitami – prostaglandynami, tromboksanem, leukotrienami oraz rodnikami tlenowymi, które same mogą przyczyniać się do fragmentacji kwasu nukleinowego i powodować obserwowaną po TNF lipoksygenację błon komórkowych [32, 93]. Aspiryna i indometacyna, hamujące cyklooksygenazę faktycznie zmniejszają toksyczność TNF i hamują efekt cytolizy [105, 118], chociaż jeszcze mocniej blokowały go kortykoidy, będące właśnie pośrednim inhibitorem fosfolipazy A₂ [115].

Podstawową rolę w efekcie cytotoksycznym TNF odgrywa aktywacja komórkowych proteaz [32, 94] i lizosomów [109]. Obserwowano również synergistyczne indukowanie przez TNF i IL-1 produkcji PGE-2 w ludzkich komórkach nowotworowych wrażliwych na TNF [55].

Jak już wspomniano (patrz s. 218), TNF jest mediatorem cytotoksyczności naturalnych komórek cytotoksycznych typu NC i aktywowanych makrofagów.

Przypuszczalnie w jakiś sposób TNF wykorzystuje słabszą zdolność samonaprawy i inaktywacji szkodliwych metabolitów w komórkach transformowanych. Zrozumienie istoty selektywności jego działania pozwoli być może na przezwycięzenie konstytucyjnej i indukowanej TNF-oporności.

Wrażliwość na TNF uwarunkowana jest występowaniem w komórce docelowej receptora, ale nie jest to warunek wystarczający [84]. Znane są przypadki oporności na jego działanie, pomimo obecności receptora i to w dużych ilościach, chociaż jednocześnie z TNF stosowanie IFN γ prowadzi do jej przełamania, a jak wiadomo, IFN γ zwiększa ekspresję receptorów dla TNF [34, 84]. Może tu mieć znaczenie działanie IFN γ jako inhibitora syntezy białka, gdyż blokowanie transkrypcji aktynowycyną D [22] albo syntezy białka cykloheksamidem [94] często uwrażliwia komórki docelowe na cytotoksyczny wpływ TNF. Ogólnie bowiem inhibitory syntezy białka wzmagają wrażliwość na TNF [34, 68, 75], a nawet mogą czynić go cytotoksycznym dla komórek normalnych [94]. W związku z tym powstała koncepcja istnienia pewnego białka ochronnego, którego obecność zabezpieczałaby komórkę przed bezpośrednim działaniem TNF, tym bardziej że oporność na TNF dominuje po fuzji komórek [84, 95]. Istnieją dane na to, że komórki mogą nabywać tę oporność pod wpływem samego TNF [92]. Ostatnio postuluje się np. ochronną rolę manganowej dysmutazy nadtlenkowej (MnSOD) obecnej w mitochondriach, która jak wiadomo neutralizuje groźne dla komórki rodniki tlenowe, powstające m.in. pod wpływem TNF [135]. Stwierdzono bowiem, że właśnie TNF zwiększa ekspresję tego enzymu na poziomie transkrypcji. Co więcej komórki nowotworowe z konstytucyjną syntezą MnSOD-mRNA wykazywały oporność na TNF, a komórki bez śladów mRNA dla MnSOD były na niego wrażliwe. Trzeba tu wspomnieć, że w porównaniu do komórek normalnych wszystkie komórki nowotworowe mają obniżony bądź niewykrywalny MnSOD. Być może m.in. tę właśnie różnicę metaboliczną wykorzystuje TNF do selektywnego niszczenia komórek transformowanych.

Ustalono, że TNF aktywuje w komórce kinazę proteinową C, która z kolei zmniejsza drastycznie powinowactwo receptora do TNF prawdopodobnie fosforylując białko receptorowe [14, 84, 136].

Poza tym stwierdzono, że im wyższy poziom ekspresji endogennego TNF, tym większa oporność na cytolizę przez TNF egzogeny [72], a linie odporne konstytucyjnie, bez indukcji wytwarzają TNF-mRNA. Co więcej, synteza endogennego TNF jest indukowana przez TNF egzogeny, tak więc wyselekcjonowane powtarzaną ekspozycją na TNF z populacji TNF-wrażliwej, mysie, transformowane fibroblasty były odporne i produkowały własny TNF

[72, 92]. Obecność IL-6 w komórkach TNF-opornych także być może ma znaczenie, gdyż nie jest ona indukowana przez TNF w komórkach wrażliwych [72].

Istnieje możliwość znoszenia cytostatycznego efektu TNF przez czynniki wzrostu jak EGF (z ang. *epidermal growth factor*) i TGF α i β (z ang. *transforming growth factor*) [32, 117], które mogą być wydzielane autokrynowo przez komórki nowotworowe. Taka indukowana obecnością EGF i TGF α oporność na działanie TNF może zostać przełamana przez kombinację TNF z IFN γ .

Wrażliwość na zahamowanie wzrostu przez TNF jest prawdopodobnie tym mniejsza, im wyższy stopień zróżnicowania prezentują komórki docelowe [84].

WPŁYW NA RÓŻNICOWANIE I IMMUNOGENNOŚĆ IMMUNOMODULACJA

TNF powoduje gwałtowne zahamowanie transkrypcji onkogenu *c-myc* w komórkach białaczki szpikowej HL-60, gdzie ulega on nadmiernej ekspresji tak jak i w niektórych liniach *carcinoma*. Prowadzi to do indukcji różnicowania (nasilenie aktywności fagocytarnej i pojawienie się markerów końcowego zróżnicowania) i wtórnego zahamowania proliferacji, mimo początkowej stymulacji wzrostu [53, 84]. Typ odpowiedzi biologicznej może tu bardzo zależeć od stężenia TNF. Jak donoszą inni, niższe stężenia powodowały różnicowanie komórek mieloblastycznych i HL-60, podczas gdy wyższe stężenia, wysycające miejsca receptorowe o niskim powinowactwie, znosiły ten efekt w sposób zależny od dawki [41].

Niezależnie od wrażliwości na antyproliferacyjne działanie TNF, może on zwiększać immunogenność transformowanych komórek, wzmagając ekspresję antygenów HLA-A,B,C oraz HLA-DR na ludzkich komórkach nowotworowych na poziomie transkrypcji i posttranskrypcyjnym. Wzmagał on też ich ekspresję na komórkach HLA-ujemnych, indukowaną przez IFN γ [85, 100].

TNF działa również jako immunomodulator dzięki aktywacji wielu komórek efektorowych układu immunologicznego (patrz s. 217) oraz interferując z całym niemal systemem cytokin poprzez wzajemną indukcję i synergistyczne działanie, przy czym efekt immunostymulujący osiągany jest często poniżej maksymalnych, bezpośrednio cytotoksycznych dawek [84, 120, 121].

PRÓBY PRZEDKLINICZNE I KLINICZNE TOKSYCZNOŚĆ I SYNERGIZM Z INNYMI CZYNNIKAMI

Dotychczasowe wyniki prób klinicznych nie są niestety zbyt zachęcające, w porównaniu z efektami osiąganymi w doświadczeniach *in vivo*. W pierwszej fazie prób klinicznych oceniano wpływ samego TNF. Po podaniu *i.v.* obserwowano niezależnie od dawki toksyczne objawy ogólne, podobne jak po IFN i IL-1: gorączkę, dreszcze, nudności i wymioty, anoreksję, bóle głowy, osłabienie; natomiast w zależności od dawki pojawiały się: hipotensja, trombocytopenia, leukopenia albo leukocytoza, wreszcie podwyższony poziom transaminaz i bilirubiny, świadczące o hepatotoksyczności [35, 48, 105, 107]. Dodatkowo pojawiły się też białka ostrej fazy i łagodne uszkodzenia nerek u niektórych pacjentów [105], a przy bardzo wysokiej dawce wystąpił nawet zespół DIC [48]. Nie zaobserwowano natomiast u ludzi wywoływania przez TNF objawów kacheksji [76], chociaż po 5-dniowych, ciągłych wlewach odnotowano spadek frakcji HDL (z ang. *high-density lipoproteins*) i

wzrost poziomu trójglicerydów i VLDL we krwi, mogące świadczyć o pewnej supresji LPL [107]. Określenia maksymalnej tolerowanej i bezpiecznej dawki nie są jednoznaczne. Reakcji gorączkowej i innym objawom toksycznym zapobiegały kortykosteroidy i inhibitory cyklooksygenazy [35, 105].

Generalnie brak było obiektywnego efektu przeciwnowotworowego [48, 107] lub był on nieznaczny [105]. W badaniach pierwszej fazy nie obserwowano w zasadzie martwicy krwotocznej [35]. Można to tłumaczyć zbyt krótkim czasem ekspozycji i niskimi stężeniami TNF oraz zaawansowanym stanem procesu rozrostowego u pacjentów, dominowały bowiem przypadki odporne, po bezskutecznych próbach leczenia innymi metodami [35]. Jedyne, nawet pełne regresje uzyskano po iniekcjach doguzowych [75].

Powstała sugestia, aby ze względu na toksyczność w stosowaniu ogólnym spróbować stosować TNF *in vitro*, oczyszczając szpik kostny z komórek nowotworowych przed autologicznym przeszczepem w przypadku nowotworów krwi, gdyż cytotoksyczny efekt dla komórek nowotworowych TNF osiągał w stężeniu znacznie niższym niż toksyczny dla zdrowych komórek szpiku [1].

Co ciekawe, monocyty pacjentów z *carcinoma* przejawiają zwiększoną produkcję TNF i PGE-2 w odpowiedzi na LPS, lecz wprowadzenie własnego osocza tych pacjentów powodowało drastyczne zahamowanie produkcji TNF, a zarazem wybitne nasilenie produkcji PGE-2. Nieautologiczna plazma nie miała takiego wpływu. W osoczu 74% pacjentów z *carcinoma* nie wykazano aktywności TNF we krwi, ale poziom PGE-2 był podwyższony [69].

W rozpoczętej obecnie drugiej fazie badań klinicznych bada się efekty terapii kombinowanej: TNF + IL-2, TNF + IFN γ [93]. Wydaje się ona znacznie bardziej obiecująca, podobnie jak łączenie TNF z radio- lub chemioterapią [35] i być może pozwoli na obniżenie dawek poniżej poziomu toksycznego przy optymalizacji samego efektu przeciwnowotworowego.

Wielokrotnie potwierdzono synergistyczne działanie TNF z IFN γ [30, 32, 68, 75]. Jak już wspomniano, obecność IFN γ często przełamuje oporność na TNF [34] i tak np. spośród 9 linii ludzkich komórek raka jelita grubego, odpornych na sam TNF i różnie wrażliwych na IFN γ , 8 linii było wrażliwych na synergistyczny, cytotoksyczny efekt obu tych cytokin łącznie [102]. Wyjątkiem mogą tu być komórki chłoniaków i białaczek, wobec których nie stwierdzono synergizmu TNF i IFN γ , być może ze względu na brak receptora dla IFN γ na niektórych komórkach limfoblastycznych [34]. Wiadomo, że IFN γ zwiększa ilość receptorów dla TNF [2, 126], stymuluje i wzmacnia produkcję TNF w makrofagach i wzajemnie – TNF stymuluje produkcję IFN [20, 68, 84]. Obie cytokiny synergistycznie wzmagają ekspresję antygenów HLA i stymulują aktywność przeciwnowotworową makrofagów [40]. Jednak niektórzy zwracają uwagę nie tylko na korzystny, ale i na toksyczny synergizm z IFN γ [119], gdyż w połączeniu mogą powodować nawet rozsiane zakrzepy i zawały krwotoczne u zwierząt z przerzutami [118]. Sam IFN γ wykazuje niezależne działanie przeciwnowotworowe zarówno bezpośrednio cytotoksyczne i cytostatyczne, jak i immunostymulujące m.in. przez aktywację komórek NK i makrofagów.

Również IL-2 w połączeniu z TNF daje efekt synergistyczny [134]. Na przykład terapia kombinowana TNF z dodatkiem niskich dawek IL-2 w postaci iniekcji doguzowych u myszy z *lymphoma* dała w 60% całkowite wyleczenie z nabyciem trwałej odporności, podczas gdy sam TNF powodował jedynie przejściową remisję [73]. Wiadomo, że TNF zwiększa ilość

receptorów dla IL-2 na limfocytach T, wzmagając ich zdolność proliferacyjną [84, 134]. Sama IL-2 także wywiera efekt przeciwnowotworowy poprzez komórki LAK i limfocyty T.

Wcześniejsze traktowanie TNF-opornych linii komórkowych aktywnością D czyniło 82% z nich wrażliwymi na cytolizę przez TNF, przy czym uwrażliwienie komórek normalnych wymagało ponad 10–3000 razy wyższych stężeń aktywności [22]. Korzystny efekt przeciwnowotworowy uzyskano także łącząc TNF z innymi cytostatykami, takim jak: czynniki alkilujące, 5-fluorouracyl czy doksorubicyna [35].

Obiecujące mogłoby się wydawać skojarzenie leczenia TNF z radioterapią, gdyż donoszono o znacznym redukowaniu pod jego wpływem popromiennej leukopenii i mielosupresji u myszy [111], a przez zwiększenie odporności na popromienne infekcje bakteryjne także zmniejszeniu śmiertelności [127, 128]. Być może, za efekt ten częściowo odpowiada indukowanie GM-CSF [67, 118].

Aktywność przeciwnowotworową TNF *in vivo* wzmagają też synergistycznie dodatki detoksykowanej endotoksyny, polinukleotydu poli A : U, indukującego endogenną IFN, lub minimalne ilości toksycznej endotoksyny [13]. Czynniki te rozszerzały zakres martwicy nowotworów i podwajały kompletne regresje, nie nasilając działań ubocznych. Synergia ta pozwalała na 3–10-krotne zmniejszenie optymalnej dawki TNF i zachodziła tylko *in vivo*, czyli w mechanizmach pośrednich. Natomiast MDP (z ang. *muramyl dipeptide*) oraz IFN α i β nie wzmagają efektywności TNF. Odpowiednio niskie dawki LPS wzmagają efekt TNF, co więcej LPS może być znacznie efektywniejsza w całkowitym odrzuceniu guza niż sam TNF i nie wymagała całkowitej martwicy do eliminacji nowotworu [18]. Prawdopodobnie ten efekt LPS zależy od indukowania oprócz TNF dodatkowych cytokin, jak IL-1 i IFN [18]. Korzystne dla efektu LPS okazało się równoczesne blokowanie ujemnych sprzężeń zwrotnych:

- stymulacji limfocytów T supresorowych – cyklofosfamidem i
- indukcji PGE – indometacyną.

Z drugiej strony synergizm między TNF i LPS oraz bakteriami, takimi jak: *Mycoplasma* i *Corynebacterium*, przejawia się także nasileniem toksyczności, w tym wywoływaniem letalnego wstrząsu i martwicy krwotocznej nawet u zdrowych myszy [91].

IL-1 także może niekiedy wzmacniać cytotoksyczność TNF [55], lecz zasadniczo zwiększa jego toksyczność [119,131].

ROLA BIOLOGICZNA TNF

O głębokim sensie biologicznym funkcjonowania TNF świadczy zachowanie tej cytokiny w niemal niezmienionej postaci na przestrzeni całej ewolucji ssaków. Podstawową funkcją TNF jest przypuszczalnie udział w miejscowej i układowej odpowiedzi obronnej organizmu na czynniki inwazyjne, jaką stanowi proces zapalny. Jest on niewątpliwie korzystny, dopóki jego przebieg jest kontrolowany, jednak w formie zbyt przewlekłej i rozległej leży u podłoża wielu chorób. Zaczynają się też pojawiać przesłanki, świadczące o ewentualnej roli TNF w naprawie uszkodzonych tkanek i ich ciągłej fizjologicznej odnowie.

MEDIATOR STANU ZAPALNEGO – UDZIAŁ W PATOGENEZIE CHORÓB

Niewątpliwa jest rola TNF w inicjowaniu miejscowego odczynu zapalnego, a to między innymi dzięki stymulowaniu wielu komórek do produkcji i wydzielania innych pro-zapalnych polipeptydów [75] oraz ułatwieniu adhezji i infiltracji granulocytów i limfocytów do ogniska zapalnego. Prokoagulacyjne działanie na śródbłonek może mieć znaczenie dla ograniczenia rozprzestrzeniania się czynnika infekcyjnego. W ognisku zapalnym lub nowotworowym TNF może być nie tylko uwalniany przez migrujące makrofagi, ale też warunkuje bezpośrednią cytotoksyczność aktywowanych makrofagów jako ich integralne białko błonowe [52]. Induktorem TNF może być lokalnie nie tylko endotoksyna bakteryjna, ale też takie czynniki endogenne, jak składnik dopełniacza C5a [74] iuropeptydy – substancja P i K, wydzielane z czuciowych zakończeń nerwowych do okolicznych tkanek w odpowiedzi na uraz lub bodźce zapalne [60]. Pod wpływemuropeptydów wraz z TNF wydzielane są inne monokiny: IL-6 i IL-1, także stymulujące proces zapalny. IL-1 wykazuje przy tym wiele wspólnych działań z TNF, w tym działanie pirogenne, stymulowanie resorpcji kości oraz syntezy kolagenazy i PGE-2 w fibroblastach, wzmaganie ekspresji receptora dla IL-2, oddziaływanie na śródbłonek [90]. Pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego w ognisku zapalnym może stanowić wzmaganie przez rodniki tlenowe obecne w otoczeniu makrofagów wydzielania TNF pod wpływem endotoksyny, gdyż sam TNF stymuluje z kolei uwalnianie reaktywnych form tlenu przez leukocyty [19]. W przewlekłym, wytwórczym procesie zapalnym i gojeniu ran może też odgrywać rolę lokalne stymulowanie przez TNF angiogenezy [58].

Niemal pewna wydaje się obecnie rola TNF jako podstawowego mediatora wstrząsu septycznego [8, 68, 75, 124]. Jest on czynnikiem odpowiedzialnym za inicjację letalnych efektów endotoksyny u myszy [57]. Stwierdzono też, że ciężki, śmiertelny przebieg meningokokowego zapalenia opon i posocznicy meningokokowej u ludzi korelował z podwyższonym poziomem TNF w surowicy pacjentów [132]. Rola obronna TNF w infekcji bakteryjnej przejawia się również działaniem pirogenym, wszechstronną mobilizacją układu immunologicznego oraz mobilizacją zasobów energetycznych ustroju poprzez supresję LPL, która w razie przewlekłej i uogólnionej stymulacji TNF być może prowadzi nawet do objawów wyniszczenia organizmu.

Poza udziałem TNF we wstrząsie septycznym i meningokokowym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, przypisuje mu się rolę mediatora w ostrej fazie odrzucania przeszczepu [37] i reakcji przeszczepu przeciwko biorcy, czyli GVHD (ang. *graft-versus-host disease*) [87], gdzie leczenie przeciwciałami anti-TNF całkowicie zapobiegało uszkodzeniom skóry i jelit. Pojawiają się też sugestie co do możliwego zaangażowania TNF w lokalny odczyn zapalny w reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczeniu rumieniowatym układowym i innych chorobach z autoagresji [80, 124], patogenezę cukrzycy typu pierwszego [89], przewlekłe stany zapalne ośrodkowego układu nerwowego [7], zespół Kawasaki u dzieci [59] i zespół DIC [109].

DZIAŁANIE PRZECIWPASOŻYTNICZE I PRZECIWWIRUSOWE

W surowicy pacjentów z chorobami pasożytniczymi – malarią i kala-azar, czyli *leishmaniasis visceralis* – stwierdzono podniesiony poziom TNF [104], zaś u myszy wyższy poziom TNF towarzyszył szczególnie przypadkom malarii z powikłaniami mózgowymi [8, 75].

Zasadniczo uważa się jednak, że TNF odgrywa w malarii rolę obronną i taką sugeruje się również względem *Candida albicans* [8], *Schistosoma mansoni* [30, 80], *Legionella pneumophila* i być może także w AIDS [7].

TNF bezpośrednio zabija zainfekowane wirusem komórki i hamuje efekt cytopatyczny – CPE [8]. Aktywność przeciwwirusową wykazał on przeciw [42, 63]: wirusom opryszczki (HSV I, II), wirusowi ospy wietrznej (VSV), pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), zapalenia mięśnia sercowego i mózgu (EMC) oraz cytomegalii (CMV). Działanie antywirusowe TNF wzmacnia synergistycznie IFN. Przypuszczalnie TNF działa przeciwwirusowo bezpośrednio, a także poprzez indukowanie IFN β -2, czyli IL-6.

PRZEBUDOWA TKANEK

Ostatnio postuluje się udział TNF wraz z IL-1 w fizjologicznym procesie ciągłej przebudowy i odnowy tkanek, gdyż jak się okazało, makrofagi wydzielają TNF i IL-1 pod wpływem przyłączenia do specjalnego receptora nieenzymatycznie zglikozylowanych, a więc starzejących się białek substancji międzykomórkowej [130]. Efekty parakrynowe tych cytokin mogą wyjaśniać skoordynowane usuwanie starzejących się tkanek, gdyż jak wiadomo, TNF może z kolei brać aktywny udział w katabolizmie tkanki łącznej, stymulując degradację proteoglikanów, uwalnianie proteaz i produkcję PGE-2 i kolagenazy przez komórki mezenchymalne. Z drugiej strony TNF może wpływać na odnowę tkanki łącznej, działając jako czynnik wzrostu fibroblastów, czy też stymulując uwalnianie PDGF (z ang. *platelet-derived growth factor*) [130]. Być może reguluje on wzrost i proliferację fibroblastów i innych komórek, np. limfocytów B, w drodze stymulacji komórkowych onkogenów, doniesiono bowiem o przedłużonej aktywacji genu *jun* i stymulacji genu *fos* pod wpływem TNF. Produkty tych genów wchodzi w interakcję i tworząc czynnik transkrypcyjny AP-1 aktywują ekspresję innych genów. Właśnie poprzez czynnik AP-1 TNF zwiększa 4-krotnie transkrypcję genu kolagenazy, a prawdopodobnie również innych [14].

Dalsze badania nad TNF są obecnie w toku i ujawnią zapewne wiele nowych aspektów jego funkcjonowania w organizmie.

LITERATURA

- [1] ABOUD SL, GERSON SL, BERGER NA. The effect of tumor necrosis factor on normal human hematopoietic progenitors. *Cancer* 1987; **60**: 2965–2970.
- [2] AGGARWAL BB, EESALU TE, HASS PE. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. *Nature* 1985; **318**: 665–667.
- [3] BACHWICH PR, CHENSUE SW, LARRICK JW, KUNKEL SL. Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E-2 production in resting macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **136**: 94–101.
- [4] BERGER M, WETZLER EM, WALLIS RS. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood* 1988; **71**: 151–158.
- [5] BERTOLINI DR, NEDWIN G, BRINGMAN T, SMITH D, MUNDY GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. *Nature* 1986; **319**: 516–518.
- [6] BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; **320**: 584–588.
- [7] BEUTLER B, CERAMI A. The biology of cachectin/TNF – a primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989; **7**: 625–655.

- [8] BEUTLER B, CERAMI A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv Immunol* 1988; **42**: 213–231.
- [9] BEUTLER B, GREENWALD D, HULMES JD, CHANG M, PAN YCE, MATHISON J, ULEVITCH R, CERAMI A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985; **316**: 552–554.
- [10] BEUTLER B, KROCHIN N, MILSARK IW, LEUDKE C, CERAMI A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: Mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986; **232**: 977–990.
- [11] BEUTLER B, MILSARK IW, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 1985; **135**: 3972–3977.
- [12] BEUTLER B, THOMPSON P, KEYES J, HAGERTY K, CRAWFORD D. Assay of a ribonuclease that preferentially hydrolyses mRNAs containing cytokine-derived UA-rich instability sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **152**: 973–980.
- [13] BLOKSMA N, HOFHUIS FMA. Synergistic action of human recombinant tumor necrosis factor with endotoxins or nontoxic poly A : U against solid Meth A tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* 1987; **25**: 165–171.
- [14] BRENNER DA, O'HARA M, ANGEL P, CHOJKIER M, KARIN M. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumor necrosis factor- α . *Nature* 1989; **337**: 661–663.
- [15] BROXMEYER HE, WILLIAMS DE, LU L, COOPER S, ANDERSON SL, BEYER GS, HOFFMAN R, RUBIN BY. The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patient with leukemia: Synergism of tumor necrosis factor and interferon- γ . *J Immunol* 1986; **136**: 4487–4495.
- [16] CAPUT D, BEUTLER B, HARTOG K, BROWN-SHIMER S, CERAMI A. Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 1670–1674.
- [17] CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIORE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666–3670.
- [18] CHUN M, HOFFMANN MK. Combination immunotherapy of cancer in a mouse model: Synergism between tumor necrosis factor and other defense systems. *Cancer Res* 1987; **47**: 115–118.
- [19] CLARK IA, CHAUDHRI G, COWDEN WB. Interplay of reactive oxygen species and tumor necrosis factor in tissue injury. [w] Liss AR (red.) *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*. Inc. 1988: 53–60.
- [20] COLLART MA, BERLIN D, VASSALLI JD, DEKOSSODO S, VASSALLI P. Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 1986; **164**: 2113–2118.
- [21] CORDINGLEY FT, HOFFBRAND AV, HESLOP HE, TURNER M, BIANCHI A, REITTIE JE, VYAKARNAM A, MEAGER A, BRENNER MK. Tumor necrosis factor as an autocrine tumor growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet* 1988; **1**: 969–971.
- [22] CREASEY AA, DOYLE LV, REYNOLDS MT, JUNG T, LIN LS, VITT CR. Biological effects of recombinant human tumor necrosis factor and its novel muteins on tumor and normal cell lines. *Cancer Res* 1987; **47**: 145–149.
- [23] CREASEY AA, REYNOLDS MT, LAIRD W. Cures and partial regression of murine and human tumors by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1986; **46**: 5687–5690.
- [24] CREASEY AA, YAMAMOTO R, VITT CR. A high molecular weight component of the human tumor necrosis factor receptor is associated with cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 3293–3297.
- [25] CUTURI MC, MURPHY M, COSTA-GIOMI MP, WEINMANN R, PERUSSIA B, TRINCHIERI G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; **165**: 1581–1594.
- [26] DAYER JM, BEUTLER B, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985; **162**: 2163–2168.
- [27] DECKER T, LOHMANN-MATTHES M-L, GIFFORD GE. Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J Immunol* 1987; **138**: 957–962.
- [28] DINARELLO CA, CANNON JG, WOLFF SM, BERNHEIM HA, BEUTLER B, CERAMI A, PALLADINO MA, O'CONNOR JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin-1. *J Exp Med* 1986; **163**: 1433–1450.
- [29] ECKEL RH. Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *New Engl J Med* 1989; **320**: 1060–1068.

- [30] ESPARZA I, MANNEL D, RUPPEL A, FALK W, KRAMMER PH. Interferon γ and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1987; 166: 589–594.
- [31] EVANS CH. Lymphotoxin – an immunologic hormone with anticarcinogenic and antitumor activity. *Cancer Immunol Immunother* 1982; 12: 181–190.
- [32] FIERS W, BEYAERT R, BROUCKAERT P, EVERAERT B, SUFFYS P, TAVEERNIER J, VAN HAESEBROECK B, VAN ROY F. Tumor necrosis factor: A potential antitumor agent? *J Interferon Res* 1987; 7: 627–634.
- [33] FIGARI IS, MORI NA, PALLADINO MA. Regulation of neutrophil migration and superoxide production by recombinant tumor necrosis factors α and β : Comparison to recombinant interferon γ and interleukin-1 α . *Blood* 1987; 70: 979–984.
- [34] FRANSEN L, VAN DER HEYDEN J, RUYSSCHAERT R, FIERS W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986; 22: 419–426.
- [35] FREI E, SPRINGGS D. Tumor necrosis factor: Still a promising agent. *J Clin Oncol* 1989; 7: 291–294.
- [36] GAMBLE JR, HARLAN JM, KLEBANOFF SJ, LOPEZ AF, VADAS MA. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 8667–8671.
- [37] HALLORAN PF, COCKFIELD SM, MADRENAS J. The molecular immunology of transplantation and graft rejection. *Immunol All Clin North America* 1989; 9: 1–19.
- [38] HARANAKA K, SATOMI N. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on the human cancer cells in vitro. *Japan J Exp Med* 1981; 51: 191–194.
- [39] HORI K, EHRKE MJ, MACE K, MACCUBBIN D, DOYLE MJ, OTSUKA Y, MIHICH E. Effect of recombinant human tumor necrosis factor on the induction of murine macrophage tumoricidal activity. *Cancer Res* 1987; 47: 2793–2798.
- [40] HORI K, EHRKE MJ, MACE K, MIHICH E. Effect of recombinant tumor necrosis factor on tumoricidal activation of murine macrophages: Synergism between tumor necrosis factor and γ -interferon. *Cancer Res* 1987; 47: 5868–5874.
- [41] ISHIKURA H, HORI K, BLOCH A. Differential biologic effects resulting from bimodal binding of recombinant human tumor necrosis factor to myeloid leukemia cells. *Blood* 1989; 73: 419–424.
- [42] ITO M, O'MALLEY JA. Antiviral effects of recombinant human tumor necrosis factor. *Lymphokine Res* 1987; 6: 309–317.
- [43] JADUS MR, SCHMUNK G, DJEU JY, PARKMAN R. Morphology and lytic mechanisms of interleukin 3-dependent natural cytotoxic cells: Tumor necrosis factor as a possible mediator. *J Immunol* 1986; 137: 2774–2783.
- [44] JELINEK DF, LIPSKY PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor α and interleukin 1. *J Immunol* 1987; 139: 2970–2976.
- [45] JONES EY, STUART DJ, WALKER NPC. Structure of tumor necrosis factor. *Nature* 1989; 338: 225–228.
- [46] KASHIWA H, WRIGHT SC, BONAVIDA B. Regulation of B cell maturation and differentiation. I. Suppression of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by tumor necrosis factor (TNF). *J Immunol* 1987; 138: 1383–1390.
- [47] KAWAKAMI M, MURASE T, OGAWA H, ISHIBASHI S, MORI N, TAKAKU F, SHIBATA S. Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *J Biochem* 1987; 101: 331–338.
- [48] KIMURA K, TAGUCHI T, URUSHIZAKI I, OHNO R, ABE O, FURUE H, HATTORI T, ICHIHASHI H, INOGUCHI K, MAJIMA H, NIITANI H, OTA K. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; 20: 223–229.
- [49] KLEBANOFF SJ, VADAS MA, HARLAN JM, SPARKS LH, GAMBLE JR, AGOSTI JM, WALTERS-DORPH AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; 136: 4220–4225.
- [50] KOEFFLER HP, GASSON J, RANYARD J, SOUZA L, SHEPARD M, MUNKER R. Recombinant human TNF stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1987; 70: 55–59.
- [51] KOHASE M, HENRIKSEN-DESTEFANO D, MAY LT, VILCEK J, SEHGAL PB. Induction of β 2-interferon by tumor necrosis factor: A homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* 1986; 45: 659–666.
- [52] KRIEGLER M, PEREZ C, DEFAY K, ALBERTI I, LU SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45–53.

- [53] KRONKE M, SCHLUTER C, PFIZENMAIER K. Tumor necrosis factor inhibits MYC expression in HL-60 cells at the level of mRNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 469–473.
- [54] LARRICK JW, GRACHAM D, TOY K, LIN LS, SENYK G, FENDLY BM. Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 1987; **69**: 640–644.
- [55] LAST-BARNEY K, HOMON CA, FAANES RB, MERLUZZI VJ. Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor- α and IL-1. *J Immunol* 1988; **141**: 527–530.
- [56] LEE MD, ZENTELLA A, PEKALA PH, CERAMI A. Effect of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2590–2594.
- [57] LEHMANN V, FREUDENBERG MA, GALANOS C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med* 1987; **165**: 657–663.
- [58] LEBOVICH SJ, POLVERINI PJ, SHEPARD HM, WISEMAN DM, SHIVELY V, NUSEIR N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α . *Nature* 1987; **329**: 630–632.
- [59] LEUNG DY, GEHA RS, NEWBURGER JW, BURNS JC, FIERS W, LAPIERRE LA, POBER JS. Two monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during Kawasaki syndrome. *J Exp Med* 1986; **164**: 1958–1972.
- [60] LOTZ M, VAUGHAN JH, CARSON DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; **241**: 1218–1221.
- [61] MANDA T, SHIMOMURA K, MUKUMOTO S, KOBAYASHI K, MIZOTA T, HIRAI O, MATSUMOTO S, OKU T, NISHIGAKI F, MORI J, KIKUCHI H. Recombinant human tumor necrosis factor- α : Evidence of an indirect mode of antitumor activity. *Cancer Res* 1987; **47**: 3707–3711.
- [62] MEDCALF RF, KRUTHOF EKO, SCHLEUNING W-D. Plasminogen activator inhibitor 1 and 2 are tumor necrosis factor/cachectin-responsive genes. *J Exp Med* 1988; **168**: 751–759.
- [63] MESTAN J, DIGEL W, MITTNACHT S, HILLEN H, BLOHM D, MOLLER A, JACOBSEN H, KIRCHNER H. Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro. *Nature* 1986; **323**: 816–819.
- [64] MING WJ, BERSANI L, MANTOVANI A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1987; **138**: 1469–1474.
- [65] MOORE KL, ESMON CT, ESMON NL. Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* 1989; **73**: 159–165.
- [66] MULLER U, JONGENEEL CV, NEDOSPASOV SA, LINDAHL KF, STEINMETZ M. Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* 1987; **325**: 265–267.
- [67] MUNKER R, GASSON J, OGAWA M, KOEFFLER HP. Recombinant human TNF- α induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; **323**: 79–82.
- [68] MUNKER R, KOEFFLER HP. Tumor necrosis factor. Recent advances. *Klin Wochenschr* 1987; **65**: 345–352.
- [69] NARA K, ODAGIRI H, FUJII M, YAMANAKA Y, YOKOYAMA M, MORITA T, SASAKI M, KON M, ABO T. Increased production of tumor necrosis factor and prostaglandin E₂ by monocytes in cancer patients and its unique modulation by their plasma. *Cancer Immunol Immunother* 1987; **25**: 126–132.
- [70] NAWROTH PP, BANK I, HANDLEY D, CASSIMERIS J, CHESS L, STERN D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* 1986; **163**: 1363–1375.
- [71] NAWROTH PP, STERN DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; **163**: 740–745.
- [72] NIITSU Y, WATANABE N, NEDA H, YAMAUCHI N, MAEDA M, SONE H, KURIYAMA H. Induction of synthesis of tumor necrosis factor in human and murine cell lines by exogenous recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1988; **48**: 5407–5410.
- [73] NISHIMURA T, OHTA S, SATO N, TOGASHI Y, GOTO M, HASHIMOTO Y. Combination tumor-immunotherapy with recombinant tumor necrosis factor and recombinant interleukin 2 in mice. *Int J Cancer* 1987; **40**: 255–261.
- [74] OKUSAWA S, YANCEY KB, van der MEER JWM, ENDRES S, LONNEMANN G, HEFTER K, FRANK MM, BURKE JF, DINARELLO CA, GELFAND JA. C5a stimulates secretion of TNF from human mononuclear cells in vitro. *J Exp Med* 1988; **168**: 443–448.
- [75] OLD LJ. Tumor necrosis factor. *Sci Amer* 1988; **258**: 41–49.
- [76] OLIFF A. The role of tumor necrosis factor (cachectin) in cachexia. *Cell* 1988; **54**: 141–142.
- [77] ORTALDO JR, MASON LH, MATHIESON BJ, LIANG S-M, FLICK DA, HERBERMAN RB. Mediation of mouse natural cytotoxic activity by tumor necrosis factor. *Nature* 1986; **321**: 700–702.

- [78] PALLADINO MA. In vivo antitumor activities of tumor necrosis factor- α . [w] Webb DR, Pierce CW, Cohen S (red.) *Molecular Basis of Lymphokine Action*. New Jersey: Humana Press. 1987: 223–231.
- [79] PATEK PQ, LIN Y, COLLINS JL. Natural cytotoxic cells and tumor necrosis factor activate similar lytic mechanisms. *J Immunol* 1987; **138**: 1641–1646.
- [80] PAUL NL, RUDDLE NH. Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 407–438.
- [81] PENNICA D, HAYFLICK JS, BRINGMAN TS, PALLADINO MA, GOEDDEL DV. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 6060–6064.
- [82] PERLMUTTER DH, DINARELLO CA, PUNSAL PI, COLTEN HR. Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest* 1986; **78**: 1349–1354.
- [83] PETERS PM, ORTALDO JR, SHALABY MR, SVEDERSKY LP, NEDWIN GE, BRINGMAN TS, HASS PE, AGGARWAL BB, HERBERMAN RB, GOEDDEL DV, PALLADINO MA. Natural killer-sensitive targets stimulate production of TNF- α but not TNF- β (lymphotoxin) by highly purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J Immunol* 1986; **137**: 2592–2598.
- [84] PFIZENMAIER K, KRONKE M, SCHEURICH P, NAGEL GA. Tumor necrosis factor (TNF) α : Control of TNF-sensitivity and molecular mechanisms of TNF-mediated growth inhibition. *Blut* 1987; **55**: 1–10.
- [85] PFIZENMAIER K, SCHEURICH P, SCHLUTER C, KRONKE M. Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 1987; **138**: 975–980.
- [86] PHILIP R, EPSTEIN LB. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature* 1986; **323**: 86–89.
- [87] PIGUET P-F, GRAU GE, ALLET B, VASSALLI P. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med* 1987; **166**: 1280–1289.
- [88] POBER JS. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol* 1988; **133**: 426–433.
- [89] PUJOL-BORRELL R, TODD I, DOSHI M, BOTTAZZO GF, SUTTON R, GRAY D, ADOLF GR, FELDMANN M. HLA class II induction in human islet cells by interferon- γ plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* 1987; **326**: 304–306.
- [90] RANGES GE, ZLOTNIK A, ESPEVIK T, DINARELLO CA, CERAMI A, PALLADINO MA. Tumor necrosis factor α /cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J Exp Med* 1988; **167**: 1472–1478.
- [91] ROTHSTEIN JL, SCHREIBER H. Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 607–611.
- [92] RUBIN BY, ANDERSON SL, SULLIVAN SA, WILLIAMSON BD, CARSWELL EA, OLD LJ. Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1986; **164**: 1350–1355.
- [93] RUDDLE NH. Tumor necrosis factor and related cytotoxins. *Immunol Today* 1987; **8**: 129–130.
- [94] RUGGIERO V, JOHNSON SE, BAGLIONI C. Protection from tumor necrosis factor cytotoxicity by protease inhibitors. *Cellular Immunol* 1987; **107**: 317–325.
- [95] RUGGIERO V, LATHAM K, BAGLIONI C. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J Immunol* 1987; **138**: 2711–2717.
- [96] SAKLATVALA J. Tumor necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986; **322**: 547–549.
- [97] SARIBAN E, IMAMURA K, LUEBBERS R, KUFEL D. Transcriptional and posttranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest* 1988; **81**: 1506–1510.
- [98] SATO N, FUKUDA K, NARIUCHI H, SAGARA N. Tumor necrosis factor inhibiting angiogenesis in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1987; **79**: 1383–1391.
- [99] SATO N, GOTO T, HARANAKA K, SATOMI N, NARIUCHI H, MANO-HIRANO Y, SAWASAKI Y. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: Morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 1986; **76**: 1113–1121.
- [100] SCHEURICH P, KRONKE M, SCHLUTER C, UCER U, PFIZENMAIER K. Noncytotoxic mechanisms of action of tumor necrosis factor- α on human tumor cells: Enhancement of HLA gene expression synergistic with interferon- γ . *Immunobiology* 1986; **172**: 291–300.
- [101] SCHEURICH P, THOMA B, UCER U, PFIZENMAIER K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF)- α : induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α -mediated enhancement of T cell responses. *J Immunol* 1987; **138**: 1786–1790.
- [102] SCHILLER JH, BITTNER G, STORER B, WILLSON JKV. Synergistic antitumor effects of tumor necrosis factor and γ -interferon on human colon carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1987; **47**: 2809–2813.

- [103] SCHMID DS, HORNUNG R, MCGRATH KM, PAUL N, RUDDLE NH. Target cell DNA fragmentation is mediated by lymphotoxin and tumor necrosis factor. *Lymphokine Res* 1987; 6: 195–202.
- [104] SCUDERI P, LAM KS, RYAN KJ, PETERSEN E, STERLING KE, FINLEY PR, RAY CG, SLYMEN DJ, SALMON SE. Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections. *Lancet* 1986; 2: 1364–1365.
- [105] SELBY P, HOBBS S, VINER C, JACKSON E, JONES A, NEWELL D, CALVERT AH, MCELWAIN T, FEARON K, HUMPHREYS J, SHIGA T. Tumor necrosis factor in man: Clinical and biological observations. *Br J Cancer* 1987; 56: 803–808.
- [106] SHALABY MR, AGGARWAL BB, RINDERKNECHT E, SVEDERSKY LP, FINKLE BS, PALLADINO MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- γ and tumor necrosis factors. *J Immunol* 1985; 135: 2069–2073.
- [107] SHERMAN ML, SPRIGGS DR, ARTHUR KA, IMAMURA K, FREI III E, KUFEL DW. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: Phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J Clin Oncol* 1988; 6: 344–350.
- [108] SHIER WT. Tumor necrosis factor – the final chapter in the story of Coley's toxins? *J Toxicol – Toxin Reviews* 1985; 4: 3–8.
- [109] SHIMOMURA K, MANDA T, MUKUMOTO S, KOBAYASHI K, NAKANO K, MORI J. Recombinant human tumor necrosis factor- α : Thrombus formation is a cause of anti-tumor activity. *Int J Cancer* 1988; 41: 243–247.
- [110] SILBERSTEIN DS, DAVID JR. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1055–1059.
- [111] SLORDAL L, WARREN DJ, MOORE MAS. Effect of recombinant murine tumor necrosis factor on hemopoietic reconstitution in sublethally irradiated mice. *J Immunol* 1989; 142: 833–835.
- [112] SMITH RA, BAGLIONI C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987; 262: 6951–6954.
- [113] SPIES T, MORTON CC, NEDOSPASOV SA, FIERS W, PIOUS D, STROMINGER JL. Genes for the tumor necrosis factor α and β are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8699–8702.
- [114] STOLPEN AH, GUINAN EC, FIERS W, POBER JS. Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 1986; 123: 16–24.
- [115] SUFFYS P, BEYAERT R, van ROY F, FIERS W. Reduced tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 149: 735–743.
- [116] SUGARMAN BJ, AGGARWAL BB, HASS PE, FIGARI IS, PALLADINO MA, SHEPARD HM. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 943–945.
- [117] SUGARMAN BJ, LEWIS GD, EESSALU TE, AGGARWAL BB, SHEPARD HM. Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer Res* 1987; 47: 780–786.
- [118] TALMADGE JE. Therapeutic potential of cytokines: A comparison of preclinical and clinical studies. *Prog Exp Tumor Res* 1988; 32: 154–173.
- [119] TALMADGE JE, BOWERSOX O, TRIBBLE H, SHEPARD M, LIGGITT D. Therapeutic and toxic activity of tumor necrosis factor is synergistic with gamma interferon. *Pathol Immunopathol Res* 1989; 8: 21–34.
- [120] TALMADGE JE, PHILLIPS H, SCHNEIDER M, ROWE T, PENNINGTON R, BOWERSOX O, LENZ B. Immunomodulatory properties of recombinant murine and human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1988; 48: 544–550.
- [121] TALMADGE JE, TRIBBLE HR, PENNINGTON RW, PHILLIPS H, WILTROUT RH. Immunomodulatory and immunotherapeutic properties of recombinant γ -interferon and recombinant tumor necrosis factor in mice. *Cancer Res* 1987; 47: 2563–2570.
- [122] TORTI FM, DIECKMANN B, BEUTLER B, CERAMI A, RINGOLD GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: An in vitro model of cachexia. *Science* 1985; 229: 867–869.
- [123] TRACEY K, LOWRY S, BEUTLER B, CERAMI A, ALBERT J, SHIRES GT. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes in skeletal muscle transmembrane potential. *J Exp Med* 1986; 164: 1368–1373.
- [124] TRACEY KJ, VLASSARA H, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor. *Lancet* 1989; 1: 1122–1125.
- [125] TRACEY KJ, WEI H, MANOGUE KR, FONG Y, HESSE DG, NGUYEN HT, KUO GC, BEUTLER B, COTRAN RS, CERAMI A, LOWRY SF. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med* 1988; 167: 1211–1227.

- [126] TSUJIMOTO M, YIP YK, VILCEK J. Interferon- γ enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; **136**: 2441–2444.
- [127] URBASCHEK R, MANNEL DN, URBASCHEK B. Tumor necrosis factor induced stimulation of granulopoiesis and radioprotection. *Lymphokine Res* 1987; **6**: 179–186.
- [128] URBASCHEK R, URBASCHEK B. Tumor necrosis factor and interleukin 1 as mediators of endotoxin-induced beneficial effects. *Rev Infect Dis* 1987; **9**, suppl. 5: 607–615.
- [129] VILCEK J, PALOMBELLA VJ, HENRIKSEN-DESTEFANO D, SWENSON C, FEINMAN R, HIRAI M, TSUJIMOTO M. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986; **163**: 632–643.
- [130] VLASSRA H, BROWNLEE M, MANOGUE KR, DINARELLO CA, PASAGIAN A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins. Role in normal tissue remodeling. *Science* 1988; **240**: 1546–1548.
- [131] WAAGE A, ESPEVIK T. Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor α /cachectin in mice. *J Exp Med* 1988; **167**: 1987–1992.
- [132] WAAGE A, HALSTENSEN A, ESPEVIK T. Association between tumor necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1987; **1**: 355–357.
- [133] WANG AM, CREASEY AA, LANDER MB, LIN LS, STRICKLER J, van ARSDELL JN, YAMAMOTO R, MARK DF. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science* 1985; **228**: 149–154.
- [134] WINKELHAKE JL, STAMPFL S, ZIMMERMAN RJ. Synergistic effects of combination therapy with human recombinant interleukin-2 and tumor necrosis factor in murine tumor models. *Cancer Res* 1987; **47**: 3948–3953.
- [135] WONG GHW, GOEDDEL DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science* 1988; **242**: 941–944.
- [136] ZHANG Y, LIN J-X, YIP YK, VILCEK J. Enhancement of c-AMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts. Role in the induction of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6802–6805.
- [137] ZIEGLER-HEITBROCK HWL, MOLLER A, LINKE RP, HAAS JG, RIEBERG EP, THMULLER RIE. Tumor necrosis factor as effector molecule in monocyte mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 1986; **46**: 5947–5952.

Otrzymano: 19 października 1989

Przyjęto: 11 lipca 1990

Adres Autorki: ul. Chałubińskiego 5, Warszawa

ZASTOSOWANIE ELEKTRONICZNEGO FRAKCJONOWANIA CHROMOSOMÓW DO KONSTRUKCJI CHROMOSOMOWO-SPECYFICZNYCH BIBLIOTEK DNA CZŁOWIEKA

CONSTRUCTION OF HUMAN CHROMOSOME-SPECIFIC DNA LIBRARIES AFTER SORTING BY FLOW CYTOMETRY

Jadwiga JARUZELSKA¹ i Nikolaus BLIN²

¹Zakład Genetyki Człowieka PAN, ²Instytut Genetyki Człowieka, Klinika Uniwersytetu Saarbruecken

Streszczenie. Technika elektronicznej analizy i sortowania staje się użytecznym narzędziem, pozwalającym uzyskać pojedynczy chromosom w wystarczającej liczbie i o wysokiej czystości do konstrukcji chromosomowo-specyficznych bibliotek DNA. W tym celu chromosomy są izolowane z komórek metafazowych, barwione barwnikiem fluorescencyjnym, klasyfikowane, a następnie sortowane według zawartości barwnika za pomocą cytometru przepływowego. Skonstruowanie bibliotek wszystkich chromosomów człowieka w znaczny sposób ułatwiło analizę chorób genetycznych.

Summary. Flow cytometry and sorting are becoming increasingly useful as tools in obtaining chromosomes of a single type appropriate for construction of chromosome-specific DNA libraries. For analysis with flow cytometry, the chromosomes are extracted from mitotic cells, stained with one or more fluorescent dyes, classified one by one and sorted according to their dye content(s). Chromosome-specific DNA libraries of all 24 human chromosomes have now been constructed. The availability of these libraries greatly enhances the molecular analysis of genetic diseases.

WSTĘP

Rozwój technik klonowania DNA z zastosowaniem pochodnych faga lambda jako wektorów umożliwił konstrukcję bibliotek DNA organizmów o złożonych genomach, w tym człowieka i innych ssaków oraz izolację specyficznych sekwencji DNA przy zastosowaniu różnych metod selekcji. Biblioteki DNA poszczególnych chromosomów sta-

nowią podzbiór informacji genetycznej i stąd mają szczególne zalety w porównaniu z bibliotekami reprezentującymi cały genom komórki. Konstrukcja pierwszych bibliotek zawierających DNA chromosomu sięga przełomu lat 1970–1980. Stosowano wówczas mało dokładne metody oczyszczania chromosomów. Polegały one głównie na frakcjonowaniu metafazowych chromosomów na podstawie pomiaru szybkości sedymentacji, wirowania równowagowego, selektywnej filtracji według wielkości, elektroogniskowania na podstawie różnic ładunku [22]. Technika elektronicznego sortowania chromosomów gryzoni i człowieka pozwoliła uzyskać bardzo czyste frakcje oraz umożliwiła konstrukcję bibliotek DNA znacznie wzbogaconych w sekwencje danego chromosomu [10, 15, 28]. Biblioteki DNA specyficznych chromosomów mają szczególne zastosowanie w klonowaniu i mapowaniu genów ludzkich oraz badaniu ich ekspresji i organizacji i dlatego znalazły one szerokie zastosowanie w genetyce człowieka.

Około 25 lat temu skonstruowano pierwsze urządzenia, zwane cytometrami przepływowymi (z ang. *flow cytometer*), służące do frakcjonowania komórek na podstawie określonych właściwości, takich jak rozpraszanie lub absorpcja światła, fluorescencja lub opór elektryczny. Przez pomiar tych parametrów analizowane są takie własności komórek, jak: kształt [2], wielkość, żywotność, obecność specyficznych enzymów lub przeciwciał, zawartość kwasów nukleinowych. Cytometry przepływowe stały się bardzo przydatnym narzędziem w naukach biomedycznych, ponieważ umożliwiły szybką i precyzyjną identyfikację oraz oczyszczanie subpopulacji komórek, np. leukocytów, komórek szpiku i komórek nowotworowych. Rozwój metod cytochemicznych, biofizycznych oraz technologii komputerowej umożliwił również analizę struktur subkomórkowych, w tym chromosomów metafazowych [3].

HODOWLE KOMÓRKOWE

Jako źródło chromosomów do analizy w cytometrze przepływowym stosuje się najczęściej ludzkie fibroblasty, komórki limfoblastoidalne oraz hybrydy komórkowe uzyskane z fuzji komórek chomika lub myszy [27] z komórkami człowieka. Wybór metody hodowli zależy od typu komórek, np. fibroblasty hodowane są jednowarstwowo, komórki limfoblastoidalne w zawiesinie, natomiast hybrydy komórkowe za pomocą obydwu metod. Chromosomy mitotyczne izolowane są z hodowli znajdującej się w eksponencjalnej fazie wzrostu, po uprzedniej inkubacji komórek z kolcemidem powodującym zatrzymanie podziału komórek w metafazie. Czas inkubacji komórek z kolcemidem oraz stężenie kolcemidu są kluczowe dla uzyskania chromosomów dobrej jakości: zbyt wysokie stężenie kolcemidu lub zbyt długi czas inkubacji powodują silną spiralizację chromosomów utrudniając przez to ich mikroskopową identyfikację [28].

PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY CHROMOSOMÓW

Podstawowym warunkiem elektronicznej analizy chromosomów oraz ich sortowania jest odpowiednia jakość zawiesiny chromosomów metafazowych. Przygotowanie zawiesiny

chromosomów do analizy w cytometrze polega na: spowodowaniu pęcznienia komórek w płynie hipotonicznym po zakończeniu hodowli, mechanicznej dezintegracji komórek w obecności detergentu oraz wybarwieniu chromosomów fluorescencyjnym barwnikiem wiążącym się z DNA. Optymalne pH stosowane podczas przygotowania zawiesiny chromosomów wynosi 7,0–8,0. Zastosowanie niższego pH powoduje wzrost tła poprzez destabilizację struktury chromosomów. Metody otrzymywania zawiesiny chromosomów różnią się przede wszystkim pod względem buforu stosowanego do stabilizacji struktury chromosomów. We wcześniejszej metodzie izolacji chromosomów stosowano bufor zawierający jako czynnik stabilizujący glikol heksylenowy [28]. Użyteczność tej metody polega na tym, że uzyskane po sortowaniu chromosomy można identyfikować cytologicznie stosując metody prążkowe i w ten sposób ocenić czystość frakcji. Jednak uzyskana tą metodą zawiesina chromosomów zanieczyszczona jest szczątkami komórkowymi, a cząsteczki uzyskanego DNA są stosunkowo niewielkie.

Dwie nowsze metody to: metoda z zastosowaniem siarczanu magnezu jako czynnika stabilizującego [26] oraz metoda z zastosowaniem poliamin [28]. Obydwie te metody można stosować do różnego typu komórek. Obecność $MgSO_4$ lub czynników redukujących, takich jak ditiotreitol, znacznie stabilizuje strukturę chromosomów, obniża zawartość zlepów chromosomów oraz szczątków komórkowych pozwalając zastosować łagodniejszą technikę dezintegracji błon komórkowych. Samą stabilność struktury chromosomów można również podwyższać przez użycie jodku propydyiny [12].

W metodzie z zastosowaniem poliamin zawiesina chromosomów zawiera mało szczątków komórek, a wielkość uzyskanych cząsteczek DNA jest wystarczająca do ligacji z niektórymi typami wektorów i konstrukcji bibliotek zawierających inserty o średniej wielkości wynoszącej kilka tysięcy par nukleotydów. Chromosomy izolowane metodą z zastosowaniem siarczanu magnezu lub metodą z zastosowaniem poliamin przechowywane w temp. 4°C zachowują stabilność przez kilka miesięcy. Wadą tych metod jest trudność w przeprowadzeniu kontroli cytogenetycznej chromosomów z powodu ich silnej spiralizacji. Uzyskanie wzoru prążkowego jest w tym przypadku możliwe jedynie przy zastosowaniu kwinakryny [16].

BARWIENIE CHROMOSOMÓW

Izolowane chromosomy są barwione jednym lub kilkoma barwnikami, najczęściej fluorescencyjnymi, specyficznymi wiążącymi się z DNA. Jeżeli barwniki stosowane do barwienia DNA w chromosomach mają także powinowactwo do RNA, zawiesinę chromosomów należy poddać trawieniu RNazą. Stosowane barwniki to: jodek propydynowy i bromek etydynowy [12], wiążące się z podwójną nicią DNA niezależnie od składu zasad, Hoechst 33258 (Ho) i 4,6-dwuamidyno-2-fenyloindol (DAPI) wiążące się preferencyjnie z parami AT oraz chromomycyna A3 (CA3) i mitramycyna wiążące się preferencyjnie z parami GC. Najczęściej stosowanym zestawem barwników jest: Hoechst 33258 oraz chromomycyna A3 [1, 11, 12]. Zastosowanie dwóch barwników podwyższa rozdzielczość analizy. W przypadku komórek o niestabilnym karyotypie, przed przystąpieniem do elektronicznej analizy należy przeprowadzić kontrolę cytogenetyczną w celu ustalenia, czy badany chromosom jest obecny w zawiesinie

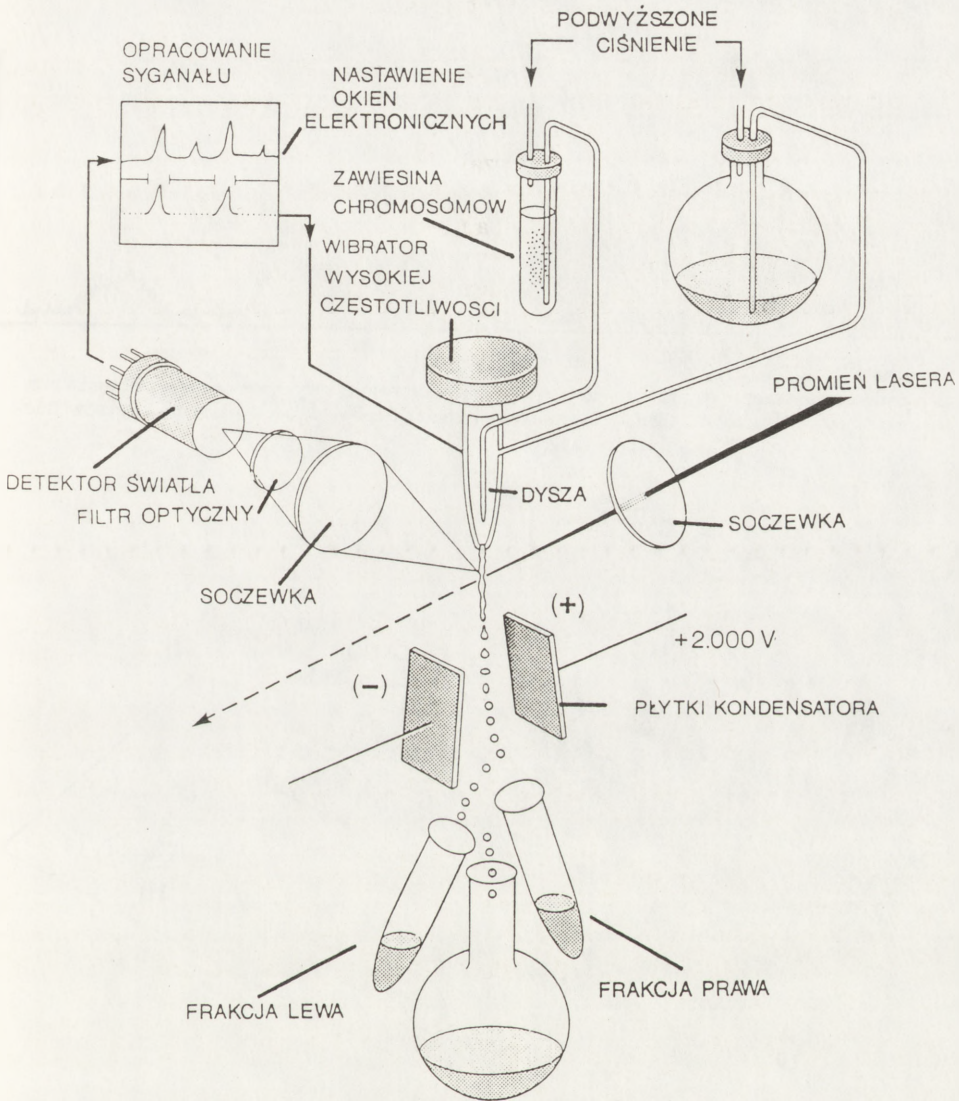
SORTOWANIE

Ogólna zasada sortowania chromosomów przedstawiona jest na rysunku 1.

Pod wpływem sprężonego powietrza zawiesina chromosomów wraz z odpowiednim buforem tłoczona są do odpowiedniego zbiornika, w którym przekształcane są w jednolity cienki strumień napotyający u wylotu (dysza) wiązkę światła monochromatycznego. Źródłem wiązki jest najczęściej laser argonowy emitujący światło UV lub światło o innej długości fali. W ten sposób zostaje wzbudzona fluorescencja barwnika w chromosomie. Fluorescencja ta jest poprzez odpowiednie filtry przekazywana do fotodetektorów. Detektory te oraz sprzężony z nimi układ elektroniczny zamieniają fluorescencję na sygnały elektryczne, których amplituda jest proporcjonalna do całkowitej fluorescencji rejestrowanej przez detektor. Sygnały te są następnie opracowywane przez system komputerowy. Poprzez zastosowanie barwnika wiążącego się specyficznie z DNA przeprowadzany jest pomiar ilości DNA w chromosomie. W podobny sposób można również oznaczać skład zasad lub stopień kondensacji chromatyny. Uzyskany w rezultacie rozkład wartości fluorescencji, odpowiadających ilości DNA w chromosomie, jest przedstawiony w postaci tzw. przepływowego karyogramu (ang. *flow karyogram*, rys. 2).

Niejednokrotnie przeprowadza się, przez zastosowanie dwóch fluorochromów, równoczesny pomiar zawartości par AT i GC w nici kwasu nukleinowego lub pomiar kwasu nukleinowego i białka (rys. 3).

Funkcja większości cytometrów przepływowych ograniczona jest jedynie do pomiaru określonych sygnałów w cząstkach biologicznych i przedstawienia uzyskanych wartości w formie wykresu. Inne cytometry skonstruowane w systemie FACS (ang. *Fluorescence Activated Cell Sorting*), poza analizą określonych parametrów, dokonują sortowania biologicznych cząstek, w tym również chromosomów. Pozwala to uzyskać frakcję zawierającą komórki lub chromosomy tylko jednego rodzaju. W tym celu należy wybrać zakres fluorescencji (ang. *electronic window*) odpowiadający w karyogramie przepływowym danemu chromosomowi (lub dwa zakresy, odpowiadające 2 chromosomom – rys. 1). Jednocześnie strumień chromosomów wypływający z otworu dyszy o średnicy 50 μm jest, poprzez zastosowanie wibracji o częstotliwości 40000 Hz, rozbijany na krople zawierające tylko po jednym chromosomie. Powstająca kropla, zanim oderwana zostanie od strumienia, napotyka wiązkę lasera wzbudzającego fluorescencję w zawartym w niej chromosomie. Jeżeli wartość fluorescencji w chromosomie odpowiada jednemu z dwóch wybranych zakresów, powstająca kropla uzyskuje ładunek elektryczny (+ lub -) i poprzez odchylenie jej w polu elektromagnetycznym wytwarzanym przez płytki kondensatora o napięciu 2000 V, zostaje skierowana do lewego lub prawego zbiorczego naczynia. Krople zawierające inne chromosomy nie uzyskują ładunku, nie ulegają odchyleniu i przechodzą do środkowego naczynia zbiorczego [3]. Otrzymanie frakcji o wysokiej czystości, zawierającej tylko określony chromosom, jest trudne, gdy chromosomy są zbliżone wielkością i charakteryzują się podobną zawartością DNA. Podwyższenie rozdzielczości metody uzyskano przez skonstruowanie sorterów o dwóch laserach. Chromosomy analizowane w tym systemie barwione są dwoma barwnikami fluorescencyjnymi. Wzbudzenie fluorescencji przy pomocy dwóch laserów równocześnie, umożliwia powstanie dwóch różnych sygnałów optycznych dla każdego chromosomu. Jednak pomimo zastosowania podwójnego systemu pomiarowego (dwa lasery) rozfrakcjonowanie grupy ludzkich chromosomów 9–12 oraz 14 lub 15 jest

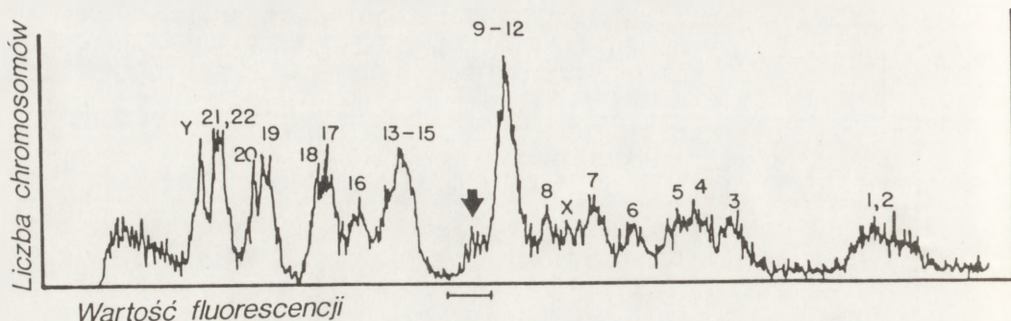


Rys. 1. Schemat cytometru przepływowego z zastosowaniem lasera jako źródła światła; przedstawiono sposób opracowania sygnału fluorescencyjnego w trakcie elektronicznego sortowania [3]

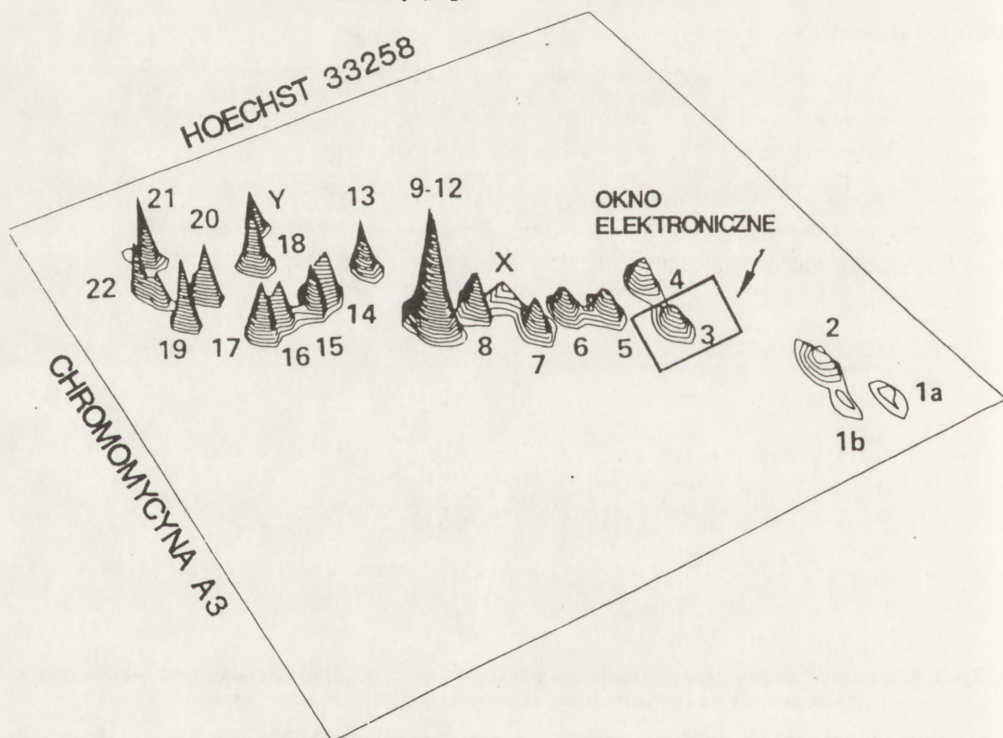
możliwe jedynie [11] przy zastosowaniu hybryd komórkowych. Najczęściej stosowano do tego celu hybrydy komórek człowieka oraz chomika zawierające tylko niektóre chromosomy człowieka [28].

Pomimo że ulepszone techniki klonowania umożliwiają obecnie zastosowanie mniejszej liczby chromosomów do konstrukcji biblioteki (10^6), uzyskanie liczby chromosomów danego rodzaju wystarczającej do konstrukcji biblioteki DNA wymaga jednak dość długiego czasu pracy sortera (ok. 9 dni) [28]. W celu skrócenia czasu sortowania zmodyfiko-

wano system FACS poprzez zwiększenie szybkości przepływu strumienia zawiesiny chromosomów oraz szybkości komputerowego opracowania sygnałów fluorescencji. W ten



Rys. 2. Karyogram uzyskany w cytometrze przepływowym na podstawie analizy chromosomów człowieka przy zastosowaniu pojedynczego lasera, strzałką oznaczono wierzchołek odpowiadający wybranemu zakresowi fluorescencji (ang. *electronic window*) [3]



Rys. 3. Karyogram chromosomów człowieka uzyskany w cytometrze przepływowym przy zastosowaniu dwóch barwników fluorescencyjnych oraz dwóch laserów jako źródła światła, na trójwymiarowym wykresie zaznaczono wierzchołek odpowiadający wybranemu zakresowi fluorescencji, zawierający chromosom 3 [28]

sposób w sorterach nowszej generacji chromosomy są analizowane oraz sortowane z szybkością 20000/s, tzn. ok. 20-krotnie szybciej niż w systemie konwencjonalnym. W tych

warunkach czas konieczny do uzyskania liczby chromosomów wystarczającej do konstrukcji biblioteki wynosi 1 godz. W praktyce czas ten jest kilkukrotnie dłuższy, ponieważ należy przygotować większą ilość chromosomów, tzn. kilka milionów [11]. W sorterach najnowszej generacji unowocześniono również konstrukcję dyszy uzyskując wyższą stabilność mechanizmu tworzenia kropeł. Pozwala to (pomimo tak dużej szybkości przepływu) zachować wysoką rozdzielczość i uzyskać frakcje chromosomów wysokiej czystości [11, 28].

WERYFIKACJA CHROMOSOMÓW PO SORTOWANIU

Stosowanych jest kilka metod weryfikacji uzyskanych po sortowaniu frakcji chromosomów. Jeżeli źródłem chromosomów są nietrawne pod względem karyotypu hybrydy komórkowe, konieczna jest kontrola cytogenetyczna. W hybrydach komórkowych mogą występować np. translokacje pomiędzy ludzkim chromosomem a chromosomem chomika, a powstałe w ten sposób chromosomy mogą imitować inny chromosom pod względem zawartości DNA oraz składu zasad. Istnieje kilka metod oceny sortowanej frakcji chromosomów:

- Ocena lokalizacji wierzchołka odpowiadającego danemu ludzkiemu chromosomowi w karyogramie przepływowym, przez porównanie z wierzchołkami pozostałych chromosomów człowieka lub przez porównanie z wierzchołkami markerowych chromosomów chomika, których względna lokalizacja w stosunku do normalnych chromosomów ludzkich jest dobrze poznana [28].

- W przypadku stosowania hybryd komórkowych należy ocenić zanieczyszczenie frakcji zawierającej ludzki chromosom przez chromosomy chomika. Dokonuje się tego na poziomie biblioteki DNA ludzkiego chromosomu, przez hybrydyzację na nitrocelulozie klonów biblioteki ze znakowanym całkowitym DNA chomika oraz z DNA człowieka. Klony zawierające DNA chomika hybrydują z DNA chomika, natomiast nie hybrydują z DNA człowieka [19, 21]. Kontrola klonów wyselekcjonowanych z biblioteki DNA uzyskanej z sortowanych chromosomów jest ostatecznym sprawdzianem jakości procesu sortowania i klonowania chromosomu.

- Hybrydyzacja na nitrocelulozie lub szkiełku mikroskopowym znakowanych izotopowo lub fluorescencyjnie sond DNA, komplementarnych do DNA człowieka i chomika, z sortowaną frakcją chromosomu jest stosowana w celu stwierdzenia, czy uzyskano właściwy chromosom ludzki [28].

- Metoda analizy prążkowej sortowanych chromosomów nie jest rutynowo stosowana, szczególnie jeśli zawiesina chromosomów była przygotowana metodą z użyciem siarczanu miedzi lub poliamin, które powodują zbyt silną spiralizację chromosomów.

- W celu amplifikacji *in vitro* sekwencji specyficznych dla badanego chromosomu chromosomy sortowane są bezpośrednio do naczynia zawierającego DNA polimerazę z *Thermus aquaticus* (polimeraza Taq). Do amplifikacji za pomocą metody łańcuchowej reakcji z polimerazą (PCR – *polymerase chain reaction*) wystarczy użyć ok. 200 chromosomów [6].

Żadna z przedstawionych metod kontroli czystości DNA na poziomie biblioteki lub frakcji chromosomów nie jest w pełni zadowalająca, stąd zwykle stosuje się kilka metod jednocześnie. Czystość frakcji chromosomu powinna przekraczać 90%.

IZOLACJA DNA Z CHROMOSOMÓW ORAZ KLONOWANIE

Obecnie, dzięki zwiększeniu wydajności klonowania, do konstrukcji pełnej biblioteki wystarczy ok. 200 000 chromosomów [10]. Wymagana wielkość fragmentów DNA w sortowanych chromosomach powinna przekraczać 50 kb [20]. Dzięki udoskonaleniu metod sortowania, możliwe jest obecnie uzyskanie DNA o wielkości kilkuset tysięcy par nukleotydów. W izolacji DNA z chromosomów stosuje się klasyczną metodę z użyciem SDS, proteiny K oraz ekstrakcji fenolem. Oczyszczony DNA poddawany jest trawieniu odpowiednim enzymem restrykcyjnym, a następnie – w procesie ligacji – łączeniu z poddanymi uprzednio defosforylacji końcami fagowego wektora. Uzyskane w ten sposób rekombinanty poddaje się pakowaniu do główek faga i tak przygotowanymi fagami infekuje się odpowiedni szczep bakterii. W klonowaniu chromosomów, ze względu na małą ilość materiału wyjściowego (sortowane chromosomy), należy dbać o wysoką wydajność każdego etapu. Wydajności klonowania poszczególnych chromosomów człowieka znacznie się różniły, pomimo zastosowania podobnej liczby chromosomów. W skrajnych przypadkach sklonowana ilość DNA odpowiadała DNA zawartemu w jednym chromosomie. Dotyczyło to klonowania chromosomu 4, 13 i 17. Natomiast w przypadku chromosomu 18 uzyskano w bibliotece liczbę klonów odpowiadającą 72 chromosomom tej pary [10].

PROGRAM KONSTRUKCJI BIBLIOTEK CHROMOSOMÓW CZŁOWIEKA

Pierwszą biblioteką chromosomową była biblioteka chromosomu X człowieka [10], a następną biblioteka chromosomu X myszy [27]. Następnie skonstruowano biblioteki chromosomów 21 i 22 człowieka [10]. Kilka grup na świecie skonstruowało biblioteki kolejnych chromosomów człowieka: chromosom ludzki 1 [28], 7 [24], 13 [10], 15 [8], 16 [13], Y [10].

W pierwszej fazie skonstruowano biblioteki każdego z 24 chromosomów człowieka [7, 10, 28]. W tym celu fragmenty chromosomowych DNA o wielkości ok. 9 tysięcy par zasad uzyskane po trawieniu enzymem restrykcyjnym, poddawano ligacji z fagowym wektorem Charon 21A. Laboratoria Los Alamos i Livermore wykonały niezależnie zadanie konstrukcji pełnego zestawu bibliotek chromosomowych człowieka. Różnica w strategii polegała jedynie na wyborze do klonowania innego unikalnego miejsca restrykcyjnego w wektorze Charon 21A (Los Alamos – Hind III, Livermore – Eco RI). Zadania pierwszej fazy programu zostały ukończone w 1986 r. i ok. 2400 próbek bibliotek rozesłano do ok. 300 laboratoriów oraz do banku tkanek – American Type Culture Collection w Rockville w Stanach Zjednoczonych [53]. Biblioteki te, pomimo że zawierają stosunkowo niewielkie fragmenty Hind III i Eco RI chromosomowego DNA, są bardzo użyteczne w genetyce, będąc źródłem sond molekularnych stosowanych w diagnostyce chorób genetycznych (analiza RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

W tej fazie realizacji projektu dla większości chromosomów człowieka uzyskano biblioteki zawierające średnio 5-krotnie więcej DNA niż pojedynczy chromosom. Statystyczne prawdopodobieństwo znalezienia danej sekwencji w specyficznej bibliotece o tej pojemności wynosi ok. 0,90 [11]. Do konstrukcji takiej biblioteki potrzeba ok. 0,1 mikro-

gramów chromosomowego DNA, który można w tej ilości uzyskać z ok. 5×10^5 chromosomów średniej wielkości.

Realizacja drugiej fazy projektu jest w toku i polega na klonowaniu większych fragmentów DNA: o wielkości 20 kz w bakteriofagach oraz 40 kz w kosmidach. Biblioteki uzyskiwane w tej fazie ze względu na dość dużą wielkość klonowanych fragmentów chromosomowego DNA nadają się do badań struktury i funkcji genów. W drugiej fazie realizacji programu, dotyczącego klonowania DNA, materiałem do izolacji chromosomów są komórki limfoblastoidalne oraz hybrydy komórek człowieka i myszy [27]. Czystość sortowanych chromosomów uzyskiwanych z tych komórek wynosi ponad 90%. W tej fazie realizacji programu konstrukcji bibliotek konieczne jest przeprowadzenie transformacji komórek limfoidalnych wirusem Epsteina Barra, co pozwala na uzyskanie dużej ilości materiału komórkowego do izolacji chromosomów. Fakt, że transformacji tym wirusem towarzyszy rearanżacja niektórych genów, nie powinien stanowić przeszkody dla większości grup badawczych, ponieważ tylko mała frakcja genomu wydaje się być naruszona w trakcie integracji wirusa.

Uzyskano i scharakteryzowano biblioteki chromosomu 19 i chromosomu X w wektorach będących modyfikacjami faga lambda. W tych wektorach skonstruowano również biblioteki chromosomów: 4, 5, 8, 11, 16, 19, 21, 22 i Y, a w kosmidach biblioteki chromosomów: 4, 5, 8, 16, 19, 21, 22 i Y. Są one w trakcie opracowywania [27]. Dalszy rozwój metod sortowania chromosomów zmierza w kierunku uzyskania dłuższych o rząd wielkości fragmentów DNA, które mogą znaleźć zastosowanie w programie mapowania oraz sekwencjonowania ludzkiego genomu, jak również mogą posłużyć jako model do klonowania chromosomów roślin. Kandydatem do takich badań u roślin jest obecnie kukurydza [28].

ZAKOŃCZENIE

Oczekiwania związane z konstrukcją chromosomowo-specyficznych bibliotek DNA spełniły się w dużym stopniu, jeśli chodzi o ich zastosowanie w genetyce człowieka. Biblioteki chromosomowe są w szczególności wykorzystywane w diagnostyce chorób przez analizę RFLP oraz w badaniach podstawowych mających na celu identyfikację loci, których defekty powodują wystąpienie chorób genetycznych. Dotyczy to w szczególności chorób o mendlowskim typie dziedziczenia. Biblioteki chromosomowo-specyficznego DNA odegrały kluczową rolę w rozwoju tzw. *reverse genetics*. To podejście badawcze polega na identyfikacji locus, którego delecja lub mutacja punktowa powoduje wystąpienie choroby, ale informacja kodowana w tym locus nie jest poznana. Najbardziej typowym przykładem tej metodologii było zastosowanie biblioteki chromosomu X do identyfikacji locus, którego delecja powoduje dystrofię mięśniową Duchenne'a [14] oraz przewlekłą ziarnicę [18].

Alternatywna metoda mapowania specyficznych sekwencji DNA, nie wymagająca zastosowania sortera chromosomów, polega na wycięciu (*microdissection*) i klonowaniu pojedynczego prążka chromosomu. Zastosowano ją po raz pierwszy w 1981 r. [23] do analizy politenicznych chromosomów *Drosophila melanogaster*, a następnie do analizy chromosomów ssaków [9]. Metoda ta została obecnie zastosowana również w badaniach chromosomów człowieka [4], z równoczesnym zastosowaniem reakcji amplifikacji specyficznych sekwencji *in vitro* za pomocą polimerazy Taq [17].

W dalszym etapie prac dotyczących sortowania i klonowania chromosomów dąży się do uzyskania jeszcze wyższej wydajności sortowania, pozwalającej uzyskać większe fragmenty DNA rzędu megazasad, aby je następnie frakcjonować przy zastosowaniu elektroforezy w pulsującym polu elektrycznym (ang. PFGE – *Pulse Field Gel Electrophoresis*) [25]. Innym kierunkiem prac jest klonowanie dużych fragmentów DNA wynoszących kilkaset tysięcy par zasad w wektorach YAC (ang. *Yeast Artificial Chromosome*) uzyskanych przez modyfikację chromosomów drożdży [5].

LITERATURA

- [1] ARNDT-JOVIN DJ, JOVIN TM. Multivariate chromosome analysis and complete karyotyping using dual labeling and fluorescence digital imaging microscopy. *Cytometry* 1990; **11**: 80–93.
- [2] BARTHOLDI MF, PARSON JD, ALBRIGHT KA, CRAM LS. System for flow sorting chromosomes on the basis of pulse shape. *Cytometry* 1990; **11**: 165–172.
- [3] BLIN N. Molekular- und Cytogenetik sortierter Metaphasenchromosomen. [w] Blin N, Trendelenburg MF, Schmidt ER (red.) Molekular- und Zellbiologie. Berlin, Heidelberg, Berlin, Toronto, Springer-Verlag, 1985: 123–131.
- [4] BUTTING K, NEUMANN M, LUEDECKE HJ, SENGER G, CLAUSSEN U, ANTICH J, PASSARGE E, HORSTHEMKE B. Microdissection of the Prader-Willi Syndrome chromosome region and identification potential gene sequences. *Genomics* 1990; **6**: 521–527.
- [5] BURKE DT, CARLE GF, OLSON MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; **236**: 806–812.
- [6] COTTER F, NASIPURI S, LAM G, YOUNG B. Gene mapping by enzymatic amplification from flow-sorted chromosomes. *Genomics* 1989; **5**: 470–474.
- [7] DEAVEN LL, van DILLA MA, BARTHOLDI MF, CARRANO AV, CRAM LS, FUSCOE JC, GRAY JW, HILDEBRAND CE, MOYZIS RK, PERLMAN J. Construction of human chromosome-specific DNA libraries from flow sorted chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1987; **51**: 159–167.
- [8] DONLON TA, LALANDE M, WYMAN A, BRUNS G, LATT SA. Isolation of molecular probes associated with the chromosome 15 instability in the Prader-Willi syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 4408–4412.
- [9] FISHER EMC, CAVANNA JS, BROWN SDM. Microdissection and microcloning of the mouse X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 5846–5849.
- [10] FUSCOE JC, CLARK LM, van DILLA MA. Construction of fifteen human chromosome-specific DNA libraries from flow-purified chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1986; **43**: 79–86.
- [11] GRAY J, DEAN PN, FUSCOE JC, PETERS DC, TRASK BJ, van den ENGH GJ, van DILLA A. High-speed chromosome sorting. *Science* 1987; **238**: 323–329.
- [12] GRAY J, LUCAS J, PETERS D, PINKEL D, TRASK B, van den ENGH G, van DILLA M. Flow karyotyping and sorting of human chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1986; **51**: 141–149.
- [13] HARRIS P, LALANDE M, TROH H, BRUNS G, FLINT A, LATT SA. Construction of a chromosome 16-enriched phage library and characterization of several DNA segments from 16p. *Hum Genet* 1987; **77**: 95–103.
- [14] KOENIG M, HOFFMAN P, BERTELSON CJ, MONACO AP, FEENER C, KUNKEL LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**: 509–517.
- [15] KUNKEL M, LALANDE M, MONACO AP, FLINT A, LATT SA. Construction of a human X-chromosome-enriched phage library which facilitates analysis of specific loci. *Gene* 1985; **33**: 251–258.
- [16] LEBO RV, GORIN F, FLETTERICK RJ, KAO FT, CHEUNG MC, BRUCE BD, KAN YW. High resolution chromosome sorting and DNA spot-blot analysis assing McArdle's Syndrome to chromosome 11. *Science* 1984; **225**: 57–59.
- [17] LUEDECKE HJ, SENGER G, CLAUSSEN U, HORSTHEMKE B. Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 1989; **338**: 348–350.
- [18] ORKIN SH. Reverse genetics and human disease. *Cell* 1986; **47**: 845–850.

- [19] PERLMAN J, FUSCOE JC. Molecular characterization of the purity of seven human chromosome-specific DNA libraries. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 43: 87-96.
- [20] PETERS D, BRANSCOMB E, DEAN P, MERRILL T, PINKEL D, van DILLA M, GRAY W. The LLNL High-speed sorter: Design features, operational characteristics, and biological utility. *Cytometry* 1985; 6: 290-301.
- [21] PINKEL D, STRAUME T, GRAY JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2934-2938.
- [22] SAWIN VL, ROWLEY JD, CARRANO AV. Transcription and hybridization of 125 J-cRNA from flow sorted chromosomes. *Chromosoma* 1979; 70: 293-304.
- [23] SCALENGHE F, TURCO E, ENDSTROEM JE, PIROTTA V, MELLI M. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma* 1981; 82: 205-216.
- [24] SCAMBLER PJ, WAINWRIGHT BJ, WATSON E, BATES G, BELL G, WILLIAMSON R, FARRALL M. Isolation of the further anonymous informative DNA sequence from chromosome seven closely linked to cystic fibrosis. *Nucleic Acids Res* 1986; 5: 3-6.
- [25] SCHWARTZ DC, CANTOR CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
- [26] Van den ENGH G, TRASK B, GRAY J, LANGLOIS R, YU L. Preparation and bivariate analysis of suspensions of human chromosomes. *Cytometry* 1985; 6: 92-101.
- [27] Van DILLA MA, DEAVEN LL. Construction of gene libraries for each human chromosome. *Cytometry* 1990; 11: 208-218.
- [28] Van DILLA MA, DEAVEN LL, ALBRIGHT KL, ALLEN NA, AUBUCHON MR, BARTHOLDI MF, BROWN NC, CAMBELL EW, CARRANO AV, CLARK LM, CRAM LS, CRAWFORD BD, FUSCOE JC, GRAY JW, HILDEBRAND CE, JACKSON PJ, JETT JH, LONGMIRE JL, LOZES CR, LUEDEMANN ML, MARTIN JC, McNINCH JS, MEINCKE LJ, MENDELSON ML, MEYNE J, MOYZIS RK, MUNK AC, PERLMAN J, PETERS DC, SILVA AJ, TRASK BJ. Human chromosome-specific DNA libraries: Construction and availability. *Biotechnology* 1986; 4: 537-552.

Otrzymano: 27 czerwca 1990

Przyjęto: 1 sierpnia 1990

Adres Autorki: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

WPLYW CZYNNIKÓW GENETYCZNYCH NA REGENERACJĘ ROŚLIN W KULTURACH IN VITRO

THE INFLUENCE OF GENETIC FACTORS ON REGENERATION ABILITY IN PLANT CULTURES IN VITRO

Monika RAKOCZY-TROJANOWSKA i Stefan MALEPSZY

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin Ogrodniczych SGGW-AR

Streszczenie. Regeneracja w roślinnych kulturach in vitro jest procesem zależnym od działania określonych genów, które mogą wpływać na różne jej etapy. Niektóre z tych genów działają we wszystkich rodzajach kultur bez względu na źródło eksplantatu, inne z kolei tylko w eksplantatach o określonym pochodzeniu. Geny te są często oznaczane symbolem *Rg* (*regeneration*) i są dominujące, w większości o działaniu addytywnym lub/oraz wykazujące zjawisko komplementacji. Wydaje się, że istnieją również geny hamujące regenerację w kulturze in vitro. Dla nielicznych układów eksperymentalnych wykazano istnienie specyficznych białek związanych ze zdolnością do osiągnięcia określonego etapu morfogenezy w kulturze in vitro oraz innych markerów biochemicznych somatycznej embriogenezy. Proces regeneracji zależy również od składu pożywki i często wykazywano współdziałanie genotypu ze składnikami pożywki, głównie hormonami. Dokładne poznanie sposobu dziedziczenia i odziedziczalności zdolności do regeneracji stwarza możliwość regulacji tym procesem i wykorzystania m.in. do wydajnej produkcji sztucznych nasion.

Summary. The regeneration in plant in vitro cultures depends on the activity of particular genes which can influence some of their stages. Some of these genes are active in all types of cultures regardless the explant source. Others are active only in certain explants of particular origine. These genes often are symbolized by *Rg* (*regeneration*) and are dominant and mostly of additive or/and complementary activity. It seems that there are also genes which inhibit the regeneration. For few experimental systems the existence of specific proteins connected with ability to reach certain morphogenesis stage in in vitro culture has been shown. Moreover, the existence of biochemical markers of somatic embryogenesis has been found out. The process of regeneration also depends on medium contents and interaction between genotype and medium elements – mainly growth regulators – has often been found. The detailed recognition of heredity and inheritance of regeneration ability gives the possibility of regulating this process and its application among others, in production of artificial seeds.

WSTĘP

W warunkach kultury in vitro komórki i tkanki roślinne mają zdolność do dzielenia się i różnicowania oraz regeneracji roślin, co określa się mianem totipotencji. Ujawnienie się

totipotencji komórek jest możliwe tylko po spełnieniu określonych warunków, zwykle ujmowanych w dwie grupy:

1) warunki wewnętrzne, a przede wszystkim ciąg następstw związanych z oderwaniem komórki (lub zespołu komórek) od wpływu tkanki macierzystej,

2) oddziaływania zewnętrzne, wśród których do najbardziej istotnych należą: skład pożywki oraz warunki kultury (temperatura, światło itd.).

Zgodnie z definicją totipotencji regeneracja powinna być możliwa z każdej żywej komórki bez względu na jej przynależność tkankową. Sytuacja taka ma jednak miejsce tylko u niewielu gatunków, natomiast u większości gatunków regeneracja zachodzi tylko wtedy, gdy do kultury pobiera się ściśle określoną tkankę, organ lub część organu. O tym, czy zajdzie regeneracja roślin, decyduje również rodzaj kultury.

Nie zawsze pobranie takiego samego eksplantatu z różnych roślin w obrębie gatunku i umieszczenie go w warunkach, stymulujących różnicowanie i regenerację, daje ten sam efekt. Wskazuje to na zależność cechy zdolności do regeneracji w kulturze *in vitro* od genotypu.

Poznanie czynników genetycznych, wpływających na regenerację w kulturze *in vitro* lub decydujących o tym procesie, jest istotne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i ewentualnych możliwości zastosowań. W bieżącym dziesięcioleciu zostało nagromadzonych sporo różnorodnych informacji na temat roli czynników genetycznych w procesie regeneracji, a celem niniejszego artykułu jest ukazanie ich Czytelnikowi w uporządkowanej formie.

ZDOLNOŚĆ DO REGENERACJI ROŚLIN W RÓŻNYCH RODZAJACH KULTUR

WSKAŹNIKI CECHY ZDOLNOŚCI DO REGENERACJI

W badaniach poświęconych sposobom dziedziczenia lub odziedziczalności zdolności do regeneracji są brane pod uwagę różne wskaźniki, np. intensywność wzrostu kalusa, udział eksplantatów tworzących kalus embriogeniczny, udział kalusów regenerujących rośliny, udział eksplantatów dających rośliny, średnia liczba roślin z eksplantatu.

Nie zawsze jednak wzrost kalusa jest skorelowany z samą regeneracją. W takich przypadkach ocena wzrostu tkanki kalusowej nie może być podstawą oceny całego procesu regeneracji, a świadczy tylko o zdolności osiągnięcia niektórych jego etapów. Na sposób oceny wydajności regeneracji ma również wpływ rodzaj prowadzonej kultury. W tabeli 1 zestawiono najczęściej stosowane sposoby takiej oceny.

KULTURY TKANEK SOMATYCZNYCH

Zależność zdolności do regeneracji od genotypu stwierdzono u wielu gatunków roślin, zarówno jednoliściennych, np. kukurydzy [7, 49], pszenicy [15, 37], jęczmienia [17], jak i dwuliściennych, np. lucerny [6], pomidora [18], ogórka [27], kapusty [5].

Istotną sprawą, przede wszystkim dla genetyków i hodowców, jest znajomość sposobu dziedziczenia zdolności do regeneracji roślin. Dotychczas jednak ukazało się stosunkowo

TABELA 1. Sposoby oceny zdolności do regeneracji roślin

Rodzaj kultury	Sposoby oceny	Autorzy (wg numeracji w spisie literatury)
Tkanki i organów	1) przyrost świeżej masy kalusa	19, 24, 48
	2) udział eksplantatów tworzących kalus	39, 49
	3) udział kalusów regenerujących rośliny	17, 49
	4) udział eksplantatów dających rośliny	19, 39, 46
	5) liczba roślin (pędów) na jeden eksplantat	47
	6) liczba zregenerowanych roślin z jednej rośliny macierzystej	28
Pylników	1) udział pylników tworzących kalus	23
	2) udział kalusów regenerujących rośliny	14, 19, 46
	3) liczba embrioidów (roślin) na liczbę wyłożonych pylników	9, 14
	4) udział roślin albinotycznych	14, 46
Protoplastów	1) efektywność posiewu PE	47
	2) udział minikalusów regenerujących pędy	18, 40, 47

niewiele prac, w których przedstawiono wyniki pełnej analizy genetycznej. Można wśród nich wyróżnić dwie grupy poglądów, a mianowicie:

1. Cecha jest dziedziczona jednym, dwoma lub trzema genami współdziałającymi w różny sposób, ma charakter jakościowy i jest w wysokim stopniu odziedziczalna.

2. Cecha jest dziedziczona poligenicznie i ulega silnym wpływom środowiska.

Do pierwszej grupy należy m.in. praca Reisha i Bingham [36] nad zdolnością do regeneracji roślin u lucerny. Autorzy wyizolowali cztery grupy genotypów: *A*, *B*, *C* i *D*, które różniły się intensywnością regeneracji w zakresie 0–100% regenerujących eksplantatów. Różnice te wytłumaczono współdziałaniem alleli dominujących z dwóch loci *A* i *B* oraz ich różnym efektem jednostkowym ($B > A$). Zaproponowano następujący zapis poszczególnych genotypów: *A* : *A - B* - (75–100% regenerujących eksplantatów), *B* : *aa B* - (15–75%); *A - bb* - (0–15%) i *D* : *aabb* (0%).

W sposób poligeniczny była dziedziczona m.in. inicjacja kalusa z niedojrzałych zarodków kukurydzy [49]. Dziedziczenie zdolności do regeneracji może mieć jednak bardziej złożony charakter. Przykładem jest sposób dziedziczenia zdolności do regeneracji roślin z eksplantatów liściowych w drodze pośredniej (przez kalus) embriogenezy somatycznej u ogórka [28]. O zdolności ogórka do regeneracji decydowały 3 geny, oznaczone R_1 , R_2 , R_3 . Geny te współdziałały ze sobą w sposób komplementarny oraz dodatkowo występował efekt addytywny. Dla badanych linii użytych do analizy autorzy zaproponowali odpowiednie następujące genotypy: linii *S* – $r_1r_1r_2r_2r_3r_3$, *B* – $R_1R_1R_2R_2r_3r_3$ i *G* – $R_1R_1r_2r_2R_3R_3$. U linii *B*, najlepiej regenerującej rośliny, wystąpiła komplementacja dominujących alleli R_1 i R_2 i sumowanie się ich efektów jednostkowych. U linii *G* komplementowały i sumowały swoje efekty allele R_1 i R_3 , przy czym ich współdziałanie warunkowało niższą efektywność regeneracji niż alleli R_1 i R_2 . Linia *S* nie regenerowała lub regenerowała rośliny sporadycznie, co było spowodowane brakiem alleli dominujących wspomnianych loci.

O roli genów w zdolności do regeneracji można wnioskować nie tylko na podstawie klasycznej analizy genetycznej, ale również stosując analizę wpływu określonych chromosomów (lub ich fragmentów). Najliczniejsze prace tego typu dotyczą pszenicy, ponieważ ze względu na jej strukturę genomową możliwe jest tworzenie linii substytucyjnych, addytywnych, translokacyjnych, auto- i alloplazmatycznych. Mathias i Fukui [23] użyli dwóch

linii euplazmatycznych: Chinese Spring i Chinese Spring z podstawionym chromosomem 4B z odmiany Capelle-Desprez oraz dwóch linii alloplazmatycznych z cytoplazmą *Aegilops ovata* dla określenia wpływu substytucji 4B i obcej cytoplazmy na zdolność do tworzenia zawiązków pędów i regeneracji roślin z kalusa otrzymanego z niedojrzałych zarodków. Autorzy stwierdzili pozytywny efekt chromosomu 4B z Capelle-Desprez i niewielki wpływ cytoplazmy *A. ovata* na badane cechy. Następną jednak pracą Mathiasa i wsp. [24] z siedmioma liniami alloplazmatycznymi – z jądrem Chinese Spring w cytoplazmie innych gatunków *Aegilops* i *Triticum* oraz jedną linią euplazmatyczną Chinese Spring wskazywała na istotny udział czynników cytoplazmatycznych w warunkowaniu wzrostu kalusa i regeneracji roślin. Autorzy sądzą, że czynniki cytoplazmatyczne oddziaływały raczej na stan eksplantatu (zarodka), a nie na sam przebieg kultury *in vitro*. O udziale czynników cytoplazmatycznych w ekspresji zdolności do regeneracji u pszenicy dobitnie świadczą wyniki pracy Rode i wsp. [37], którzy wykazali różnice między mitochondrialnym DNA w embriogenicznym i nieembriogenicznym kalusie odmian Chinese Spring, Talent, Thesee i Capitole otrzymanym z niedojrzałych zarodków. Wpływ niektórych chromosomów pszenicy na zdolność do regeneracji roślin z kalusa otrzymanego z niedojrzałych zarodków stwierdzili również Galiba i wsp. [11]. Chromosomy 7B, 1D i 7D z odmiany Cheyenne, która nie miała zdolności do regeneracji, wprowadzone w miejsce tych samych u odmiany Chinese Spring, charakteryzującej się dobrą regeneracją roślin, powodowały istotne zmniejszenie liczby zregenerowanych pędów w porównaniu z odmianą Chinese Spring. Autorzy uważają, że w chromosomach tych były zlokalizowane geny warunkujące zdolność do regeneracji i były to poligeny. Lazar i wsp. [19] próbowali określić rolę chromosomów żyta dodanych do genomu pszenicy Chinese Spring w regeneracji roślin z niedojrzałych zarodków (również z pylników – omówienie w rozdz. pt. Regeneracja bezpośrednia lub pośrednia a zdolność roślin do regeneracji). Najintensywniejsze powstawanie pędów stwierdzili u linii addytywnych z chromosomami 6R i 7R. Autorzy uważają, że w chromosomach 6 i 7 żyta mogą znajdować się geny, które albo pozytywnie wpływają na regenerację roślin, albo znoszą negatywny efekt genów zlokalizowanych w genomie pszenicy.

KULTURY PYLNIKÓW I MIKROSPOR

Wyniki licznych prac wskazują, że również zdolność do regeneracji roślin w kulturach pylników i mikrospor jest cechą, której wartość zależy od genotypu. Stwierdzono to m.in. u jęczmienia [33], pszenicy [19], ryżu [35, 50], ziemniaka [16, 43], brukselki [30], brokułów [31].

Prace dotyczące wpływu określonych chromosomów na zdolność do tworzenia kalusa i regenerację roślin z pylników prowadzono głównie u pszenicy i żyta. Czynniki pozytywnie wpływające na regenerację znajdują się prawdopodobnie w ramieniu *S* chromosomu 1R żyta. Jeżeli bowiem ramię to było translokowane w miejsce ramienia *L* chromosomu 1B pszenicy odmiany Aurora, to udział roślin zielonych w całkowitej liczbie roślin zregenerowanych w kulturze pylników był większy w porównaniu z odmianami bez takiej translokacji, o czym świadczą wyniki pracy Henry'ego i De Buysera [14]. Pozytywny wpływ niektórych chromosomów żyta włączonych do genomu pszenicy Chinese Spring na tworzenie kalusa i regenerację roślin z kalusa potwierdzili Lazar i wsp. [19]. Chromosom 4R zawierał czynniki zwiększające intensywność tworzenia kalusa oraz regenerację roślin, a w chromosomach 6 i 7 znajdowały się geny, które korzystnie wpływały zarówno na regenerację roślin

z pylników, jak i niedojrzałych zarodków. Interpretacja wyników podana przez autorów (podobnie jak w przypadku regeneracji z zarodków, s. 250) była następująca: w chromosomach tych znajdują się pojedyncze geny główne, które albo pozytywnie wpływają na wspomniane cechy, albo znoszą negatywny efekt innych chromosomów. Szczegółową analizę wpływu substytucji chromosomów u odmiany Chinese Spring chromosomami z odmiany Cheyenne na tworzenie kalusa i regenerację zielonych roślin zamieścili w swojej pracy Sza¹.acs i wsp. [48]. Chromosomy: 7A i 1B z odmiany Cheyenne w genomie Chinese Spring powodowały zahamowanie tworzenia się kalusa, 1D, 2A, 2B, 5B i 6A znacznie, a 2D, 3A, 3D, 4D i 7D w mniejszym stopniu obniżały zdolność do tworzenia kalusa; 3A i 5B pozytywnie, a 3B i 4D negatywnie wpływały na regenerację roślin; 2D i 1D zwiększały udział roślin zielonych. Autorzy sądzą, że w większości przypadków substytucja miała negatywny wpływ, z wyjątkiem chromosomów 3A i 2D, co mogło być związane ze specyficzną interakcją tych chromosomów z genomem Chinese Spring. Interpretacja wyników podanych przez autorów budzi wątpliwości w odniesieniu do wpływu wymienionych substytucji na tworzenie kalusa, ponieważ obie wyjściowe odmiany nie różniły się od siebie pod tym względem. Bardziej natomiast przekonujące wydaje się wnioskowanie autorów na temat wpływu wymienionych chromosomów na regenerację roślin – obie odmiany pszenicy znacznie różniły się od siebie zdolnością do regeneracji.

KULTURY KOMÓREK I PROTOPLASTÓW

Zróznicowanie efektów kultury w zależności od genotypu stwierdzono również w kulturach komórek i protoplastów, chociaż tylko w nielicznych pracach można znaleźć dane o wpływie określonych genów. Stwierdzono, że u niektórych gatunków należących do rodzaju *Lycopersicon* o zdolności do regeneracji w kulturze protoplastów decydowały geny dominujące [1, 40, 47]. Pełną analizę zdolności do regeneracji z protoplastów pomidora przeprowadzili Koorneef i wsp. [19], którzy wykonali krzyżowanie międzygatunkowe *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* i wykazali, że:

- cecha zdolności do regeneracji była dominująca,
- była ona kontrolowana dwoma genami *Rg1* i *Rg2*.

Następujące składowe tej cechy: wzrost kalusa z eksplantatów pierwotnych, wzrost kalusa w kulturze ustabilizowanej i regeneracja pędów były w wysokim stopniu odziedziczalne i ich wartości wynosiły odpowiednio: 0,47; 0,78 i 0,87.

REGENERACJA BEZPOŚREDNIA LUB POŚREDNIA A ZDOLNOŚĆ ROŚLIN DO REGENERACJI

Regeneracja w kulturze *in vitro* może odbywać się przez fazę kalusa lub bezpośrednio z komórek eksplantatu, pojedynczych komórek lub protoplastów. Regeneracja bezpośrednia zachodzi znacznie rzadziej i jest ona na ogół mniej wydajna od regeneracji przez kalus. Miura i Tabata [25] stwierdzili, że wśród protoplastów *Foeniculum vulgare* umieszczonych w pożywce bez hormonów ok. 1% nie dzieliło się, a tylko początkowo powiększało swoje rozmiary. Można było wśród nich rozróżnić dwa rodzaje komórek: kuliste niezdolne do podziałów i elipsoidalne z jądrem migrującym do jednego z biegunów, występujące w

stosunku 3 : 1. Te ostatnie rozwijały się bezpośrednio w embrioidy i po 50 dniach od posiewu były w stadium sercowatym. Przeniesione na pożywkę stałą, bez hormonów rozwijały się w normalnie wykształcone rośliny, podobnie jak embrioidy uzyskane z tkanki kalusowej. Autorzy wiążą fakt zajścia regeneracji bezpośredniej z brakiem w pożywce regulatorów wzrostu i uważają to za tendencję naturalną, ale występującą z niską częstotliwością. Embriogenezę bezpośrednią stwierdzono u *Brassica campestris* [20] i u kilku gatunków *Trifolium* [21]. W obu tych pracach eksplantatami były niedojrzałe zarodki generatywne. Autorzy sądzą, że zdolność do bezpośredniej embriogenezy była związana ze stanem wewnętrznym komórek, polegającym na utracie kontroli normalnej interakcji pomiędzy komórkami zarodka oraz na stymulacji zewnętrznej (regulatory wzrostu i ekstrakt drożdżowy w pożywce) do podziałów mitotycznych.

Należałoby postawić pytanie, czy regeneracja bezpośrednia jest determinowana tymi samymi genami co regeneracja pośrednia. Wyniki naszych badań prowadzonych nad otrzymywaniem mieszańców oddalonych pomiędzy dynią zwyczajną a olbrzymią [34] wskazują, że przynajmniej zdolność do zainicjowania regeneracji bezpośredniej w rodzaju *Cucurbita* może być nową cechą właściwą tylko mieszańcom. W rodzaju *Cucurbita* regeneracja odbywa się w drodze embriogenezy pośredniej lub organogenezy pośredniej. Tymczasem u mieszańców pomiędzy dynią zwyczajną a olbrzymią uzyskano regenerację bezpośrednią z części liścieni niektórych niedojrzałych zarodków. Przypuszczalną przyczyną takiej reakcji był brak funkcjonalnych stożków wzrostu, powodujący zmieniony (niezgodny z narzuconym przez pole morfogenetyczne) sposób oddziaływania między komórkami zarodka oraz ich mieszańcowość. Przykład ten wskazuje na możliwość zależności regulacji sposobu regeneracji od specyficznych bodźców wewnętrznych.

PODŁOŻE BIOCHEMICZNE ZDOLNOŚCI DO REGENERACJI ROŚLIN

W trakcie procesu regeneracji roślin w warunkach kultury *in vitro* zachodzi szereg zmian biochemicznych. Niektóre z nich są wynikiem pojawienia się specyficznych białek, na co wskazywały prace wykonane u marchwi na początku lat osiemdziesiątych [44, 45]. W pierwszych etapach kultury następowało u tego gatunku namnażanie kalusa embriogenicznego (E) i nieembriogenicznego (NE). W kalusie embriogenicznym wykryto dwa specyficzne białka ESP (*embryo-specific-proteins*) [44], a w niezróżnicowanym inne, również specyficzne białka, które nazwano CSP (*callus-specific-proteins*) [45]. Synteza zarówno ESP, jak i CSP była regulowana w sposób skoordynowany. Podczas embriogenezy somatycznej u tego gatunku zmieniał się również metabolizm DNA oraz następowały: specyficzna glikolizacja białek, wzrost aktywności protein, ekspresja genów tubulinowych oraz uaktywnianie poliamin [29]. Smith i wsp. [42] zidentyfikowali zarówno w merystemach, jak i szybko dzielących się komórkach marchwi to samo białko o masie cząsteczkowej $M_r = 45000$ i punkcie izoelektrycznym $pI = 6,7$. Autorzy uważają, że białko to występuje w szybko dzielących się komórkach zarówno zarodków somatycznych, jak i zygotycznych wielu gatunków roślin. Schnall i wsp. [38] stwierdzili, że różne warianty *ts* (*temperature-sensitive*) marchwi miały zablokowaną embriogenezę w różnych fazach, co wskazywało na powiązanie pomiędzy genetyczną regulacją embriogenezy i wrażliwości na wysoką tempe-

aturę. U kukurydzy kalus embriogeniczny różnił się od nieembriogenicznego aktywnością i zawartością izoenzymów esteraz i dehydrogenazy glutaminianowej. Markerem embriogeniczności kalusa u tego gatunku mogą być także mukopolisacharydy, ponieważ po ich hydrolizie stosunek galaktozy : arabinozy : mannozy : ksylozy : fruktozy był charakterystyczny tylko dla kalusa embriogenicznego [10].

NA CZYM POLEGA GENETYCZNE UWARUNKOWANIE ZDOLNOŚCI DO REGENERACJI?

Z naszych dotychczasowych rozważań wynika, że za zdolność do regeneracji u roślin są odpowiedzialne określone geny. Należałoby postawić pytanie, w regulacji jakich procesów biorą one udział. Różnice genotypowe mogą dotyczyć sposobu odpowiedzi na warunki kultury, wśród których najważniejszym jest skład pożywki, a szczególnie zawartość regulatorów wzrostu. Mok i wsp. [26] wykazali, że zdolność do regeneracji roślin u *Phaseolus* mogła być m.in. związana z poziomem endogennych cytokinin. Autorzy znaleźli w dwóch badanych gatunków: *P. vulgaris* i *P. lanatus* formy cytokinino-niezależne, które tworzyły kalus z hypokotyli na pożywce bez cytokininy. Analiza genetyczna prowadzona w pokoleniach F₁, F₂ i BC₁ wskazywała na dziedziczenie jednogenowe i niecałkowitą dominację tej cechy. W przypadku fasoli gen zdolności do regeneracji mógłby być odpowiedzialny za syntezę endogennej cytokininy, a genotypy zdolne do regeneracji zawierałyby wysoki poziom tego hormonu umożliwiający podziały komórek i tworzenie kalusa w kulturze in vitro. Również u innych gatunków, m.in. w obrębie rodzajów: *Lycopersicon* [40], *Trifolium* [21], jęczmienia [13], ryżu [35], kukurydzy [7], pszenicy [23, 24], stwierdzono, że różnice genotypowe są związane z odmienną reakcją na zawartość hormonów w pożywce. W zależności od rodzaju i stężenia egzogennych (lub poziomu endogennych) regulatorów wzrostu, regeneracja w kulturze in vitro może mieć różny przebieg, tzn. odbywać się w drodze embriogenezy lub organogenezy, co m.in. stwierdzono u soi [4] i pszenicy [2].

Potwierdzeniem sugestii, że geny warunkujące regenerację mogą odpowiadać za regulację procesu syntezy endogennych lub wykorzystania egzogennych regulatorów wzrostu może być obecność w chromosomach z grupy czwartej, pozytywnie wpływających na regenerację roślin w kulturach tkankowych pszenicy, genów *D₃* i *Rht* kontrolujących metabolizm hormonów w komórce [24]. Duży wpływ na zdolność do regeneracji może mieć forma niektórych soli wchodzących w skład pożywki, co u ryżu wykonalili Redy i wsp. [35]. Część badanych przez nich genotypów była wrażliwa na jony NH₄⁺ w pożywce. Pozostałe genotypy wykazywały dużą adaptatywność do warunków kultury i tolerancję na różne formy soli. U ryżu azot w postaci NH₄⁺ stymulował regenerację roślin z protoplastów, natomiast jony NO₃⁻ powodowały powstawanie kalusa kruchego, nie regenerującego roślin [50]. Na regenerację roślin z niedojrzałych zarodków pszenicy miał również wpływ rodzaj użytej soli [12] oraz zawartość witamin w pożywce [4], a u kapusty morfogeneza zależała od rodzaju aminokwasu dodanego do pożywki. Podane przykłady sugerują, że ekspresja genów zdolności do regeneracji może być zmieniona przez działanie zupełnie innych genów, np. warunkujących pobieranie hormonów i innych składników pożywki lub różnicami we wrażliwości na te składniki.

ZNACZENIE ZNAJOMOŚCI CZYNNIKÓW WPŁYWAJĄCYCH NA ZDOLNOŚĆ DO REGENERACJI

W rozdziale tym zwrócimy uwagę na czynniki natury epigenetycznej wpływające na zdolność do regeneracji.

W wielu przypadkach czynnikiem decydującym o regeneracji jest rodzaj pobranego eksplantatu. U genotypów dobrze regenerujących rośliny, poszczególne organy czy nawet ich sektory mogą różnić się potencjałem morfogenetycznym, stąd różna "odpowiedź" eksplantatów i różna ekspresja cechy zdolności do regeneracji może zależeć od miejsca ich pobrania. U pszenicy [37] kalus embriogeniczny uzyskano głównie z niedojrzałych zarodków, natomiast zarodki dojrzałe, korzenie, liście i pędy uznano za nieodpowiednie źródło eksplantatów. Wydaje się, że lepsza regeneracja z tkanek merystematycznych szybko dzielących się i niezorganizowanych jest regułą. W niektórych rodzajach kultur, szczególnie pylników i mikrospor, ważnym czynnikiem wpływającym na ujawnienie się zdolności do regeneracji roślin jest wstępne traktowanie eksplantatów. Stwierdzono to w przypadku jęczmienia [33] i ryżu [35], u których wstępne traktowanie pylników chłodem było konieczne do zainicjowania kalusa.

Z innych czynników, które biorą udział w uwarunkowaniu cechy zdolności do regeneracji roślin, najczęściej wymienia się: stopień heterozygotyczności materiału wyjściowego [30], stadium rozwojowe mikrospor [31] oraz stopień zestalenia pożywki, wiek rośliny dawcy, stan fizjologiczny organu-dawcy, wiek kultury, światło, temperatura, wilgotność [41].

TWORZENIE GENOTYPÓW ZDOLNYCH DO REGENERACJI

U niektórych gatunków istnieje możliwość i celowość wprowadzenia cechy zdolności do regeneracji z odmian lub linii dobrze regenerujących rośliny do materiałów regenerujących słabo albo w ogóle nie mających tej zdolności. Przy tworzeniu form zdolnych do regeneracji ważna jest znajomość odziedziczalności cechy. Templeton-Sommers i Collins [48] oceniali u *Ipomea batata* odziedziczalność dwóch cech: zdolność do tworzenia kalusa i regeneracji roślin. Odziedziczalność zdolności do wzrostu kalusa była różna dla kolejnych subkultur: dla drugiej subkultury wynosiła 0,35, a dla trzeciej – 0,63. Autorzy sugerują, że przy takich wartościach odziedziczalności zdolności do tworzenia kalusa możliwe byłoby w drodze krzyżowań i selekcji wyhodowanie form lepiej regenerujących rośliny. Wysoka odziedziczalność cech związanych z kulturą *in vitro* została wykorzystana przy otrzymaniu form dobrze regenerujących u kukurydzy [49] i pomidora [18].

Znajomość zmian biochemicznych podczas regeneracji [29, 44, 45] mogłaby być wykorzystana nie tylko przy identyfikacji określonych stadiów tego procesu, ale także pomocna przy określaniu zdolności do regeneracji i selekcji pożądaných genotypów.

U pszenicy istnieje możliwość tworzenia genotypów o poprawionej zdolności do regeneracji roślin przez wprowadzenie chromosomów zawierających geny kontrolujące tę cechę [19, 46] lub tworząc linie alloplazmatyczne z cytoplazmą niektórych gatunków dzikich należących do *Triticum* lub *Aegilops* [24].

Dokładne poznanie sposobu dziedziczenia zdolności do regeneracji stwarza możliwość sterowania tym procesem. Ovens i Cohen [32] sugerują np., że dzięki rozwijanym w ostatnich latach technikom biotechnologicznym będzie można wprowadzić geny kontrolujące zdolność do regeneracji do takich odmian lub linii, które tej zdolności nie mają. Innym sposobem wykorzystania takiej wiedzy mogłaby być produkcja "sztucznych" nasion na skalę przemysłową, co oznaczałoby przełom w nasiennictwie. Intensywne próby w tym kierunku są już obecnie prowadzone u marchwi, selera, lucerny, kalafiora i ogórka [22].

LITERATURA

- [1] ADAMS TL, QUIROS CF. Somatic hybridization between *Lycopersicon peruvianum* and *L. pennellii*: regenerating ability and antibiotic resistance as selection systems. *Plant Sci* 1985; **40**: 209–219.
- [2] ARMSTRONG T, METZ SG, MASCIA PN. Two regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci* 1987; **51**: 231–237.
- [3] ARMSTRONG CL, PHILLIPS RL. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. *Crop Sci* 1988; **28**: 363–369.
- [4] BARWALE VB, KERNS HR, WIDHOLM JM. Plant regeneration from callus cultures of several soyabean genotypes via embryogenesis and organogenesis. *Planta* 1986; **167**: 473–481.
- [5] BASU A, URMIL S, GUHA-MUKCHERJEE S. Regulation of cell proliferation and morphogenesis by amino acids in *Brassica* tissue cultures and its correlation with threonine deaminase. *Plant Cell Rep* 1989; **8**: 333–336.
- [6] BROWN DCW, ATANASSOV A. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1985; **4**: 111–112.
- [7] CLOSE KR, LUDEMAN LA. The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize. *Plant Sci* 1987; **52**: 81–89.
- [8] DATTA SK, POTRYKUS J. Artificial seeds in barley: encapsulation of microspor derived embryos. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 820–824.
- [9] DUNWELL JM, CORNISH M, CONVEEL GL. Influence of genotype, plant growth, temperature and anther incubation on microspore, embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *J Exp Bot* 1985; **36** (165): 679–689.
- [10] EVERETT NP, WACH MJ, ASHWORTH DJ. Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B 73. *Plant Sci* 1985; **41**: 133–140.
- [11] GALIBA G, KOVÁCS G, SUTKA J. Substitution analysis of plant regeneration from callus culture in wheat. *Plant Breeding* 1986; **97**: 261–263.
- [12] GALIBA G, YAMADA Y. A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissue culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Rep* 1988; **7**: 55–58.
- [13] HANZEL JJ, MILLER JP, BRINKMAN MA, FENDOS E. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley. *Crop Sci* 1985; **25**: 27–31.
- [14] HENRY Y, BUYSER de J. Effect of the 1B/1R translocation on anther culture ability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 1985; **4**: 307–310.
- [15] HEYSER IW, NABORS MW, MACKINNON C, DYKES TA, DEWOTT KJ, KAUTZMANN DC, MUJEED-KAZI A. Long-term, high-frequency plant regeneration of somatic embryogenesis in callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Z Pflanzenzüchtg* 1985; **94**: 218–223.
- [16] JACOBSEN E, SOPORY SK. The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther cultures of *Solanum tuberosum* and dihaploid hybrids. *Theor Appl Genet* 1987; **52**: 119–123.
- [17] KOMATSUDA T, ENOMOTO S, NAKAJIMA K. Genetics of callus proliferation and shoot differentiation in barley. *J Hered* 1989; **80**: 345–350.
- [18] KOORNEEF N, HANHART CJ, MARTINELLI L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor Appl Genet* 1987; **74**: 641–663.
- [19] LAZAR MD, CHEN THH, SCOLES GJ, KARTHA KK. Immature embryo and anther culture of chromosome addition lines of rye in Chinese Spring wheat. *Plant Sci* 1987; **51**: 71–81.

- [20] MAHESWARAN G, WILLIAMS EG. Primary and secondary direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Brassica campestris*. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 455–463.
- [21] MAHESWARAN G, WILLIAMS EG. Clonal propagation of *Trifolium pratense*, *T. resupinatum* and *T. subterraneum* by direct somatic embryogenesis on cultured immature embryos. *Plant Cell Rep* 1986; **3**: 165–168.
- [22] MALEPSZY S. Sztuczne nasiona – przełom w nasiennictwie. *Postępy Nauk Rolniczych* 1988; **4**: 3–15.
- [23] MATHIAS RJ, FUKUI K. The effect of specific chromosome and cytoplasm substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor Appl Genet* 1986; **71**: 787–800.
- [24] MATHIAS RJ, FUKUI K, LAW CN. Cytoplasmatic effects on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor Appl Genet* 1986; **72**: 70–75.
- [25] MIURA Y, TABATA M. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Foeniculum vulgare*. *Plant Cell Rep* 1986; **5**: 310–313.
- [26] MOK MC. Cytokinin autonomy in tissue cultures of *Phaseolus*. A genotype – specific and heritable trait. *Genetics* 1980; **94**: 675–686.
- [27] NADOLSKA-ORCZYK A, MALEPSZY S. In vitro culture of *Cucumis sativus* L. VI. Histological analysis of leaf explants cultured on media with 2,4-D or 2,4,5-T. *Acta Soc Bot Pol*, 1987; **56** (1): 55–60.
- [28] NADOLSKA-ORCZYK A, MALEPSZY S. In vitro culture of *Cucumis sativus* L. VII. Genes controlling plant regeneration. *Theor Appl Genet* 1989; **78**: 836–840.
- [29] NOMURA K, KOMAMINE A. Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. *Oxford Surveys of Plant Mol and Cell Biology* 1986; **3**: 456–466.
- [30] OCKENDON DJ, SUTHERLAND RA. Genetic and nongenetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemifera*). *Theor Appl Genet* 1987; **74**: 566–570.
- [31] ORTON TJ, BROWERS MA. Segregation of genetic markers among plants regenerated from cultured anthers of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Theor Appl Genet* 1985; **67**: 637–643.
- [32] OVENS LD, COHEN JD. Gene introduction to induce morphogenesis. *Hort Sci* 1988; **23** (3): 520–525.
- [33] POWELL W. The influence of genotype and temperature pretreatment on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1988; **12**: 291–297.
- [34] RAKOCZY-TROJANOWSKA M, MALEPSZY S. A method for increased plant regeneration from immature F₁ and BC₁ embryos of *Cucurbita maxima* Duch. x *C. pepo* L. hybrids. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1989; **18**: 191–194.
- [35] REDY VS, LEELAWATHI S, SEN SK. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. *Physiol Plant* 1985; **64**: 309–314.
- [36] REISH B, BINGHAM ET. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Sci Lett* 1980; **20**: 71–77.
- [37] RODE A, HARTMAN C, BUYSER de J, HENRY Y. Evidence for a direct relationship between mitochondrial genome organization and regeneration ability in hexaploid wheat somatic tissue cultures. *Curr Genet* 1988; **14**: 387–394.
- [38] SCHNALL JA, COOK TJ, CRESS DE. Genetic analysis of somatic embryogenesis in Carrot cell culture: Initial characterization of six classes of temperature-sensitive variants. *Developmental Genetics* 1988; **9**: 49–67.
- [39] SEITZ MH, STALKER HT, GREEN CC. Genetic variation for regenerative response in immature leaflet cultures of the cultivated Peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Breeding* 1987; **98**: 104–110.
- [40] SHAHIN EA. Totipotency of tomato protoplasts. *Theor Appl Genet* 1985; **69**: 235–240.
- [41] SKUCIŃSKA B. Genetyczne zróżnicowanie skłonności do tworzenia tkanki kalusowej na przykładzie kilku gatunków z rodzaju *Nicotiana*. *Biul IHAR* 1972; **16** (6): 477–495.
- [42] SMITH JA, KRAUSS MR, BORKIRD C, SUNG ZR. A nuclear protein associated with cell division in plants. *Planta* 1988; **174**: 462–472.
- [43] SONNINO A, TANAKA S, IWANAGA M, SCHILDE-RENTSCHLER L. Genetic control of embryo formation in anther culture of diploid potatoes. *Plant Cell Rep* 1989; **8**: 105–107.
- [44] SUNG ZR, OKIMOTO R. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 3683–3687.
- [45] SUNG ZR, OKIMOTO R. Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2661–2665.
- [46] SZAKÁCS E, KOVÁCS G, PANK J, BARNABÁS B. Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 1988; **7**: 127–129.

- [47] TAN MMC, COLLIN-HOOYMANS CM, LINDHOUT WH, KOOL AJ. A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor Appl Genet* 1987; 75: 105–198.
- [48] TEMPLETON-SOMMERS KM, COLLINS WW. Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomea batatas* L.). *Theor Appl Genet* 1986; 71: 836–841.
- [49] TOMES DT, SMITH OS. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor Appl Genet* 1985;70: 505–509.
- [50] TORIYAMA K, HINATA K, SASAKI T. Haploid and diploid plant regeneration from protoplasts of anther callus in rice. *Theor Appl Genet* 1986; 73: 16–19.

Otrzymano: 20 kwietnia 1990

Przyjęto: 2 sierpnia 1990

Adres Autorów: ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa

STRUKTURA I FUNKCJA RECEPTORA DLA INTERLEUKINY-2

THE STRUCTURE AND FUNCTION OF THE INTERLEUKIN-2 RECEPTOR

Jolanta NOWICKA-WIELGOSZ

Zakład Genetyki Człowieka PAN

Streszczenie. Receptor dla interleukiny-2 zbudowany jest z co najmniej dwóch łańcuchów polipeptydowych: p55 i p75, i może występować w komórce w trzech formach jako receptor o niskim (p55), średnim (p75) i wysokim (p55 + p75) powinowactwie. Każdy łańcuch receptora dla IL-2 ma osobne miejsce wiązania dla IL-2 i różne własności kinetyczne. Chociaż rola poszczególnych łańcuchów receptora dla IL-2 nie została w pełni poznana, wydaje się, że zarówno internalizacja IL-2, jak i transdukcja sygnału po związaniu IL-2 zachodzi głównie poprzez heterodimer p55 + p75.

Summary. Interleukin-2 receptor consists of at least two polypeptide chains: p55 and p75 and it occurs in the cell in three forms as a receptor of low (p55), medium (p75) and high (p55 + p75) affinity. Although a role of each polypeptide chains of IL-2 receptor has not been recognized well, it seems that internalization of IL-2 and transduction of a signal occurs mainly through heterodimere p55 + p75.

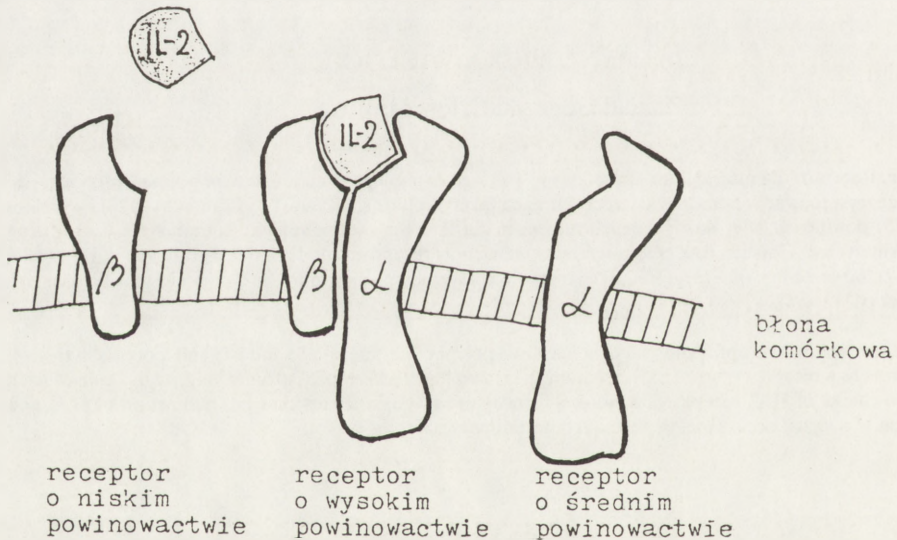
WSTĘP

W czasie odpowiedzi immunologicznej dochodzi do proliferacji limfocytów T i syntezy przeciwciał. Istotną rolę we współdziałaniu między komórkami odpowiadającymi na antygen spełniają limfokiny. Są one niezbędne do klonalnej ekspansji limfocytów i różnicowania w kierunku pełnienia wyspecjalizowanych funkcji. Kluczową rolę przypisuje się dobrze już scharakteryzowanej limfokinie początkowo określanej jako TCGF (*T cell growth factor* – czynnik wzrostu limfocytów T), a obecnie nazwanej interleukiną-2 (IL-2) [24, 34, 45]. Spoczynkowe limfocyty T nie produkują i nie odpowiadają na IL-2. Po stymulacji limfocytów antygenem lub nieswoistym mitogenem dochodzi do transkrypcji genów dla IL-2 i receptora dla IL-2, następnie do produkcji IL-2 oraz ekspresji receptora dla IL-2 na powierzchni komórek. Limfocyty T odpowiadają proliferacją na stymulację przez IL-2 w

sposób autokrynowy (limfocyty wspomagające) lub parakrynowy (limfocyty cytotoksyczne) [34]. Interleukina-2 jest niezbędnym sygnałem do przejścia aktywowanych limfocytów T z fazy G_1 do fazy S cyklu komórkowego [3]. Biologiczny efekt IL-2 przejawia się po związaniu IL-2 przez swoisty receptor. Limfocyty T proliferują, dopóki poziom receptorów dla IL-2 nie obniży się i wtedy wszystkie komórki powracają do stanu wyjściowego nieproliferującego [2]. Nadal nie wiadomo, w jaki sposób zachodzi emisja sygnału związania IL-2 przez receptor do jądra komórkowego i pobudzenie komórki do podziału.

WIELOŁAŃCUCHOWA STRUKTURA RECEPTORA DLA IL-2

Obecnie wiadomo, że receptor dla IL-2 złożony jest co najmniej z dwóch różnych łańcuchów polipeptydowych o masie cząsteczkowej 70–75 kDa i 55 kDa, które w tekście będą w skrócie określane jako p75 i p55 [44, 46, 51]. Oba łańcuchy polipeptydowe łączą się ze sobą niekowalencyjnie tworząc dimer p75 + p55, ale również występują w błonie oddzielnie (rys. 1). Każdy łańcuch wiąże oddzielnie IL-2, lecz z różnym powinowactwem.



Rys. 1. Trzy formy receptora dla IL-2 występujące w błonie komórkowej o różnym powinowactwie do IL-2

Łańcuch mniejszy receptora dla IL-2 (p55), określane często jako antygen Tac, wiąże IL-2 z niskim powinowactwem, łańcuch większy (p75) wiąże IL-2 z powinowactwem średnim. Heterodimer receptora dla IL-2 wymaga 1000-krotnego niższego stężenia IL-2 do wysycenia niż p55 stanowiąc receptor o wysokim powinowactwie [38]. Tak więc receptor dla IL-2 może występować w komórkach w trzech różnych formach: jako receptor o powinowactwie: wysokim (p55 + p75), średnim (p75) i niskim (p55). Wykrycie linii komórkowych, których komórki mają wyłącznie ekspresję p55 (linia białaczkowa MT-1) [33] lub p75 (linia białaczkowa YT-2C2) [51] lub heterodimeru p55 + p75 (indukowane komórki linii YT i HUT-102) [39, 63], pozwoliło prześledzić kinetykę wiązania IL-2 do poszczególnych

łańcuchów. Receptor dla IL-2 o wysokim powinowactwie jest nasycony cząsteczkami IL-2 przy stężeniu IL-2 znacznie niższym, niż jest ono wymagane dla receptora o średnim powinowactwie i o niskim powinowactwie, stąd znacznie większa efektywność wiązania IL-2 przez heterodimer. Wiązanie IL-2 do p55 i p75 zachodzi z wyraźnie różną kinetyką (tab. 1). Reakcje IL-2 z p75 są bardzo wolne, a z p55 bardzo szybkie [63]. Szybkie tempo asocjacji IL-2 z p55 sugeruje, że wiązanie IL-2 jest prawdopodobnie ograniczone przez poziom dyfuzji IL-2. Przeciwnie IL-2 wiąże się do p75 wielokrotnie wolniej, a wyniki badań

TABELA 1. Kinetyka wiązania IL-2 przez łańcuchy polipeptydowe receptora dla IL-2 (wg [63])

Łańcuch IL-2R	Stała szybkości reakcji		Połowiczny czas trwania reakcji $t_{1/2}$	Stała równowagi reakcji K_d (M) ($\pm 0,1$)
	dysocjacji k' (s^{-1})	asocjacji k ($M^{-1} s^{-1}$)		
p75	$2,5 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^5$	46 min	$1,2 \times 10^{-9}$
p55	$4,0 \times 10^{-1}$	$1,4 \times 10^7$	1,7 s	$1,4 \times 10^{-8}$
p55 - p75	$2,3 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^7$	50 min	$1,3 \times 10^{-11}$

Badania wykonano przy użyciu następujących linii komórkowych: dla p75 : YT-2C2; dla p55 : MT-1; dla p55 + p75 : indukowana linia YT.

raczej sugerują wystąpienie konformacyjnych zmian w strukturze p75 niezbędnych do związania ligandu [56]. Receptor złożony z dwóch łańcuchów polipeptydowych cechuje zdolność szybkiej asocjacji z cząsteczkami IL-2 i powolna dysocjacja. Można przypuszczać, że konsekwencją połączenia obu łańcuchów polipeptydowych receptora dla IL-2 jest konformacyjna zmiana obu lub jednego z nich, która czyni kompleks zdolny do szybkiego wiązania IL-2 oraz jej endocytozy. Do niedawna badania były skoncentrowane na receptorze dla IL-2 o niskim powinowactwie, dzięki przeciwciałom monoklonalnym anti-Tac wytworzonym przez Uchiyama i wsp. [57, 58]. Te przeciwciała blokowały zależną od IL-2 proliferację limfocytów T, blokowały wiązanie znakowanej IL-2 do aktywowanych limfocytów T, a interleukina-2 w wysokim stężeniu blokowała wiązanie przeciwciał monoklonalnych do aktywowanych komórek [32]. Dopiero eksperymenty z użyciem ustalonej linii białaczkowych komórek NK (YT) wykazały, że p55 nie jest jedyną strukturą wiążącą IL-2, bowiem komórki linii YT wiążą IL-2 mimo braku obecności mRNA dla antygeny Tac i mimo braku ekspresji tego antygeny na powierzchni komórek [55]. Wiązanie IL-2 do p75 jest hamowane przez nadmiar nieznakowanej IL-2, lecz nie przez przeciwciała monoklonalne anti-Tac. W ten sposób wykryto receptor dla IL-2 o średnim powinowactwie [39, 51]. Wykrycie miejsc wiązania dla IL-2 o różnym powinowactwie nie jest zjawiskiem wyjątkowym, gdyż jest to cecha charakterystyczna dla wielu innych znanych czynników wzrostu np. epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) [26], nerwowego czynnika wzrostu (NGF) [1], czynnika wzrostu pochodzącego z płytek (PDGF) [65].

Istnieją dowody wskazujące, że receptor dla IL-2 funkcjonuje jako kompleks o wiele bardziej złożony. Edidin [10] i Szollosi [50] zaobserwowali, że białko o m. cz. 95 kDa (nazwane T27) jest zasocjowane z antygenem Tac na powierzchni przynajmniej pewnych zaktywowanych limfocytów T i ta asocjacja nie jest przypadkowa. Inni badacze, Herrmann i Diamantstein [23] oraz Saragovi i Malek [42] wykryli na mysich limfoblastach T oraz komórkach linii CTLL-16 i EL-4 białko o m. cz. 90–100 kDa zasocjowane z receptorem dla IL-2 o wysokim powinowactwie.

Połączenie p55 i p75 ma naturę dynamiczną. Oddziaływanie IL-2 z p55 sprzyja przemieszczaniu się kompleksu IL-2 + p55 w błonie, dopóki nie natrafi on na p75 [47]. Należy jednak udowodnić, czy receptor dla IL-2 o wysokim powinowactwie tworzy się jedynie wówczas, gdy jest obecna IL-2 [27], czy też istnieje jako heterodimer p55 + p75 bez koniecznej obecności IL-2 w celu asocjacji p55 i p75 [43]. Doświadczenia immunoprecypitacji receptora dla IL-2 przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych Mik- β 1 wskazują na słuszność tej drugiej hipotezy [54].

PORÓWNANIE BUDOWY ŁAŃCUCHÓW POLIPEPTYDOWYCH RECEPTORA DLA IL-2 (p55 I p75)

p55 jest zbudowany z 251 aminokwasów. Sekwencja N-końcowa złożona z 219 aminokwasów stanowi część zewnątrzkomórkową receptora i jest odpowiedzialna za wiązanie IL-2. Silnie hydrofobowy 19-aminokwasowy segment zakotwiczony jest w błonie. Część cytoplazmatyczna zawiera zaledwie 13 aminokwasów i wydaje się być za mała do pełnienia funkcji enzymatycznych [34]. p75 jest złożony z 551 aminokwasów, w tym 26 aminokwasów przy końcu $-NH_2$ stanowi sekwencja sygnałowa. Dojrzała forma p75 składa się z 525 aminokwasów, a obliczona masa cząsteczkowa wynosi 58 358 Da. Liczba aminokwasów w zewnątrzkomórkowym regionie p75 wynosi 214 i jest porównywalna z liczbą aminokwasów w regionie zewnątrzkomórkowym p55. p75 ma 25 aminokwasów hydrofobowych (od 215 do 239) umocowanych w błonie komórkowej, rejon cytoplazmatyczny zawiera 286 aminokwasów [22]. Wiele innych receptorów znanych czynników wzrostu ma dużą cytoplazmatyczną domenę o aktywności kinazy tyrozynowej. Rejon cytoplazmatyczny p75 nie zawiera jednak sekwencji charakterystycznej dla kinazy tyrozynowej, ale ma tryplet Ala-Pro-Glu (293–295) będący stałym ugrupowaniem w kinazach białkowych. Ten rejon jest bogaty w prolinę i serynę (30 aminokwasów z 286). Bogate w prolinę struktury wykazano również w cytoplazmatycznym regionie CD2, antygenie wymaganym w proliferacji limfocytów T. Cytoplazmatyczny region p75 zawiera 40 anionowych aminokwasów (kwas glutaminowy i asparaginowy), a tylko 18 kationowych aminokwasów (lizyna i arginina), jest wobec tego ujemnie naładowany, co może mieć znaczenie w transdukcji sygnału. Fragment wewnątrzkomórkowy p55 nie ma reszt tyrozynowych, a fosforylacja reszt treoniny i seryny nie wpływa na zdolność transdukcji sygnału. Ostatnio wykazano, że receptor dla IL-2 jest strukturalnie spokrewniony z receptorem dla erytropoetyny [5].

STRUKTURA GENU DLA RECEPTORA DLA IL-2 O NISKIM POWINOWACTWIE

Badania technikami hybrydyzacji *in situ* pozwoliły zlokalizować pojedynczy gen dla antygeny Tac na chromosomie 10 p prążek 14–15. Gen ten składa się z 8 egzonów i 7 intronów zajmujących długość ok. 25 000 par zasad. Sugeruje się, że sekwencje w obrębie egzonu 2 i 4 są wymagane do tworzenia miejsc wiązania dla IL-2. Ósmy egzon koduje 13-aminokwasowy region domeny wewnątrzcytoplazmatycznej. W komórkach wykazujących

ekspresję p55 wykryto dwie klasy mRNA dla p55 różniące się długością: 1 500 i 3 500 par zasad. Jest to spowodowane wykorzystaniem przez enzymy dwóch zasadniczych miejsc inicjacji transkrypcji genu dla p55 oraz obecnością dwóch lub więcej sygnałów poliadenylacyjnych [31].

cDNA kodujący antygen Tac został wyizolowany w 1984 r. przez dwa niezależne zespoły badawcze: Greene i Waldmanna oraz Honjo i Yodoi [47]. Obie grupy badaczy otrzymały cDNA, które koduje białko o masie cząsteczkowej 28 400 Da. Ten prekursorowy polipeptyd jest potranslacyjnie modyfikowany przez glikozylację, sulfonowanie i fosforylację [34].

W 1989 r. Taniguchi i Tsudo [22] wyizolowali cDNA dla p75 i oznaczyli sekwencję aminokwasową białka. cDNA przygotowali z ludzkich białaczkowych komórek linii YT. Wyizolowali dwa niezależne klony cDNA: pIL-2R i pIL-2R b30, których produkty ekspresji: Mik- β 1 i Mik- β 2 specyficznie reagowały z przeciwciałami monoklonalnymi dla p75 [54]. Te cDNA zawierały inserty o wielkości 1,3 kb i 2,3 kb reagujące krzyżowo. Stwierdzono, że oba cDNA wiążą się z tym samym mRNA, którego wielkość wynosi ok. 4 000 par zasad. Lokalizacja i struktura genu dla p75 nie jest jeszcze poznana.

EKSPRESJA RECEPTORA DLA IL-2 NA LIMFOCYTACH STYMULOWANYCH NIESWOISTYMI MITOGENAMI STYMULACJA PHA

Większość krążących limfocytów krwi obwodowej jest w fazie G_0 cyklu komórkowego. Stymulacja antygenem lub nieswoistym mitogenem powoduje proliferację limfocytów [3, 36]. Po upływie 72 godzin od stymulacji PHA prawie wszystkie limfocyty T mają na swojej powierzchni antygen Tac, który pojawia się już w ciągu 4–8 godzin po aktywacji komórek [2, 19, 57]. Po 10–21 dniach hodowli liczba miejsc wiążących IL-2 zmniejsza się o 80–90% równocześnie z obniżeniem poziomu transkrypcji mRNA dla antygeny Tac. mRNA dla antygeny Tac jest obserwowany po 4 godzinach od stymulacji PHA i osiąga maksymalne stężenie w ciągu 8–12 godzin, a potem obniża się [19, 29]. Po 3–6 tygodniach hodowli limfocyty T nie odpowiadają dłużej na IL-2. Wiele obserwacji wskazuje na to, że IL-2 pełni ważną rolę w regulacji ekspresji swojego receptora [6, 48]. Dodanie IL-2 do hodowli limfocytów T prowadzi do indukcji mRNA i ekspresji antygeny Tac. Efekt deksametazonu, który hamuje produkcję IL-2 przez aktywowane lektyną limfocyty T i obniża ekspresję p55, znosi dodana do hodowli egzogenna IL-2.

Znacznie mniej wiadomo o regulacji ekspresji p75, gdyż przeciwciała monoklonalne dla tego łańcucha otrzymano dopiero na początku roku 1989, również dopiero w tym roku sklonowano gen dla tego białka. Białaczkowa linia limfocytarna LGL "Tac ujemna" ma na swojej powierzchni p75. Dodanie IL-2 do hodowli tych komórek indukuje transkrypcję genu p55 i ekspresję antygeny Tac w błonie [53]. Wydaje się, że oddziaływanie IL-2 z receptorem o średnim powinowactwie indukuje ekspresję receptora o niskim powinowactwie prowadząc do powstania dwułańcuchowego receptora dla IL-2 o wysokim powinowactwie. Podczas gdy po stymulacji normalnych limfocytów PHA ilość antygeny Tac osiąga liczbę 30 000 do 60 000 miejsc wiążących dla IL-2 na komórkę, liczba p75 zwiększa się z początkowego poziomu ok. 600 miejsc wiążących IL-2, występujących na limfocytach

spoczynkowych, do 1 500–2 000 na komórce stymulowanej [52]. Związanie IL-2 z receptorem o wysokim powinowactwie powoduje w ciągu 30–60 min obniżenie jego gęstości do 40–50% ilości początkowej, a po następnych 24 godzinach receptor dla IL-2 o niskim powinowactwie akumuluje się na powierzchni komórek przewyższając ilość heterodimeru 10–20 razy. Gdy usunie się IL-2, stężenie heterodimeru powraca do wyjściowej gęstości w ciągu 1–2 godzin, podczas gdy nadmiar p55 pozostaje przez wiele godzin, zanim się obniży.

W niestymulowanych limfocytach krwi obwodowej mRNA p75 jest oznaczalny i jego ekspresja wzrasta tylko 2,5 razy po stymulacji mitogenem [22]. W spoczynkowych limfocytach nie występuje mRNA dla p55 i jego obecność jest ściśle zależna od stymulacji komórek mitogenem, co wskazuje na istnienie różnych mechanizmów regulacji ekspresji genów dla dwóch łańcuchów polipeptydowych receptora dla IL-2.

Aktywacja limfocytów przez antygeny prowadzi do ekspresji na ich powierzchni receptorów dla IL-2 o wysokim powinowactwie. Towarzyszy temu zwiększenie stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia, aktywacja cyklu fosfoinozytowego i translokacja białka kinazy C z cytoplazmy do błony [13, 30, 64]. Receptor dla IL-2 może być także indukowany bez udziału receptora antygenowego przez użycie jonoforu wapniowego A 23187, który zwiększa wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia lub octanu mirystynianu forbolu (PMA), który oddziałuje z białkową kinazą C. Stymulacja przeciwciałami monoklonalnymi anti-T11 i anti-T3 daje taki sam efekt.

WYSTĘPOWANIE RECEPTORA DLA INTERLEUKINY-2

Mniej niż 5% świeżo izolowanych, niestymulowanych ludzkich limfocytów krwi obwodowej reaguje z przeciwciałami monoklonalnymi anti-Tac [57]. Większość spoczynkowych limfocytów T i B i monocytów nie ma receptora dla IL-2 o niskim powinowactwie. Receptor ten występuje na aktywowanych limfocytach T i B. Wykazano jego ekspresję na wielu liniach B komórkowych od pacjentów z chłoniakiem Burkitta i na liniach B komórkowych zawierających genom HTLV-I oraz komórkach B włośchatokomórkowej białaczki. W prawidłowych limfocytach B krwi obwodowej można indukować ekspresję łańcucha p55 działaniem *Staphylococcus aureus* I, PWM, PMA lub przeciwciałami anti- μ . Komórki linii limfoidalnych (YT, HUT-102), jak również aktywowane prawidłowe limfocyty B wykazują ekspresję receptora dla IL-2 o niskim i wysokim powinowactwie. Przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych anti-Tac wykryto p55 na aktywowanych komórkach linii monocyty/makrofagi włączając komórki Reed-Strenberga w chorobie Hodgkina, komórki Kupffera w wątrobie, hodowane makrofagii z płuc, komórki Langerhansa w skórze i normalne ludzkie monocyty krwi obwodowej stymulowane LPS lub interferonem γ . Antygen Tac zidentyfikowano również na komórkach linii innych niż linie limfocytarno-monocytarne. Granulocyty z fazy promielocytów nie wykazują ekspresji antygenu Tac in vitro zarówno przed, jak i po stymulacji. Część jednak komórek blastycznych w około połowie przypadków ostrej białaczki mielocytowej ma receptor dla IL-2 o niskim powinowactwie [60].

p75 jest obecny na aktywowanych limfocytach T, limfocytach B i monocytach, szczególnie na limfocytach T stymulowanych PHA lub PMA i infekowanych HTLV-I, tworząc z p55 receptor o wysokim powinowactwie [8, 41]. Dodatkowo występuje na pewnych krążą-

cych komórkach i liniach komórkowych, np. YT-2C2 i MLA-144, które nie mają p55. Występują także na spoczynkowych limfocytach szczególnie subpopulacji CD8⁺ [8, 16, 22].

FUNKCJA RECEPTORA DLA INTERLEUKINY-2

Każdy z łańcuchów heterodimeru p55 + p75 spełnia szczególną rolę przy tworzeniu funkcjonalnego receptora dla IL-2 o wysokim powinowactwie. Obecność przeciwciał anti-Tac nie hamuje proliferacji limfocytów, mimo że całkowicie hamuje wiązanie IL-2 do p55 i rozbija strukturę heterodimeru p55 + p75 [2, 63]. Zablockowane przeciwciałami monoklonalnymi anti-Tac komórki proliferują dzięki obecności p75 w błonie komórkowej. Jedynie stężenie IL-2 potrzebne do wywołania odpowiedzi proliferacyjnej wzrasta 15 razy [63]. Komórki linii MLA-144, u której stwierdzono autokrynowy mechanizm regulacji proliferacji oparty na IL-2, mają wyłącznie p75 i on odpowiada za pobudzenie komórek do podziału [39, 55]. Wydaje się, że p55 nie bierze udziału w transdukcji sygnału. Główna jego rola polega na zmianie własności kinetycznych heterodimeru na bardziej korzystne dla komórki. Szczególne znaczenie heterodimeru p55 + p75 w transdukcji sygnału potwierdza fakt, że przeciwciała monoklonalne Mik-β1 skierowane przeciwko p75 nie hamują zależnej od IL-2 proliferacji linii komórkowych, o ile nie były podane razem z przeciwciałami monoklonalnymi AMT-13 przeciwko p55 [21, 54]. W celu określenia funkcji różnych domen p75 skonstruowano i wprowadzono do mysich komórek linii BA/F3 serię cDNA dla genu p75 z delecjami w różnych częściach łańcucha polipeptydowego regionu cytoplazmatycznego, a następnie badano powinowactwo p75 do IL-2, internalizację IL-2 i transdukcję sygnału wzrostu [21]. Zmutowana postać p75, która zachowała jedynie 27-aminokwasową sekwencję cytoplazmatyczną, zatrzymała zdolność wiązania IL-2 i tworzenia receptora o wysokim powinowactwie. Zmiana długości części cytoplazmatycznej nie wywierała istotnego wpływu na proces internalizacji IL-2, natomiast miała istotne znaczenie dla transdukcji sygnału. Szczególnie delecja rejonu pomiędzy aminokwasami 267 a 312, bogatego w reszty serynowe i aminokwasy kwaśne, powodowała utratę zdolności transdukcji sygnału. Autorzy postulują, że ta krytyczna dla transdukcji sygnału 46-aminokwasowa domena może stanowić miejsce aktywne enzymu o nieznannej funkcji lub miejsce wiązania dla jakiegoś drugorzędowego przekaźnika informacji. W 1987 r. Hatakeyama i wsp. skonstruowali geny chimeryczne kodujące receptor złożony z zewnątrzkomórkowej części p55 oraz części błonowej i cytoplazmatycznej receptora dla insuliny. Ekspresję tego receptora uzyskano w mysich limfocytach T linii EL-4 [20]. Obserwowano specyficzne wiązanie IL-2 przez chimeryczny receptor oraz internalizację IL-2. Zmiana części błonowej i cytoplazmatycznej p55 nie wpłynęła na zdolność tworzenia funkcjonalnego receptora o wysokim powinowactwie. Obecność dużej cytoplazmatycznej domeny receptora dla insuliny z aktywnością kinazy tyrozynowej nie wpłynęła na strukturę i funkcję receptora dla IL-2. Wprowadzenie cDNA p55 do komórek nielimfoidalnych spowodowało ekspresję antygeny Tac na ich powierzchni [17, 40]. Jednak stymulacja transfekowanych komórek IL-2 nie dawała dostrzegalnej odpowiedzi wzrostu. Kiedy wprowadzono cDNA p75 do komórek nielimfoidalnych NIH 3T3, nie obserwowano efektu wiązania IL-2, co sugeruje,

że ekspresja receptora dla IL-2 o średnim powinowactwie wymaga dodatkowych specyficznych komórkowo składników [22].

Przeciwciała monoklonalne anti-Tac dodane do hodowli limfocytów T stymulowanych mitogenem lub antygenem hamują ekspresję białek pojawiających się po stymulacji komórek: receptorów dla insuliny i transferyny i białek Ia (*I antigen* – antygen kodowany przez geny regionu I układu zgodności tkankowej u myszy) [60]. Zablockowanie p55 przeciwciałami anti-Tac hamuje szereg funkcji limfocytów T, np. tworzenie cytotoksycznych i supresorowych limfocytów T w hodowli allogeniczej [7, 35, 58]. Przeciwciała anti-Tac hamują produkcję immunoglobulin przez stymulowane poliklonalnymi aktywatorami limfocyty B [7, 61]. Przy rozpatrywaniu roli p75 i p55 w przetwarzaniu sygnału związania IL-2 ze swoistym receptorem błonowym oraz w przesyłaniu informacji do jądra komórkowego należy uwzględnić możliwość zasocjowania z receptorem dla IL-2 innych białek o m. cz.: 22 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 135 kDa i 180 kDa oraz wspomnianego już wcześniej białka o m. cz. 90–100 kDa [60]. Mechanizm, poprzez który kompleks IL-2 + receptor dla IL-2 przesyła sygnał do jądra komórki inicjującej transkrypcję wielu genów i podział komórki, pozostaje nadal nieznany. Liczne geny włączając protoonkogeny *c-myc*, *c-myb* [4, 49], geny: dekarboksylazy ornitynowej [12], białka szoku termicznego 70 [14], receptora dla IL-2 o niskim powinowactwie [4, 28] i receptora dla transferyny [11] są regulowane przez interleukinę-2. Efektem oddziaływania IL-2 z receptorem o wysokim powinowactwie jest fosforylacja niektórych białek komórkowych między innymi białek o masie cząsteczkowej 67 kDa i 63 kDa wykrytych głównie w cytoplazmie (pp67) i jądrze (pp63). Fosforylacja tych białek zachodzi przy udziale kinazy białkowej C. IL-2 lub PMA indukują fosforylację reszt seryny białek pp67 i pp63 w szczurzych komórkach NK, w normalnych ludzkich limfocytach T stymulowanych mitogenem i limfocytach transformowanych retrowirusem. Taka fosforylacja nie zachodzi w komórkach, które mają tylko receptor dla IL-2 o niskim powinowactwie. Fosforylację białek indukowaną przez IL-2 obserwowano w komórkach MLA-144, które mają tylko receptor o średnim powinowactwie. Sugeruje się, że w komórkach, których wzrost jest zależny od IL-2, fosforylacja białek może mieć ważne znaczenie w transdukcji sygnału wzrostu przez receptor dla IL-2, bowiem fosforylacja białek i odpowiedź proliferacyjna komórki są zależne od dawki IL-2 i są dokładnie skorelowane [25]. Również badania Ferrisa i wsp. wskazują na fosforylację wielu białek, w tym głównie białka o m. cz. 92 kDa po związaniu IL-2 z receptorem o wysokim powinowactwie. I chociaż fosforylacja tego białka była hamowana przez przeciwciała monoklonalne anti-Tac nie ulegała zmianie w tych komórkach, które nie miały antygenu Tac [15].

Receptor dla IL-2 o średnim powinowactwie odpowiada za szybką endocytozę IL-2 [22, 37]. Internalizacja IL-2 prowadzi w komórce do jej degradacji prawdopodobnie przez enzymy lizosomalne, gdyż chlorochina, związek stabilizujący błonę lizosomów, zapobiega degradacji IL-2. Tempo degradacji, po wstępnym okresie spoczynkowym ok. 1 godziny, utrzymuje się na wysokim poziomie 1400–1700 cząsteczek na minutę i jest takie samo niezależnie od ilości antygenu Tac. Internalizacja kompleksu ligand-receptor powoduje zwrotną regulację ilości receptorów dla IL-2 na powierzchni komórek. W obecności IL-2 receptor dla IL-2 znika 10 razy szybciej niż nie zajęty receptor [48]. Po dodaniu znakowanej IL-2 do hodowli limfocytów T ligand jest szybko internalizowany, a po 2–3 godzinach inkubacji ilość receptorów dla IL-2 osiąga stan równowagi. Po tym okresie w obecności wysycającego stężenia IL-2 dla receptora IL-2 o wysokim powinowactwie liczba struktur wiążących IL-2 stanowi 10–20% liczby receptora o wysokim powinowactwie początkowo

obecnej na powierzchni komórek. W roku 1986 Gullberg [18] wykonał doświadczenia, w których manipulował liczbą receptorów dla IL-2 o niskim powinowactwie. Otrzymał populację komórek, która miała tylko 5–15% miejsc wiązania IL-2 o niskim powinowactwie obecnych normalnie na aktywowanych limfocytach T, podczas gdy ekspresja receptora o wysokim powinowactwie była nie zmieniona. Skład receptorów dla IL-2 otrzymany w ten sposób cechował tak obniżony poziom receptora dla IL-2 o niskim powinowactwie, że prawie połowa powierzchniowej puli antygeny Tac była zasocjowana z receptorem dla IL-2 o wysokim powinowactwie. Rok później ten sam autor zbadał dynamikę i funkcję heterodimeru p55 + p75 w warunkach silnej redukcji ekspresji p55 i w warunkach normalnych [19]. Na stymulowanych limfocytach T z całkowitej puli antygeny Tac tylko 2,5% antygeny Tac wiąże się z p75 tworząc receptor dla IL-2 o wysokim powinowactwie. Na komórkach ze sztucznie obniżonym poziomem antygeny Tac na powierzchni 30–50% receptorów dla IL-2 są to receptory o wysokim powinowactwie. Obniżenie ilości antygeny Tac nie wpływało na proces internalizacji IL-2. Te badania pozwoliły zaobserwować, że p55 ulega internalizacji wspólnie z p75. Krótka ekspozycja otrzymanej populacji komórek na oczyszczoną IL-2 powoduje utratę 35–40% miejsc wiązania znakowanych przeciwciałami anty-Tac. Chociaż Robb i Greene [37] wykazali, że IL-2 ulega internalizacji już w obecności p75, wydaje się, że internalizacja ligandu zachodzi głównie poprzez heterodimer p55 + p75.

Nasze informacje na temat mechanizmu przesyłania sygnału przez błonę i naturę biochemicznej drogi aktywacji przez IL-2, co prowadzi do replikacji DNA i podziału komórkowego, pozostają nadal bardzo ograniczone. Poznanie struktury receptora dla IL-2 pozwala zrozumieć, w jaki sposób defekt w zdolności do normalnej ekspresji łańcuchów receptora może prowadzić do niedoborów immunologicznych, chorób autoimmunizacyjnych i licznych nowotworów. W przeciwieństwie do prawidłowych spoczynkowych komórek pewna część nieprawidłowych komórek w nowotworach limfoidalnych, szczególnie tych związanych z retrowirusem HTLV-I, oraz chorobach autoimmunizacyjnych ma receptor dla IL-2 o niskim powinowactwie [9, 59, 62]. Ta informacja stanowi podstawę do podjęcia prób terapeutycznych z użyciem czynnika eliminującego komórki "Tac pozytywne". Limfokiny i przeciwciała monoklonalne połączone z toksyną były użyte przeciwko komórkom nieprawidłowym u pacjentów z białaczkami i chorobami autoimmunizacyjnymi, jak również w poszczególnych przypadkach odrzucania alloprzeszczepu [60].

LITERATURA

- [1] BUXSER SE, KELLEHER DJ, WATSON L, PUMA P, JOHNSON GL. Change in state of nerve growth factor receptor: modulation of receptor affinity by wheat germ agglutinin. *J Biol Chem* 1983; **258**: 3741.
- [2] CANTRELL DA, SMITH KA. Transient expression of interleukin-2 receptors. Consequences for T-cell growth. *J Exp Med* 1983; **158**: 1895–1911.
- [3] CANTRELL DA, SMITH KA. The interleukin 2 T cell system: a new cell growth model. *Science* 1984; **224**: 1312–1316.
- [4] CLEVELAND JL, RAPP UR, FARRAR WL. Role of c-myc and other genes in IL-2 regulated CT6 T lymphocytes and their malignant variants. *J Immunol* 1987; **138**: 3495–3504.
- [5] D'ANDREA AD, FASMAN GD, LODISH HF. Erythropoietin receptor and interleukin-2 receptor β chain: A new receptor family. *Cell* 1989; **58**: 1023–1024.
- [6] DEPPER JM, LEONARD WJ, DROGULA C, KRONKE M, WALDMANN TA et al. Interleukin-2 augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 4230–4234.

- [7] DEPPER JM, LEONARD WJ, ROBB JR, WALDMANN TA, GREENE WC. Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: Inhibition of human lymphocyte activation. *J Immunol* 1983; 131: 690-696.
- [8] DUKOVICH M, WANO Y, THUY LTB, KATH P, CULLENS BR et al. A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptors. *Nature* 1987; 327: 518-521.
- [9] DIAMANTSTEIN T, OSAWA H. The interleukin-2 receptor, its physiology and a new approach to a selective immunosuppressive therapy by anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. *Immunol Rev* 1986; 92: 5-27.
- [10] EDIDIN M, ASZALOS A, DAMJANOVICH S, WALDMANN TA. Lateral diffusion measurements give evidence for association of the Tac peptide of the IL-2 receptor with the T27 peptide in the plasma membrane of HUT-102-B2 T cells. *J Immunol* 1988; 141: 1206-1210.
- [11] EVANS SW, FARRAR WL. Interleukin-2 and diacylglycerol stimulate phosphorylation of 40S ribosomal S6 protein. Correlation with increased protein synthesis and S6 kinase activation. *J Biol Chem* 1987; 262: 4624.
- [12] FARRAR WL, HAREL-BELLAN A, CLEVELAND JL, VINOCOUR M. Regulation of ornithine decarboxylase activity by IL-2 and cyclic AMP. *J Immunol* 1988; 141: 967-971.
- [13] FARRAR WL, RUSCETTI FW. Association of protein kinase C activation with IL-2 receptor expression. *J Immunol* 1986; 136: 1266-1273.
- [14] FERRIS DK, HAREL-BELLAN A, MORIMOTO RI, WELCH WJ, FARRAR WL. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3850-3854.
- [15] FERRIS DK, WILLETTE-BROWN J, ORTALDO JR, FARRAR WL. IL-2 regulation of tyrosine kinase activity is mediated through the p70-75 β -subunit of the IL-2 receptor. *J Immunol* 1989; 143: 870-876.
- [16] GREENE WC. The human interleukin-2 receptor: a molecular and biochemical analysis of structure and function. *Clin Res* 1987; 35: 439-450.
- [17] GREENE WC, ROBB RJ, SVETLIK PB, RUSK CM, DEPPER JM et al. Stable expression of cDNA encoding the human interleukin-2 receptor in eukaryotic cells. *J Exp Med* 1985; 162: 363-368.
- [18] GULLBERG M. Structural analysis of high- versus low-affinity interleukin-2 receptors by means of selective expression of distinct receptor classes. *EMBO J* 1986; 5: 2171-2178.
- [19] GULLBERG M. Analysis of dynamics and functions of high-affinity interleukin-2 receptor. *Mol Immunol* 1987; 24: 1365-1371.
- [20] HATAKEYAMA M, DOI T, KONO T, MARUYAMA M, MINAMOTO S et al. Transmembrane signaling of interleukin-2 receptor. Conformation and function of human interleukin-2 receptor (p55)/insulin receptor chimeric molecules. *J Exp Med* 1989; 166: 362-375.
- [21] HATAKEYAMA M, MORI H, DOI T, TANIGUCHI T. A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor β chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* 1989; 59: 837-845.
- [22] HATAKEYAMA M, TSUDO M, MINAMOTO S, KONO T, DOI T et al. Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA's. *Science* 1989; 244: 551-556.
- [23] HERRMANN F, DIAMANTSTEIN T. *Immunobiology* 1987; 175: 145-158.
- [24] HIDDEN M, NEVE P. The interleukin-2. *Acta Clinica Belgica* 1987; 42: 255-267.
- [25] ISHII T, TAKESHITA T, NUMATA N, SUGAMURA K. Protein phosphorylation mediated by IL-2/IL-2 receptor β -chain interaction. *J Immunol* 1988; 141: 174-179.
- [26] KAWAMOTO T, SATO JD, POLIKOFF AJ, SATO GH, MENDELSON. Growth stimulation of A 431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1337-1341.
- [27] KONDO S, SHIMIZU A, SAITO T, KINOSHITA A, HONJO T. Molecular basis for two different affinity states of the interleukin-2 receptor: affinity conversion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9026-9030.
- [28] KRÖNKE M, LEONARD WJ, DEPPER JM, GREENE WC. Sequential expression of genes involved in human T lymphocyte growth and differentiation. *J Exp Med* 1985; 161: 1593-1598.
- [29] KRÖNKE M, LEONARD WJ, DEPPER JM, GREENE WC. Deregulation of interleukin-2 receptor gene expression in HTLV-I induced adult T-cell leukemia. *Science* 1985; 228: 1215-1217.
- [30] LARSEN CS, CHRISTIANSEN NO, ESMANN V. Protein kinase C activity in activated human T-lymphocytes stimulated by interleukin-2. *Biochim Biophys Acta* 1988; 969: 281-288.
- [31] LEONARD WJ, DEPPER JM, KRÖNKE M, PEFFER NJ, SVETLIK PB et al. Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science* 1985; 230: 633-639.

- [32] LEONARD WJ, DEPPER JM, UCHIYAMA T, SMITH KA, WALDMANN TA, et al. A monoklonal antibody anti-Tac blocks the membrane binding and action of human T cell growth factor. *Nature* 1982; **300**: 267–269.
- [33] LOWENTHAL JW, GREENE WC. Contrasting interleukin-2 binding properties of the α (p55) and β (p70) protein subunits of the human high-affinity interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987; **166**: 1151–1161.
- [34] NOWICKA-WIELGOSZ J. Rola interleukiny-2 w regulacji odpowiedzi immunologicznej. *Pol Arch Med Wewn* 1987; **77**: 105–111.
- [35] OH-ISHI T, GOLDMAN CK, MISITI J, WALDMANN TA. Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody inhibits the generation of antigen nonspecific suppressor T cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 6478–6482.
- [36] POULTON TA, GALLAGHER A, POTTS RC, SWANSON BECK J. Changes in activation markers and cell membrane receptors on human peripheral blood T lymphocytes during cell cycle progression after PHA stimulation. *Immunology* 1988; **64**: 419–425.
- [37] ROBB RJ, GREENE WC. Internalization of interleukin 2 is mediated by the β chain of the high-affinity interleukin 2 receptor. *J Exp Med* 1987; **165**: 1201–1206.
- [38] ROBB RJ, GREENE WC, RUSK CM. Low and high affinity cellular receptors for interleukin-2. Implications for the level of Tac antigen. *J Exp Med* 1984; **160**: 1126–1146.
- [39] ROBB RJ, RUSK CM, YODOI J, GREENE WC. Interleukin-2 binding molecule distinct from the Tac protein: Analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 2002–2011.
- [40] SABE H, KONDO S, SHIMIZU A, TAGAYA Y, YODOI J et al. Properties of human interleukin-2 receptors expressed on nonlymphoid cells by cDNA transfection. *Mol Biol Med* 1984; **2**: 379–396.
- [41] SAIKI O, TANAKA T, DOIS, KISHIMOTO S. Expression and the functional role of a p70/75 interleukin-2 binding molecule in human B cell. *J Immunol* 1988; **140**: 853–858.
- [42] SARAGOVICH H, MALEK TR. The murine interleukin-2 receptor. Irreversible cross-linking of radiolabeled interleukin-2 to high affinity interleukin-2 receptors reveals a noncovalently associated subunit. *J Immunol* 1987; **139**: 1918–1926.
- [43] SARAGOVICH H, MALEK TR. Direct identification of the murine IL-2 receptor p55-75 heterodimer in the absence of IL-2. *J Immunol* 1988; **141**: 476–482.
- [44] SHARON M, KLAUSNER RD, CULLEN BR, CHIZZONITE R, LEONARD WJ. Novel interleukin 2 receptor subunit detected by crosslinking under high-affinity conditions. *Science* 1986; **234**: 859–863.
- [45] SKOTNICKI AB. Rola interleukiny-2 w reaktywności immunologicznej. *Immunologia Polska XII* 1987; **2**: 183–196.
- [46] SMITH KA. The two-chain structure of high-affinity IL-2 receptors. *Immunol Today* 1987; **8**: 11–13.
- [47] SMITH KA. The interleukin 2 receptor. *Advances in Immunol* 1988; **42**: 165–179.
- [48] SMITH KA, CANTRELL DA. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 864–868.
- [49] STERN JB, SMITH KA. Interleukin 2 induction of T cell G1 progression and c-myc expression. *Science* 1986; **233**: 203–206.
- [50] SZOLLOSI J, DAMJANOVICH S, GOLDMAN CK, FULWYLER M, ASZALOS AA et al. Flow cytometric resonance energy transfer measurements support the association of a 95-kD peptide termed T27 with the 55-kD Tac peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7246–7251.
- [51] TESHIGAWARA K, WANG H-M, KATO K, SMITH KA. Interleukin 2 high affinity receptor expression depends on two distinct binding proteins. *J Exp Med* 1987; **165**: 223–238.
- [52] THUY LTB, DUKOVICH M, PEFFER WJ, FAUCI AS, KEHRL JH et al. Direct activation of human resting T cells by IL-2: the role of an IL-2 receptor distinct from the Tac protein. *J Immunol* 1987; **139**: 1550–1555.
- [53] TSUDO M, GOLDMAN CK, BONGIOVANNI KF, CHAN WC, WINTON EF et al. The p75 peptide is the receptor for interleukin-2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin-2 activation of these cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 5394–5398.
- [54] TSUDO M, KITAMURA F, MIYASAKA M. Characterization of the interleukin-2 receptor β chain using three distinct monoklonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1982–1986.
- [55] TSUDO M, KOZAK RW, GOLDMAN CK, WALDMANN TA. Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: A potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 9694–9698.

- [56] TSUDO M, KOZAK RW, GOLDMAN CK, WALDMANN TA. Contribution of a p75 interleukin-2 binding peptide to a high-affinity interleukin-2 receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4215-4218.
- [57] UCHIYAMA T, BRODER S, WALDMANN TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human cells. 1. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. *J Immunol* 1981; **126**: 1393-1397.
- [58] UCHIYAMA T, NELSON DL, FLEISHER TA, WALDMANN TA. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. 2. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells and on one of two types of helper T cells. *J Immunol* 1981; **126**: 1398-1403.
- [59] WALDMANN TA. The structure, function and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science* 1986; **232**: 727-732.
- [60] WALDMANN TA. The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 875-911.
- [61] WALDMANN TA, GOLDMAN CK, ROBB RJ, DEPPER JM, LEONARD WJ et al. Expression of interleukin-2 receptors on activated human B cells. *J Exp Med* 1984; **160**: 1450-1466.
- [62] WALDMANN TA, GREENE WC, SARIN PS, SAXINGER C, BLAYNEY DW et al. Functional and phenotypic comparison of human T cell leukemia (lymphoma virus positive adult T cell leukemia with human T cell leukemia) lymphoma virus negative Sezary leukemia and their distribution using anti-Tac. *J Clin Invest* 1984; **73**: 1711-1718.
- [63] WANG H-M, SMITH KA. The interleukin 2 receptor: Functional consequences of its bimolecular structure. *J Exp Med* 1987; **166**: 1055-1069.
- [64] WEISS A, IMBODEN J, SHOBACK D, STOBO J. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 4169-4173.
- [65] WILLIAMS LT, TREMBLE PM, LAVIN MF, SUNDAY ME. Platelet-derived growth factor receptors from a high affinity state in membrane preparations. *J Biol Chem* 1984; **259**: 5287.

Otrzymano: 14 marca 1990

Przyjęto: 10 sierpnia 1990

Adres Autorki: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

CHARAKTERYSTYKA IMMUNOLOGICZNA PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF B CELLS CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKAEMIA

Zofia, Monika RUPNIEWSKA i Małgorzata WACH

Klinika Hematologii Katedry Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie. W niniejszej pracy poglądowej przedstawiono hybrydowy charakter komórki przewlekłej białaczki limfacyjnej B komórkowej (PBL-B). Zagadnienie to rozpatrywano w aspekcie równoczesnej ekspresji markerów komórki B i T, niektórych antygenów wspólnych dla wszystkich leukocytów oraz tzw. antygenów nowotworowych. Ponadto w PBL-B występuje szereg ilościowych i jakościowych nieprawidłowości komórek T łącznie z nieprawidłową rearanżacją genów dla łańcucha gamma receptora komórki T i aberracjami chromosomowymi. Wyniki te sugerują, że przynajmniej w niektórych przypadkach PBL-B wychodzi z młodej komórki wspólnej dla linii komórek B i T.

Summary. In this review article the hybridic nature of leukaemic B-cells of chronic lymphocytic leukaemia is considered. This problem is approached by presenting the data on contemporary expression of B- and T-lymphocyte markers, of some common leukocyte antigens and of so called "neoplastic antigens". Furthermore several qualitative and quantitative T cell abnormalities including affected gene rearrangement involving gamma Ig chain (TCR gamma) receptor and also chromosome aberration are reviewed. Presented results suggest that in some cases of chronic B cell lymphocytic leukaemia may originate from the early and common for T- and B line cell.

WPROWADZENIE

Przewlekła białaczka limfacyjna B-komórkowa (PBL-B) jest zaliczana do najczęściej występujących białaczek tak w Stanach Zjednoczonych, jak i w Europie. Stanowi ona ok. 30% wszystkich białaczek. Przyjmuje się, że w 95% przypadków jest to monoklonalna nowotworowa proliferacja limfocytów B. Nie jest to jednak pojedyncza jednostka chorobowa i naszym zdaniem należy raczej mówić o chorobach typu przewlekłej białaczki limfacyjnej [34, 35, 57, 58]. Niedawno międzynarodowa Grupa Badaczy Francusko-Ame-

rykańsko-Brytyjskich, tzw. Grupa FAB na podstawie badań morfologicznych i badań fenotypu immunologicznego białaczkowych komórek, badań histopatologicznych szpiku, a także obrazu klinicznego wyróżniła dziewięć wariantów PBL-B [6], które przedstawiono w tabeli 1. Granice między postacią klasyczną PBL-B i jej wariantami są płynne. Ponadto Han i wsp. [29] na podstawie badań retrospektywnych białaczek typu PBL-B wyodrębnili łagodną monoklonalną limfocytozę B-komórkową (*benign monoclonal B cell lymphocytosis*) o odmiennym przebiegu klinicznym.

W tabeli 2 w nieco zmodyfikowanej wersji klasyfikacji PBL-B-FAB przedstawiono cechy morfologiczne białaczkowych limfocytów B umożliwiające różnicowanie między poszczególnymi postaciami PBL-B. Odróżniono małe limfocyty z klasycznej PBL-B od dużych limfocytów i prolimfocytów występujących w białaczcze mieszano-komórkowej. Przedstawiono także bardziej subtelne różnice między pleomorficznymi limfocytami z białaczki limfatyczno-prolimfocytarnej a raczej homogeną populacją prolimfocytów w białaczcze prolimfocytarnej. Scharakteryzowano komórki włosiane białaczki włosiano-komórkowej i komórki szczylinowate chłoniaka grudkowego.

Badania fenotypu immunologicznego białaczkowych komórek dostarczają cennych informacji odnośnie linii i stopnia dojrzałości komórki B, w której wystąpiła złośliwa transformacja. Rozpoznanie różnicowe poszczególnych postaci PBL-B przy użyciu technik immunologicznych przedstawiono w tabeli 3.

KLASYCZNA PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA LIMFATYCZNA B-KOMÓRKOWA

MORFOLOGIA BIAŁACZKOWYCH KOMÓREK I OBRAZ HISTOPATOLOGICZNY SZPIKU

Dominującą komórką w PBL-B jest mały limfocyt z charakterystycznym wąskim rąbkiem cytoplazmy o regularnych obrysach jądra i cytoplazmy. Niekiedy jednak obserwuje się pewną nieregularność jąder, jak np. jądra nerkowe lub jądra o płtykach wcięciach. Cytoplazma jest homogenna, blado-niebieska, pozbawiona ziarnistości. Natomiast chromatyna jądra tworzy zbite, grube, ciemne bloki rozdzielone jaśniejszymi przestrzeniami. Jąderka są zazwyczaj niewidoczne. Charakterystyczne są cienie komórkowe, których odsetek wzrasta ze wzrostem leukocytozy.

W badaniu histopatologicznym szpiku nacieki komórek białaczkowych mogą mieć charakter: nacieków śródmiąższowych (*interstitial*), guzków (*nodular*), mieszany lub nacieków rozlanych (*diffuse*), co jak się wydaje, koreluje ze stanem klinicznym [44, 52].

CHARAKTERYSTYKA IMMUNOLOGICZNA BIAŁACZKOWYCH KOMÓREK

Zdaniem autorów z Grupy FAB [6] cztery markery immunologiczne decydują o rozpoznaniu PBL-B. Są to:

- słaba ekspresja powierzchniowych immunoglobulin (Ig),
- zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy przez co najmniej 30% komórek,
- ekspresja antygenu CD 5 na ponad 50% komórek,
- ekspresja antygenu CD 22 na ponad 30% komórek.

TABELA 1. Proponowana przez Międzynarodową Grupę Badaczy Francusko-Amerykańsko-Brytyjskich klasyfikacja przewlekłych białaczek limfatycznych B-komórkowych (klasyfikacja PBL-B wg FAB [6])

- ◆ Klasyczna przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa
- ◆ Przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa typu mieszanego, w której wyróżniono dwa podtypy:
 - ◇ podtyp dimorficzny
 - ◇ podtyp pleomorficzny
- ◆ Białaczka prolimfocytarna
- ◆ Białaczka włosiano-komórkowa i jej wariant włosiano-prolimfocytarny
- ◆ Chłoniak śledzionowy z kosmatymi limfocytami
- ◆ Białaczkowa faza chłoniaka grudkowego
- ◆ Białaczkowa faza chłoniaka typu pośredniego (*intermediate lymphoma*), czyli chłoniaka wychodzącego z mankietu limfocytów B otaczających grudki chłonne (*mantle zone lymphoma*)
- ◆ Makroglobulinemia Waldenstroma
- ◆ Białaczka plazmocytna, w której wyróżniono dwa podtypy:
 - ◇ plazmocytowy
 - ◇ plazmoblastyczny

Antygen CD 5 (dawniejsze nazwy T 1, UCHT 2, T 101) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 67 kDa (gp 67), będącą w zasadzie antygenem komórek T i tylko niewielkiej subpopulacji komórek B [33, 51]. CD 5 występuje zaledwie na 2–3% komórek B migdałków oraz wśród limfocytów B z mankietu otaczającego grudki chłonne I i II rzędu. Zdaniem Caligaris-Cappio [9] w warunkach prawidłowych antygen ten kontroluje proliferację komórki T, ale kontrola ta nie obejmuje białaczkowych komórek B. Na poziomie molekularnym ekspresja CD 5 powoduje zwiększenie się puli prekursorowej fosfolipazy C we wnętrzu komórki [67].

Antygen CD 22 (dawniejsze nazwy FMC 7, To 15, HD 39) jest gp 135 mającą pięć domen podobnych do Ig. Geny kodujące CD 22 są zaliczane do nadrodziny genów immunoglobulinowych (*immunoglobulin gene super family*). Wykazano także znamienne homologie z molekułą glikoproteiny mielinowej (*myelin-associated glycoprotein*, w skrócie MAG) tak zwanego białka adhezji neuronów (*neuronal adhesion protein*), które warunkuje adhezję monocytów i erytrocytów [33, 69]. U osób zdrowych ekspresja antygeny CD 22 może występować zarówno we wnętrzu komórki, jak i na powierzchni jednej z subpopulacji komórek B. Ekspresję cytoplazmatyczną CD 22 obserwuje się wyłącznie w prekursorowych komórkach B, natomiast na małych, dojrzałych limfocytach antygen CD 22 występuje na powierzchni komórki [9]. Podobnie jak antygen CD 2 komórek T, który jest receptorem dla erytrocytów barana, CD 22 ułatwia rozpoznanie antygeny przez immunoglobulinowy receptor komórki B. Jest to możliwe dzięki nasileniu niespecyficznego kontaktu z komórkami prezentującymi antygen. Przemawia za tym fakt, że ekspresja CD 22 jest skoordynowana z ekspresją powierzchniowych Ig w odpowiedzi na antygen [55]. CD 22 pojawia się na powierzchni komórki wkrótce po IgM, równocześnie z IgD [17, 55]. Co więcej zarówno IgM, jak i CD 22 występują wyłącznie w cytoplazmie, a nie na powierzchni komórek pre-B i młodych blastycznych komórek B z ostrych białaczek limfoblastycznych B komórkowych [17]. Wydaje się, że CD 22 uczestniczy także w transmisji sygnałów działając synergistycznie z receptorem dla antygeny [54] i reaguje krzyżowo z powierzchniową IgM, ale wyłącznie w komórkach $IgM^+ CD 22^+$, a nie w komórkach $IgM^+ CD 22^-$ [55].

TABELA 2. Cechy morfologiczne białaczkowych limfocytów B w przebiegu różnych postaci przewlekłych białaczek limfatycznych (modyfikacja wg [6])

Postać przewlekłej białaczki limfatycznej	Typ białaczkowej komórki	Rozmiary komórki	Struktura chromatyny jądra	Jąderko	Cytoplazma	Inne cechy morfologiczne
Klasyczna PBL-B	małe limfocyty	mniejsze od podwójnej średnicy krwinki czerwonej	zbita w grube bloki rozdzielone jaśniejszymi przestrzeczeniami	brak	skąpa (wysoki stosunek jądra do cytoplazmy)	regularne obrysy jądra, liczne cienie komórkowe
PBL-B typu mieszanokomórkowego	duże limfocyty	większe od podwójnej średnicy krwinki czerwonej	zbita	trudno uchwytne w mikroskopie świetlnym lub małe	ilość zmienna, zwykle nieco obfitsza (stąd różny stosunek jądra do cytoplazmy)	komórki różnych rozmiarów
Białaczka limfatyczno-prolimfocytarna	pleomorficzne limfocyty	jw.	jw.	wyraźne, położone centralnie	różne ilości (różny stosunek jądra do cytoplazmy)	jw.
Białaczka prolimfocytarna	prolimfocyty	jw.	jw.	jedno, wyraźne	obfitsza (niski stosunek jądra do cytoplazmy)	jw.
Białaczka włosiakowa	komórki włosiakowe (<i>hairy cells</i>)	jw.	jednorodna rozproszona	źle widoczne, pojedyncze, położone ekscentrycznie	obfita (niski stosunek jądra do cytoplazmy), kontury cytoplazmy niewyraźne	delikatne wypustki cytoplazmatyczne widoczne w mikroskopie kontrastującym fazy lub elektronowym
Białaczkowa faza chłoniaka grudkowego	komórki szczylinowate (<i>cleft cells</i>)	średnicy nie-wiele większej od średnicy krwinki czerwonej (mniej-szej od limfocytów z PBL-B)	nie-jednorodna, gruboziarnista	brak lub trudno uchwytne, niekiedy dwa	skąpa, niewidoczna lub wąski rąbek	w jądrze jedna do dwu płytszych lub głębszych szczelin nadających mukancjaste kształty

Kombinacje co najmniej trzech z czterech powyżej przedstawionych markerów występują w ponad 80% klasycznych przypadków PBL-B i w 65% przypadków białaczki limfatyczno-prolimfocytarnej, ale w żadnym przypadku białaczki prolimfocytarnej [6].

Transformacja nowotworowa tak głęboko zaburza biologię komórek PBL-B, że w zasadzie nie można mówić o komórkach B, ale o hybrydach noszących zarówno markery komórek B, jak i T, łącznie z klonalną rearanżacją zarówno genów Ig, jak i genów receptora komórki T (*T cell receptor*, w skrócie TCR). Ponadto te hybrydowe komórki noszą jakkolwiek słabiej wyrażone antygeny wspólne dla całego układu leukocytów, jak np. antygen receptora białek adhezywnych (MAC-1 – CD 11b). Jest to gp 155/95 pełniąca czynność receptora dla fragmentu bi trzeciej składowej dopełniacza (R-C 3 bi). U osób zdrowych CD 11b charakteryzuje układ granulocytów-monocytów-makrofagów i natu-

ralne komórki cytotoksyczne (komórki NK) [33, 51, 70]. Wreszcie na powierzchni komórek PBL-B obserwowana jest ekspresja tzw. antygenów nowotworowych.

MARKERY KOMÓREK B WYSTĘPUJĄCE NA KOMÓRKACH PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

Do markerów komórek B występujących na komórkach PBL-B należą [9, 23, 60]:

1) wzmiankowana już monoklonalna warstwa powierzchniowych Ig (SIg), chociaż cząsteczki SIg są z rzadka rozrzucone na powierzchni białaczkowych komórek (do 9000 cząsteczek na komórce); są to najczęściej SIgM lub SIgM i SIgD, przy czym w przypadku ekspresji obu izotypów łańcuchów ciężkich cząsteczki IgM i IgD mają ten sam idiotyp;

2) klonalna rearanżacja genów Ig;

3) receptor dla erytrocytów myszy, chociaż u osób zdrowych występuje on tylko na małej subpopulacji komórek B (5–20% limfocytów krwi obwodowej);

4) antygen CD 21 (dawniejsza nazwa B 2), jest to białko – p 140 stanowiące receptor dla fragmentu d trzeciej składowej dopełniacza (R-C 3 d) i receptor dla wirusa Epstein-Barr, u osób zdrowych występuje on tylko na subpopulacji komórek B [33, 51];

5) ekspresja antygenów specyficznych dla wszystkich komórek B, ale różnych na komórkach o różnym stopniu dojrzałości lub komórkach będących w różnych stanach aktywności; do antygenów tych należą:

- antygeny DR i DC układu HLA,

- antygen CD 19 – gp 95 (dawniejsza nazwa B 4), występujący w bardzo wczesnym okresie różnicowania prawidłowej komórki B,

- antygen CD 20 – p 37/32 (dawniejsza nazwa B 1), sugeruje się, że jest to śródbłonowa struktura odgrywająca rolę w wewnątrzkomórkowym łańcuchu przemian Ca^{2+} [33],

- antygen CD 24 – gp 41/38? (dawniejsza nazwa BA-1), który poza komórkami B występuje także na komórkach linii granulocytów,

- omówiony wcześniej antygen CD 22 – gp 135;

6) antygeny aktywacji komórki B (*activation antigens*):

- antygen B 5 (ok. 90% badanych przypadków),

- antygen Blast-1,

- łańcuch beta receptora dla interleukiny-2 (CD 25 – gp 55), przy czym te dwa ostatnie markery wykryto w ok. 50% badanych przypadków PBL-B [21].

Z innych antygenów świadczących o aktywacji komórki B w przypadkach PBL-B, rzadziej opisywano ekspresję antygeny CD 23 – gp 45–50 (dawniejsza nazwa Blast-2) i receptora dla interferonu alfa [13]. Obecnie wyodrębniono dwa rodzaje mRNA CD 23. Jeden – Fc epsilon RIIa jest wytwarzany wyłącznie przez komórki B, podczas gdy drugi – Fc epsilon RIIb wykryto w liniach monocytów (choć nie w prawidłowych monocytach), liniach eozynofiliów i komórek T CD 23 dodatnich [33]. Fc epsilon RII jest uważany za receptor o niskim stopniu powinowactwa wobec IgE. Jego rola na komórkach B nie jest jeszcze wyjaśniona. Z molekuly CD 23 znajdującej się na powierzchni komórki mogą zostać odszczepione rozpuszczalne fragmenty, z których część zachowuje zdolność wiązania IgE i jest określana jako czynnik wiążący IgE (*IgE-binding factor*, w skrócie IgE-BF), lub rozpuszczalny CD 23 (*soluble CD 23*, w skrócie sCD 23) [47, 65]. Gordon i wsp. [26] sądzą, że CD 23 pełni rolę receptora dla niskocząsteczkowego czynnika wzrostu komórki B. Inni autorzy [64] sugerują, że odgrywa on ważną rolę w regulacji syntezy IgE u człowieka.

TABELA 3. Markery błony komórkowej limfocytów z przewlekłych białaczek limfatycznych B komórkowych (wg [6])

Marker komórkowy	Przewlekła białaczka limfatyczna	Białaczka prolimfocytarna	Białaczka włosiano-komórkowa	Faza białaczkowa niezmierniczych chłoniaków	Chłoniak śledzionowy z komórkami limfocytami	Białaczki plazmocytarne
	reakcja słaba	reakcja silna		umiarkowana	silna	ujemna
Powierzchniowe Ig	-	-/+	-/+	-	-	+ +
Cytoplazmatyczne Ig	-	-/+	-/+	-	-	+ +
Rozety z erytrocytami myszy	+ +	-	-/+	-/+	-/+	-
CD 5	+ +	-/+	-	-	+ +	-
CD 19, 20, 24	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
Klasa II HLA	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	-
CD 22 (FMC 7)	-/+	+ +	+ +	+ +	+ +	-
CD 10 (CALLA)*	-	-/+	-	-/+	-	-/+
CD 25	-	-	+ +	-	-/+	-
CD 38	-	-	-/+	-/+	-/+	+ +

Oznakowanie: (+ +) wskazuje, że marker występuje na 80–100% komórek w poszczególnych chłoniakach B-komórkowych, (+) – marker na 40–79% komórek, (-/+) – marker na 10–39% komórek, (-) – marker na 0–9% komórek.

Do nowotworów plazmocytarnych zaliczono: mielocytomatozę i białaczkę plazmocytną. Komórki makroglobulinemii Waldenstroma mają podobny fenotyp do nowotworów plazmocytnych, chociaż mają również niektóre cechy wspólne z białaczką prolimfocytarną, białaczką włosiano-komórkową i niezmiernymi chłoniakami (ekspresja FMC 7, CD 22 i niektórych antygenów komórki B).

* CALLA skrót od *common acute lymphoblastic leukaemia antigen* – odpowiadający enzymowi – obojętnej endopeptydazie (*neutral endopeptidase*) – znanemu także pod nazwą metalo-endopeptydazy lub encefaliny. W układzie limfo-, hemopoetycznym charakteryzuje prekursorowe komórki B oraz komórki centrów rozrodczych grudek chłonnych.

Swedeman i Thorley-Lawson [71] donieśli, że sCD 23 ułatwia autokrynowy wzrost zarówno limfocytów stansformowanych przez wirusa Epsteina-Barr, jak i pobudzonych prawidłowych limfocytów. Białaczkowe komórki nie mają natomiast ani antygenów wczesnych rozwojowo komórek B, takich jak obojętna endopeptydaza – CD 10 - gp 100 (dawniejsza nazwa CALLA) [46], ani antygenów całkowicie zróżnicowanych, sekrecyjnych komórek B, takich jak PCA-1 i CD 38 - p 45 [9].

MARKERY KOMÓREK T WYSTĘPUJĄCE NA KOMÓRKACH PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

Jeśli idzie o antygeny komórki T występujące na hybrydowych komórkach PBL-B, to:

- Powszechnie stwierdza się ekspresję omówionego już antygeny CD 5 - gp 67 [9, 21, 23, 24, 60].

- W ponad 20% przypadków PBL-B i w ok. 90% przypadków białaczki prolimfocytarnej [16, 31, 41] wykryto ekspresję antygeny CD 1c, z grupy kompleksu antygenów CD 1a - gp 49, CD 1b - gp 45, CD 1c - gp 43 [31, 51]. Jak się wydaje, geny kodujące grupę antygenów

CD 1 należą do nadrodziny genów immunoglobulinowych. Mają one strukturę podobną do struktury genów głównego układu zgodności tkankowej I klasy. W warunkach prawidłowych CD 1c występuje na: tymocytach części korowej grasicy, komórkach Langerhansa skóry, komórkach siateczki strefy T (*interdigitating reticulum cells*) i limfocytach B z mankietu otaczającego grudki chłonne I i II rzędu [16].

- W 5–20% przypadków obserwowano słabą, ale wyraźną ekspresję CD 2 (dawniejsze nazwy T 11, 9.6, 35.1) [9]. Jest to gp 50, z którą wiążą się dwa przeciwciała monoklonalne, względnie istnieje synergizm przeciwciał CD 2 i LFA-3 (*lymphocyte function associated antigen* – CD 58). LFA-3 do niedawna był uważany za antygen receptora dla krwinek czerwonych barana. W istocie pośredniczy on przyleganiu limfocytów T do ich partnerów komórkowych, a następnie odgrywa rolę w transdukcji sygnałów do wnętrza komórki, w czego wyniku dochodzi do aktywacji limfocytów T [43] (analogicznie jak omówiony już CD 22). Wykazano, że w łańcuchu wewnątrzkomórkowych sygnałów zainicjowanych aktywacją molekule CD 2 uczestniczy białko G oraz że istnieją powiązania czynnościowe między CD 2 a innymi molekułami błony komórkowej, takimi jak CD 44 (antygen leukocytów, mózgu i krwinek czerwonych) i CD 45 (antygen leukocytów). Związek czynnościowy między CD 2 i CD 45 może zostać wyjaśniony tym, że CD 45 na powierzchni ludzkich limfocytów T jest związany fizycznie z CD 2 [66], a ponadto jego wewnątrzkomórkowa domena ma aktywność kinazy tyrozynowej [74]. Sugeruje się istnienie epitopu CD 2, który pełni czynność pierwotnego receptora rozpoznawczego i który ujawnia się dopiero po aktywacji komórek T (CD 2R naturalnych komórek cytotoksycznych) [33]. Ekspresja CD 2 na białaczkowych komórkach B wyjaśnia, dlaczego w warunkach *in vitro* mogą one zostać pobudzone do tworzenia rozet z erytrocytami barana.

- W około 20% przypadków występuje ekspresja antygeny CD 3 (dawniejsze nazwy T 3, Leu 4) [24]. Ekspresja CD 3 jest szczególnie intrygująca, ponieważ jest to kompleks (5 łańcuchów) gp/p 26, 20, 16 [33] odpowiadający łańcuchom polipeptydowym części TCR (patrz dalej). Co więcej, aby krzyżowo związany z obcym antygenem receptor adhezji CD 2 mógł przekazać odpowiedni sygnał do wnętrza komórki, konieczny jest jego związek z receptorem CD 3 [67].

- Stosunkowo często białaczkowe komórki PBL-B wykazują obecność antygeny CD 6 (dawniejsze nazwy T 12, T 411) [9]. Jest to gp 100 występująca na większości prawidłowych komórek T i subpopulacji komórek B.

- W niektórych przypadkach PBL-B opisywano ekspresję antygenów CD 4 - gp 59 (dawniejsza nazwa T 4) i CD 8 - gp 32 (dawniejsza nazwa T 8) [9]. Antygeny CD 4 i CD 8 są markerami odpowiednio: pomocniczych komórek T i cytotoksycznych, supresorowych komórek T. Sugeruje się istnienie co najmniej 24 różnych epitopów molekule CD 4. Przeciwciała monoklonalne anty CD 4 interferują z klasą II antygenów głównego układu zgodności tkankowej, a także ze zdolnością komórek CD 4 dodatnich do wiązania wirusa nabytego braku odporności (HIV) (CD 4 jest receptorem HIV) [33]. Molekuła CD 8 występuje albo jako heterodimer złożony z łańcuchów alfa i beta TCR, albo jako homodimer alfa, alfa [33]. Jak się wydaje, CD 4, CD 8, CD 2 i niedawno odkryta molekuła CD 45 tworzą kompleks regulujący aktywację komórki T poprzez fosforylację i defosforylację kinazy tyrozynowej [67].

- Ponadto na białaczkowych komórkach wykryto antygen TQ 1 [52 a]. Antygen TQ 1 jest antygenem wszystkich ludzkich leukocytów (*pan-leukocyte antigen*). Jego występowanie lub brak identyfikują jedną z dwu subpopulacji limfocytów T CD 4 dodatnich (limfocyty

T CD 4⁺ TQ⁺ i limfocyty T CD 4⁺ TQ⁻). Prawie wszystkie komórki TQ⁻ pełnią czynności pomocnicze wobec komórek B ułatwiając im syntezę IgG i IgM. Natomiast komórki TQ 1⁺ hamują syntezę IgG wywołaną mitogenem szkarłatki [32] i są określane jako komórki T CD 4⁺, ale indukujące supresję [52 a]. Supresyjne działanie komórek TQ 1⁺ jest zgodne z odkryciem, że w miejscach nieaktywnych mitotycznie, takich jak okolice podkorowe i międzygrudkowe węzłów chłonnych, znajdują się komórki T - TQ⁺, podczas gdy w centrach rozrodczych grudek chłonnych, które są miejscem proliferacji komórek B, znajdują się komórki T - TQ⁻ [30]. Być może subpopulacja komórek CD 4⁺ i TQ⁺ jest identyczna z subpopulacją komórek induktorowo-supresorowych noszących antygen CD 45R (CD 45R jest glikoproteiną 220 wszystkich leukocytów i m.in. pozwala na zróżnicowanie między subpopulacją komórek induktorowo-supresorowych, a subpopulacją induktorowo-pomocniczą) [45]. Wracając do antygeny TQ 1, to Camerini i wsp. [10] uważają go za odpowiednik mysiego receptora zadowomienia (*homing receptor*) – Mel-14. Mel-14, a także ludzki antygen zadowomienia (*homing-associated antigen*) [15] są odpowiedzialne za adhezję zwłaszcza dojrzałych limfocytów T i B krwi obwodowej do wyspecjalizowanych śródbłonek postkapilarnych żyłek w węzłach chłonnych. Stąd przez ścianę naczyniową limfocyty migrują do otaczających tkanek limfoidalnych lub ogniska zapalnego. Ponadto Camerini i wsp. [10] wykazali, że TQ 1 może występować zarówno w postaci konwencjonalnej, jak i w formie związanej z fosfolipidami, co być może wiąże się ze zrzucaniem antygeny przez uaktywnioną komórkę zadowomioną w węzle chłonnym. Jak się wydaje, występowanie antygeny TQ 1 na białaczkowych komórkach B wiąże się z ich akumulacją w tkankach. Nie jest wykluczone, że ekspresja tego antygeny jest odpowiedzialna za obserwowane przez Kunicką i Platsoucas [37] hamowanie przez komórki B pochodzące od ok. 35% chorych z PBL-B, procesu syntezy Ig w prawidłowych limfocytach B w warunkach mieszanej hodowli z komórkami pomocniczymi.

● Występowanie markerów komórki T na białaczkowych komórkach PBL-B zostało potwierdzone wykryciem obok klonalnej rearanżacji genów Ig również klonalnej rearanżacji genów TCR.

BUDOWA RECEPTORA KOMÓRKI T

TCR ma złożoną strukturę, przypominającą strukturę Ig, i składa się z szeregu podjednostek, które warunkują pełnienie co najmniej dwu czynności:

- ◇ pierwszej polegającej na rozpoznaniu specyficznego antygeny,
- ◇ drugiej, która ujawnia się po związaniu antygeny i polega na przesłaniu biochemicznego sygnału do wnętrza komórki, co warunkuje wystąpienie odpowiedzi immunologicznej komórek T.

Podjednostki składające się na TCR podzielono na dwie grupy.

◆ Pierwszą – tzw. Ti – stanowią komponenty rozpoznające swoisty antygen. Należą tutaj łańcuchy alfa i beta tworzące heterodimer. Powstają one podobnie jak Ig dzięki rearanżacji genów VDJ i mają charakter klonalny. Ekspresja łańcuchów alfa i beta występuje na powierzchni większości limfocytów T krwi obwodowej.

◆ Do drugiej grupy – tzw. kompleksu CD 3 – należą komponenty odgrywające rolę w transdukcji sygnałów. Mianowicie związanie kompleksu CD 3 przez antygen inicjuje kaskadę wewnątrzkomórkowych sygnałów, takich jak: hydroliza fosfoinozytolu, uruchomienie Ca²⁺ i aktywacja kinazy białkowej C [67]. Na kompleks CD 3 składają się łańcuchy

gamma, delta i epsilon oraz związane z nimi podjednostki dzeta i eta [5, 12]. Łańcuchy gamma, delta i epsilon nie mają charakteru klonalnego. Ekspresję łańcuchów gamma i delta obserwowano tylko w małej subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, tymocytach i dendrytycznych komórkach naskórka. Tak więc TCR składa się co najmniej z ośmiu łańcuchów. Są to: łańcuchy alfa, beta, gamma, delta, epsilon i dwa łańcuchy dzeta [76, 77] oraz łańcuch eta.

Jednakże sam kompleks CD 3 nie jest wystarczający dla pełnej aktywacji komórki T. W celu zapoczątkowania aktywacji komórki T lub rozszerzenia się jej, konieczne są jeszcze sygnały pochodzące z innych molekuł powierzchni komórki. Przypuszcza się, że ponad 15 powierzchniowych molekuł odgrywa taką rolę w pełnej aktywacji komórki T. Tak więc kompleks CD 3 współdziała w transdukcji sygnałów ze wzmiankowanym już wcześniej kompleksem CD 2. Niekowalენტne powiązania występują także między kompleksem CD 3 a CD 4 i CD 8 [8]. Szereg tych molekuł (CD 5, CD 28) jest raczej specyficznych dla komórek T, podczas gdy inne nie mają tej specyficzności (CD 43, CD 45). Istnieje więc stały mechanizm uzupełniającego się działania między poszczególnymi parami niekompletnych sygnałów wysyłanych przez CD 2, CD 3, CD 5, CD 27 i CD 28 [67].

Łańcuchy alfa, beta i gamma są kodowane przez cztery odrębne loci, analogiczne do loci łańcuchów ciężkich Ig, a mianowicie: dla części zmiennej (V), superzmiennej (D), łączącej (J) i stałej (C). Istnieje także hierarchia procesów rearanżacji genów TCR. Jako pierwsze ulegają rearanżacji geny kodujące łańcuch gamma, następnie beta i na końcu alfa [14, 36, 63].

KLONALNA REARANŻACJA GENÓW RECEPTORA KOMÓRKI T W PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZCE LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

Rearanżacja genów łańcucha alfa TCR na ogół nie była badana, ponieważ jej wykrycie wiąże się z szeregiem trudności technicznych [4, 78]. Dopiero ostatnio Pachmann i wsp. [50] wykazali, że rearanżacja i ekspresja genów łańcucha alfa jest częsta w PBL-B. Autorzy ci wykryli ekspresję mRNA łańcucha alfa TCR w ok. 78% badanych prób (w 14 na 18 badanych), podczas gdy ekspresja mRNA łańcucha beta TCR występowała w ok. 44% (w 7 na 16 badanych). Co więcej stwierdzili oni okrojenie mRNA łańcucha alfa.

Rearanżację genów łańcucha beta uznano za przydatną do badań linii komórkowych i monoklonalności w diagnozowaniu chorób limfoproliferacyjnych. Większość monoklonalnych proliferacji T komórkowych wykazuje rearanżację genów beta i gamma [22, 27, 28, 36, 42, 49]. Monoklonalną rearanżację genów łańcucha beta TCR wykryto niespodziewanie również w 10% do 30% nowotworów wychodzących z prekursorowych lub bardziej dojrzałych komórek B [27, 42]. Badania te podważają specyficzność rearanżacji łańcuchów beta, jako markera komórki T. Ponieważ jednak białaczkowe komórki odpowiadają klonalnej ekspansji zablokowanego w różnicowaniu ich prawidłowego odpowiednika komórkowego, ta niewłaściwa rearanżacja genów TCR zwiększa możliwości badawcze klonalnego pochodzenia białaczek B komórkowych, a także mechanizmów kontrolujących regulację rearanżacji genów Ig i TCR podczas ontogenezy limfocytów B.

Norton i wsp. [48] w grupie 59 chorych z PBL-B u czterech chorych (7%) (przy czym u jednego była to klasyczna PBL-B, a u trzech pozostałych białaczka prolimfocytarna) stwierdzili rearanżację genów łańcucha beta przy współistniejącej rearanżacji łańcuchów ciężkich i lekkich Ig typowej dla proliferacji wychodzących z komórek B. Również inni

autorzy [2, 27, 42, 78] donosili, że w około 10% przypadków PBL-B występuje rearanżacja genów beta TCR. Nigdy jednak nie obserwowano rearanżacji łańcucha gamma w komórkach B w PBL [2, 3, 11, 14, 48, 49]. Ten brak koincydencji między rearanżacją genów łańcucha beta TCR i genów łańcucha gamma TCR ma być zdaniem Nortona i wsp. [48] charakterystyczny dla PBL-B.

Niedawno jednak opisano przypadek PBL-B z rearanżacją genów łańcuchów alfa, beta i gamma TCR, obok rearanżacji genów łańcuchów Ig M i kappa [53]. Donoszono także [73] o rearanżacji genów łańcucha delta TCR w chłoniakach B komórkowych o niskim stopniu złośliwości (chłoniaki limfocytarne, centrocytarne i centroblastyczno-centrocytarne typu grudkowego).

"ANTYGENY NOWOTWOROWE" KOMÓREK B Z PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZKI LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

Do tzw. "antygenów nowotworowych" komórek PBL-B należą:

- powszechny antygen przewlekłej białaczki limfaticznej (*common chronic lymphocytic leukemia antigen*, w skrócie cCLLa) – gp 69 (1), obecnie uzyskano swoiste monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw temu antygenowi, które wybiórczo znakują nowotworowe komórki chorych z PBL-B (nawet w okresie przedklinicznym), a także chorych z wariantami PBL-B, jak np. białaczka włosiano-komórkowa i prolimfocytarne [18, 19];
- antygen jąderkowy ludzkich chłoniaków B komórkowych (*human malignancy nucleolar antigen*) [20].

NIEPRAWIDŁOWOŚCI KOMÓREK T W PRZEWLEKŁEJ BIAŁACZCE LIMFATYCZNEJ B KOMÓRKOWEJ

Na ogół uważa się, że limfocyty T w PBL-B nie są potomstwem stransformowanej komórki prekursorowej, która byłaby wspólna dla limfocytów B i T i nie należą do białaczkowego klonu. Niemniej jednak w PBL-B występuje szereg nieprawidłowości komórek T. Nieprawidłowości te były już omawiane w innej naszej pracy przeglądowej [60] i tutaj tylko krótko o nich wspomnimy. Dotyczą one:

- ◊ istotnego obniżenia odsetkowych wartości komórek T we krwi obwodowej, chociaż ich bezwzględna liczba prawidłowa lub zwiększona [56, 59];
- ◊ zwiększenia bezwzględnej liczby "aktywnych", "czynnościowych" komórek T (komórki HLA-DR⁺) [75];
- ◊ obniżonej i opóźnionej odpowiedzi mitotycznej komórek T "in vitro" na lektyny lub komórki allogeniczne w mieszanej hodowli [62];
- ◊ odsetkowej przewagi we krwi obwodowej komórek T supresorowych (CD 8⁺) nad komórkami T pomocniczymi (CD 4⁺) [56, 72] (prawidłowy stosunek komórek CD 4⁺ do CD 8⁺ we krwi obwodowej wynosi jak 2 : 1); jednakże zdaniem Töttermana i wsp. [75] w obu subpopulacjach (w tym także w subpopulacji CD 4⁺) wzrasta bezwzględna liczba komórek "aktywnych" (HLA-DR⁺); ponadto w subpopulacji CD 8⁺ ulega zwiększeniu ilość komórek supresorowo-efektorowych (komórki CD 11 b⁺); ostatnio Briggs i wsp. [7] wykazali u chorych z PBL-B znamienne wyższy odsetek komórek induktorowo-supreso-

rowych (komórki CD 45R⁺) i to zarówno w subpopulacji CD 4⁺, jak i CD 8⁺; co więcej autorzy ci podają, że w bardziej zaawansowanych okresach choroby wzrasta także liczba komórek CD 4⁺, poza tym że wzrasta liczba komórek T (komórki CD 3⁺);

◊ w naciekach białaczkowych w szpiku i w węzłach chłonnych występuje odsetkowa przewaga komórek CD 4⁺ nad komórkami CD 8⁺ [72] (prawidłowy stosunek komórek CD 4⁺ do CD 8⁺ w szpiku wynosi jak 1 : 3).

Być może z zaburzeniami ilościowymi komórek T, a także z nieprawidłowymi stosunkami komórek pomocniczych do supresorowych we krwi obwodowej i tkankach wiążą się zaburzenia czynności immunoregulacyjnych komórek T u chorych z PBL-B. Zaburzenia te według jednych autorów dotyczą zwiększonej aktywności supresorowych komórek T i jak się wydaje, są jedną z przyczyn bloku na drodze dojrzewania komórek B do komórek wytwarzających Ig. Następstwem takiego bloku byłyby dość częsta w tej chorobie hypogammaglobulinemia. Natomiast inni autorzy [cyt. wg 38] podają, że limfocyty T pochodzące od niektórych pacjentów z PBL-B wykazują in vitro defektywną czynność pomocniczą w procesie dojrzewania prawidłowych komórek B do komórek sekrecyjnych. Tötterman i wsp. [75] stwierdzili, że stymulowane estrem forbolu, który należy do induktorów zależnych od komórki T (*T-cell-dependent inducer*), komórki pochodzące od chorych z PBL-B mają zdolność wytwarzania IgM. Co więcej komórki B chorych w zaawansowanym okresie choroby (okresy II do IV wg klasyfikacji Rai i wsp.) wytwarzają znacznie większe ilości IgM w porównaniu z komórkami pochodzącymi od chorych we wczesnych okresach choroby (okresy od 0 do I wg klasyfikacji Rai i wsp.).

Pomimo przewagi komórek supresorowych we krwi obwodowej niektórych autorzy [56] stwierdzili znamienne obniżoną aktywność naturalnych cytotoksycznych komórek T, z czym mogłaby się wiązać zwiększona zapadalność tych chorych na inne nowotwory, podatność na zakażenia wirusowe, a także choroby autoimmunizacyjne. Natomiast Tötterman i wsp. [75] podają, że u chorych z PBL-B bezwzględna liczba komórek "podobnych" (*like*) do naturalnych komórek cytotoksycznych (komórki CD 16⁺) i ich "aktywnych" odpowiedników (komórki HLA-DR⁺, CD 16⁺) jest wyższa niż u osób zdrowych.

Z innych nieprawidłowości komórek T występujących w PBL-B należy wymienić brak jej lub obniżoną ekspresję antygenów kompleksu CD 3 [40], który jak to już wcześniej powiedziano, odpowiada kompleksowi łańcuchów polipeptydowych receptora komórki T. Co więcej komórki T CD 3 ujemne nie reagują z monoklonalnymi przeciwciałami, takimi jak: anty-CD 2, anty-CD 4, anty-CD 8, anty-CD 1, o których już była mowa, a także z przeciwciałem anty-T 9 (T 9 jest antygenem receptora dla transferyny i charakteryzuje proliferujące komórki) i anty-CD 38 (CD 38 występuje na tymocytach części korowej grasicy, aktywnych komórkach T i plazmocytach) [40]. Kontrowersyjnie Briggs i wsp. [7] stwierdzili u chorych z PBL-B w bardziej zaawansowanych okresach choroby (okres II lub powyżej wg klasyfikacji Rai i wsp.) wyższą bezwzględną liczbę komórek CD 3⁺ niż u chorych z mniej zaawansowanym schorzeniem (okresy 0 i I wg klasyfikacji Rai i wsp.).

Nieprawidłowości komórek T w PBL-B znajdują uzasadnienie w nieprawidłowej rearanżacji genów dla łańcucha gamma TCR. Leber i wsp. [39] wykryli w komórkach T chorych z PBL-B wybiórczą przewagę rearanżacji rejonu V genu gamma. Autorzy przypuszczają, że nieprawidłowości związane z rearanżacją genu gamma TCR istnieją już na

szczeblu tymocytów i prowadzą do zaburzeń w ich dojrzewaniu, czego następstwem są obserwowane w PBL-B nieprawidłowości komórek T.

Shinohara i wsp. [68] opublikowali przypadek PBL-B, w którym przedstawili pośrednie dowody wskazujące na istnienie takiej samej aberracji chromosomowej zarówno w białaczkowych komórkach B, jak i w "prawidłowych" komórkach T. Był to 41-letni Japończyk z bezwzględną liczbą limfocytów we krwi obwodowej $13 \times 10^9/l$, o fenotypie białaczkowych komórek SIgM⁺. Chory wcześniej nie otrzymywał leczenia. W przypadku tym obok innych zmian w kariotypie występowała charakterystyczna dla PBL-B translokacja t(11;14)(q13;q32). Te same aberracje chromosomowe obserwowano w hodowlach komórek stymulowanych trzema różnymi mitogenami: fitohemaglutyniną (PHA), mitogenem szkarłatki (PWM) i wirusem Epsteina-Barr (EBV), który jest uważany za swoisty mitogen komórek B. Częstość aberracji w hodowli stymulowanej PHA wynosiła 50%, PWM – 13%, a EBV – 100%. Powszechnie przyjmuje się, że u chorych z PBL-B białaczkowe komórki stymulowane PHA dzielą się dopiero w piątym lub szóstym dniu hodowli. Wyniki badań Shinohara i współpracowników różniły się co najmniej w dwu punktach od tego poglądu. Po pierwsze, metafazy występowały w trzecim dniu hodowli, a po drugie częstość aberracji chromosomowych była wysoka (50%). Wyniki te sugerują występowanie aberracji chromosomowych także w komórkach T i pozwalają na wysnucie hipotezy, że transformacja nowotworowa miała miejsce na szczeblu komórki prekursorowej wspólnie dla limfocytów T i B. Koncepcja, że przynajmniej niektóre przypadki PBL-B pochodzą z takiej wspólnej komórki, była także wcześniej wysuwana przez jedną z autorek [60].

Nasze obserwacje przypadku PBL-B prowadzone w latach 1980–1984 są bardzo zbieżne z obserwacjami Shinohara i wsp. [68]. Był to 52-letni mężczyzna (chory H. J, z pracy [61]), który po 4 latach od ustalenia rozpoznania zmarł wskutek progresji białaczki i anergii (bezpośrednią przyczyną zgonu była posocznica). W czasie początkowych badań chory nie otrzymywał leczenia i był w I okresie klinicznym wg klasyfikacji Rai i wsp. Bezwzględna liczba limfocytów we krwi obwodowej wynosiła $13 \times 10^9/l$, białaczkowe komórki nosiły SIgM, ale aż 62% ($7 \times 10^9/l$) limfocytów krwi obwodowej tworzyło rozety z erytrocytami barana. W nierozdzielonej hodowli limfocytów krwi obwodowej (limfocyty B i T) po stymulacji PHA już w trzecim dniu hodowli indeks odpowiedzi blastycznej na mitogen był stosunkowo wysoki i wynosił 20%, zaś w 50% analizowanych metafaz wykryto aneuploidię o liczbie modalnej 45 i 47, przy czym ubytki i naddatki występowały w grupie C. W naszym przypadku PHA stymulowała proliferację komórek T, ponieważ indeks transformacji blastycznej samych komórek T był wyższy niż w mieszaninie nie rozdzielonych komórek B i T i wynosił 60%.

Na końcu należałoby rozważyć różnice między PBL-B a łagodną monoklonalną limfocytosą B-komórkową. Garcia i wsp. [25] przeprowadzili takie porównania. Autorzy ci stwierdzili, że:

- w PBL-B bezwzględna liczba limfocytów jest znamienne wyższa niż w postaci łagodnej,

- w PBL-B komórką, w której zachodzi złośliwa transformacja, jest komórka młodsza w linii różnicowania od bardziej dojrzałej komórki z postaci łagodnej (komórki PBL-B charakteryzuje znacznie silniejsza ekspresja antygenów CD 21, CD 22, CD 25 i CD 35),

● w PBL-B występują w znacznie większym stopniu nieprawidłowości immunoregulacyjnych i cytotoksycznych komórek T niż w łagodnej monoklonalnej limfocytzie B komórkowej.

LITERATURA

- [1] AGEE JF, GARVER FA, FAGUET GB. An antigen common to chronic lymphocytic and hairy cell leukemia cells not shared by normal lymphocytes nor by other leukemic cells. *Blood* 1986; **68**: 62–68.
- [2] AISENBERG AC, WILKES BM, JACOBSON JO. Rearrangement of the genes for the beta and gamma chains of the T cell receptor is rarely observed in adult B cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1209–1214.
- [3] ASOU N, MATSUOKA M, HATTORI T, KAWANO F, MAEDA S, SHIMADA K, TAKATSUKI K. T cell gamma gene rearrangement in hematologic neoplasmas. *Blood* 1987; **69**: 968–970.
- [4] BAER R, LEFRANC MP, MINOWADA J, FORSTER A, STINSON MA, RABBITTS TH. Organisation of the T cell receptor alpha chain gene and rearrangement in human T cell leukaemias. *Mol Biol Med* 1986; **3**: 265–278.
- [5] BANIYASH M, GRACIA-MORALES P, BONIFACINO JS, SAMELSON LE, KLAUSNER RD. Disulfide linkage of the zeta and eta chains of T cell receptor: Possible identification of two structural classes of receptors. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9874–9878.
- [6] BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DAG, GRALNICK HR, SULTAN C. The French-American-British (FAB) Cooperative Group: Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989; **42**: 567–584.
- [7] BRIGGS PG, KRAFT N, ATKINS RC. T cells and CD45R expression in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1990; **14**: 155–159.
- [8] BROWN MH, CANTRELL DA, BRATTSAND G, GRUMPTON MJ, GULBERG M. The CD 2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD 3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* 1989; **339**: 551–553.
- [9] CALIGARIS-CAPPIO F. B-lymphoproliferations and normal B-cell differentiation. [w] B Lymphocytes in Human Disease. G Bird, JE Calvert [red.] Oxford-New York-Tokyo, Oxford University Press 1988: 321–353.
- [10] CAMERINI D, JAMES SP, STAMENKOVIC I, SEED B. Leu-8/TQ 1 is the human equivalent of the Mel-14 lymph node homing receptor. *Nature* 1989; **342**: 78–82.
- [11] CHEN Z, DePASLIER D, DAUSSET J, DEGOS L, FLANDRIN G, COHEN D, SIGAUX F. Human T cell gamma genes are frequently rearranged in B lineage acute lymphoblastic leukemias but not in chronic B cell proliferations. *J Exp Med* 1987; **165**: 1000–1015.
- [12] CLEVERS H, ALARCON B, WISEMAN T, TERHORST CA. The T cell receptor/CD 3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 1988 (108 ref); **6**: 629–662.
- [13] DAMARZ R, CAWLEY JC. Heterogeneity of CLL: High CD 23 antigen and alpha-IFN receptor expression are features of favourable disease and of cell activation. *Br J Haematol* 1988; **68**: 279–282.
- [14] DAVEY MP, BONGIOVANNI KF, KAULFERSCH W, QUERTERMOUS T, SEIDMAN JG, HERSHFIELD MS, KURTZBERG J, HAYNES BF, DAVIS MM, WALDMAN TA. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement and expression in human lymphoid leukaemia cells at different stages of maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 8759–8763.
- [15] de los TOYOS J, JALKANEN S, BUTCHER BC. Flow cytometric analysis of the Hermes homing-associated antigen on human lymphocyte subsets. *Blood* 1989; **74**: 751–760.
- [16] DELIA D, CATTORETTI G, POLLI N, FONTANELLA E, AIELLO A, GIARDINI R, RILKE F, PORTA GD. CE 1 c but neither CD 1 a nor CD 1 b molecules are expressed on normal, activated, and malignant human B cells: Identification of a new B-cell subset. *Blood* 1988; **72**: 241–247.
- [17] DÖRKEN B, MOLDENHAUER G, PEZZUTTO A, SCHWARTZ R, FELLER A, KIESEL S, NADLER IM. HD 39(B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J Immunol* 1986; **136**: 4470–4479.
- [18] FAGUET GB, AGEE JF. Monoclonal antibodies against the chronic lymphatic leukemia antigen, cLLa: Characterization and reactivity. *Blood* 1987; **70**: 437–443.

- [19] FAGUET GB, AGEE JF. Immunophenotypic diagnosis of clinical and preclinical chronic lymphatic leukemia by using monoclonal antibodies against the cCLLa, a CLL-associated antigen. *Blood* 1988; 72: 679-684.
- [20] FORD RJ, CRAMER M, DAVIS FM. Identification of human lymphoma cells by antisera to malignancy associated nucleolar antigens. *Blood* 1984; 63: 559-565.
- [21] FREEDMAN AS, NADLER LM. B cell development in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 230-239.
- [22] FURLEY AJ, MIZUTANI S, WEILBAECHER K, DHALI WAL HS, FORD AM, CHAN LC, MOLGAARD HV, TOYONAGA B, MAK T, van den ELSEN P, GOLD D, TERHORST C, GREAVES MF. Developmentally regulated rearrangement and expression of genes encoding the T cell receptor-T3 complex. *Cell* 1986; 46: 75-87.
- [23] GALE RP, FOON KA. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1987; 24: 209-229.
- [24] GALE RP, RAI KR. New insights into a chronic lymphocytic leukemia. 1987; 1: 677-679.
- [25] GARCIA C, ROSÉN A, KIMBY E, AGUILAR-SANTELISES M, JONDAL M, BJÖRKHILM M, HOLM G, MELLSTEDT H. Higher T-cell imbalance and growth factor receptor expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) as compared to monoclonal B-cell lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). *Leuk Res* 1989; 13: 31-37.
- [26] GORDON J, WEBB AJ, WALKER L, GUY GR, ROWE M. Evidence for an association between CD 23 and the receptor for a low molecular weight B cell growth factor. *Eur J Immunol* 1986; 16: 1627-1630.
- [27] GREAVES MF, MIZUTANI S, FURLEY AJW, SUTHERLAND DR, CHAN LC, FORD AM, MOLGAARD HV. Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukaemia. *Clinics Haematol* 1986; 15: 621-639.
- [28] GREENBERG JM, QUERTERMOUS T, SEIDMAN JG, KERSEY JH. Human T cell gamma-chain gene rearrangements in acute lymphoid and non-lymphoid leukaemia: Comparison with the T cell receptor beta-chain gene. *J Immunol* 1986; 137: 2043-2049.
- [29] HAN T, OZER H, GAVIGAN M, GAJERA R, MINOVADA J, BLOOM ML, SADAMORI N, SANDBERG AA, GOMEZ GA, HENDERSON ES. Benign monoclonal B-cell lymphocytosis - A benign variant of CLL: clinical, immunologic and cytogenetic studies in 20 patients. *Blood* 1984; 64: 244-252.
- [30] HSU S-M, JAFFE ES. Phenotypic expression of human T lymphocytes in thymus and peripheral lymphoid tissues. *Am J Pathol* 1989; 121: 69-78.
- [31] JONES RA, MASTER PS, CHILD JA, ROBERTS BE, SCOTT CS. Diagnostic differentiation of chronic B-cell malignancies using monoclonal antibody L 161 (CD1c). *Br J Haematol* 1989; 71: 43-46.
- [32] KANOF ME, STROBER W, JAMES SP. Induction of CD 4 suppressor T cells with anti-Leu-8 antibody. *J Immunol* 1987; 139: 49-54.
- [33] KNAPP W, RIEBER P, DÖRKEN B, SCHMIDT RE, STEIN H, van den BORNE AEGKr. Towards a better definition of human leukocyte surface molecules. *Immunology Today* 1989; 10: 253-258.
- [34] KOWAL M. Czy istnieje heterogenność cytologiczna i immunologiczna przewlekłych białaczek limfatycznych B-komórkowych? Praca na stopień doktora nauk medycznych 1987.
- [35] KOWAL M, RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, BARAN E. Heterogenność fenotypowa przewlekłej białaczki limfatycznej. Materiały z V Zjazdu Polskiego Towarzystwa Immunologicznego. Zakopane 15-18 październik 1986. *Immunol Pol* 1986; 11: 287-288 (Abstract).
- [36] KRONBERG M, SIU G, HOOD LE, SHASTRI N. The molecular genetics of the T cell antigen receptor and T cell antigen recognition. *Ann Rev Immunol* 1986; 4: 529-591.
- [37] KUNICKA J, PLATSOUÇAS CD. Leukaemic B cells from patients with chronic lymphocytic leukaemia suppress immunoglobulin production by lymphocytes from normal donors. *Scand J Immunol* 1988; 28: 1-10.
- [38] KUNICKA JE, PLATSOUÇAS CD. Defective helper function of purified T4 cells and excessive suppressor activity of purified T8 cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. T4 suppressor effector cells are present in certain patients. *Blood* 1988; 71: 1551-1560.
- [39] LEBER BF, MURPHY JJ, NORTON JD. Abnormalities in T-cell associated rearrangement of T-cell receptor gamma chain genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1989; 13: 259-266.
- [40] MATUTES E, WECHSLER A, GOMEZ, CHERCHI M, CATOVSKY D. An unusual T-cell phenotype in advanced B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1981; 49: 635-642.
- [41] MERLE-BERAL H, BOUMSELL L, MICHEL A, DEBRE P. CD 1 expression on B-CLL lymphocytes. *Br J Haematol* 1989; 71: 209-212.
- [42] MINDEN MD, MAK TW. Review: The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells. *Blood* 1986; 68: 327-336.

- [43] MOINGEON P, CHANG H-Ch, WALLNER BP, STEBBINS Ch, FREY AZ, REINHERZ EL. CD 2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989; **339**: 312-314.
- [44] MONTERRAT E, ROZMAN C. Bone marrow biopsy in chronic lymphocytic leukemia: A review of its prognostic importance. *Blood Cells* 1987; **12**: 315-326.
- [45] MORIMOTO C, LETVIN NL, DISTASO JA, ALDRICH WR, SCHLOSSMAN SF. The isolation and characterisation of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; **134**: 1508-1515.
- [46] NADLER LM. B cell/leukemia panel workshop: Summary and comments, in human B lymphocytes. [w] "Leukocyte Typing II", EL Reinherz, BF Haynes, LM Nadler i inni (red.) New York, Springer-Verlag 1986; **2**: 1-43.
- [47] NAKAJIMA T, SARFATI M, DELSPESSE G. Relationship between human Ig-E binding factors (IgE-BF) and lymphocyte receptors for IgE. *J Immunol* 1987; **139**: 848-854.
- [48] NORTON JD, PATTINSON J, HOFFBRAND AV, JANI H, YAXLEY JC, LEBER BF. Rearrangement and expression of T cell antigen receptor genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1988; **71**: 178-185.
- [49] O'CONNOR NTJ, WEATHERAL DJ, FELLER AC, JONES D, PALLESEN G, STEIN H, WAINSCOAT JS, GATTER KG, ISAACSON P, LENNERT K, RAMSEY A, WRIGHT DH, MASON DY. Rearrangement of the T cell receptor beta chain in the diagnosis of lymphoproliferative disorders. *Lancet* 1985; **1**: 1295-1297.
- [50] PACHMANN K, RAGHAVACHAR A, BARTRAM C, EMMERICH B, THIEL E, ZIEGLER-HEITBROCK HWL. T cell receptor alpha expression in B-type chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1989; **3**: 497-500.
- [51] PALLESEN G, PLESNER T. The Third International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens with an up-to-date overview of the CD nomenclature. *Leukemia* 1987; **1**: 231-234.
- [52] PANGALIS GA, ROUSSOU PA, KITTAS C, KOKKINOUS S, FESSAS P. B-chronic lymphocytic leukaemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients experience from a single hematology unit. *Cancer* 1987; **69**: 767-771.
- [52a] PATRICK CW, LIBNOCH JA, MILSON T, KORTRIGHT KH, KELLER RH. Common variant of B cell chronic lymphocytic leukemia is defined by the monoclonal antibody TQ 1 (Abstract). *Blood* 1984; **64**: 195.
- [53] PERL A, Di VINCENZO JP, RYAN DH, GERGELY P, SZIGETI A, FEHER J, ABRAHAM GN. Rearrangement of the T-cell receptor alpha, beta and gamma chain genes in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1990; **14**: 131-137.
- [54] PEZZUTTO A, DORKEN B, MOLDENHAUER G, CLARK EA. Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD 22, Bp 130/140. *J Immunol* 1987; **138**: 98-103.
- [55] PEZZUTTO A, RABINOVITCH PS, DÖRKEN B, MOLDENHAUER G, CLARK EA. Role of the CD 22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin. *J Immunol* 1988; **140**: 1791-1795.
- [56] PLATSOUKAS CD, FERNANDES G, GUPTA SL, KEMPIN S, CLARKSON B, GOOD RA, GUPTA S. Defective spontaneous and antibody-dependent cytotoxicity mediated by E-rosette-positive and E-rosette-negative cells in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: Augmentation by "in vitro" treatment with interferon. *J Immunol* 1980; **125**: 1216-1223.
- [57] ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, RUPNIEWSKA ZM, KUROWSKA M, KULIG A, WELCZ B, GÓRSKI G, WOJCIEROWSKI J. Interindividual phenotypic variations in CLL lymphocytes: Indication of different maturation blocks. *Acta Antropogenetica* 1985; **9**: 48-62.
- [58] ROŻYŃKOWA D, RUPNIEWSKA ZM, ANTOSZ H. Different maturation capabilities of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes "in vitro". *Cytobiosis* 1986; **48**: 31-37.
- [59] ROŻYŃKOWA D, RUPNIEWSKA Z, STĘPIEŃ J. T lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Annals Med Sect Pol Acad Sci* 1976; **21**: 121-138.
- [60] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D. Z której komórki w linii różnicowania pochodzi przewlekła białaczka limfatyczna B-komórkowa. Cz. II. *Postępy Hig Med Dośw* 1988; **42**: 315-338.
- [61] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, ANTOSZ H, KOWAL M, ROLIŃSKI J, MRUGAŁA H. Dalsze obserwacje przewlekłych białaczek B-komórkowych z proliferacją komórek T (opis dwu przypadków). *Immunol Pol* 1988; **13**: 49-57.
- [62] RUPNIEWSKA ZM, ROŻYŃKOWA D, KOWALEWSKI J, NOWAKOWSKI A. Przydatność kliniczna testu transformacji blastycznej po PHA u chorych z przewlekłą białaczką limfatyczną (PBL). *Pol Arch Med Wewn* 1976; **55**: 45-55.

- [63] SANGSTER RN, MINOWADA J, SUCIO-FUCA N, MINDEN M, MAK TW. Rearrangement and expression of the alpha, beta and gamma chain T cell receptor genes in human thymic leukaemia cells and functional T cells. *J Exp Med* 1986; 163: 1491-1508.
- [64] SARFATI M, DELESPESE G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD 23) or its soluble fragments in the "in vitro" synthesis of human IgE. *J Immunol* 1988; 141: 2195-2199.
- [65] SARFATI M, NUTMAN T, FONTEYN C, DELESPESE G. Presence of antigenic determinants common to Fc IgE receptors on human macrophages, T and B lymphocytes and IgE-binding factors. *Immunology* 1986; 59: 569-575.
- [66] SCHRAVEN B, SAMSTAG Y, ALTEVOGT P, MEUER SC. Association of CD 2 and CD 45 on human T lymphocytes. *Nature* 1990; 345: 71-74.
- [67] SHAW S. Not all in a name. *Nature* 1989; 338: 539-540.
- [68] SHINOHARA T, MIWA S, HASEGAWA S, YAMAMOTO K, TONOMURA A. Cytogenetic study of chronic lymphocytic leukemia in ten Japanese patients with a case of the same chromosome abnormality both in T and B cells. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 34: 295-303.
- [69] STAMANKOVIC T, SEED B. The B-cell antigen CD 22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. *Nature* 1990; 345: 74-77.
- [70] STOOLMAN LM. Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. *Cell* 1989; 56: 907-910.
- [71] SWEDEMAN S, THORLEY-LAWSON DA. The activation antigen BLAST-2 when shed, is an autocrine BCGF for normal and transformed B cells. *EMBO J* 1987; 6: 1637-1642.
- [72] SWERDLOW SH, MURRAY LJ, HABESHAW JA, STANSFELD AG. Lymphocytic lymphoma/B-chronic lymphocytic leukaemia: An immunohistopathological study of peripheral B lymphocyte neoplasia. *Br J Cancer* 1984; 50: 587-599.
- [73] TKACHUK DC, GRIESSER H, TAKIHARA E, CHAMPAGNE E, MINDEN M, FELLER AC, LERNERT K, MAK TW. Rearrangement of T-cell delta locus in lymphoproliferative disorders. *Blood* 1988; 72: 353-357.
- [74] TONKS NK, CHARBONNEAU H, DITZ CD, FISCHER EH, WALSH KA. Demonstration that the leukocyte common antigen CD 45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 1989; 27: 8695-8701.
- [75] TÖTTERMAN TH, CARLSSON M, SIMONSSON B, BENGTTSSON M, NILSSON K. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood* 1989; 74: 786-792.
- [76] WEISSMAN AM, BANIYASH M, HOU D, SAMELSON LE, BURGESS WH, KLAUSNER RD. Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 1988; 239: 1018-1021.
- [77] WEISSMAN AM, HOU D, ORLOFF DG, MODI WS, SEUANEZ H, O'BRIEN SJ, KLAUSNER RD. Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: Distinction from the molecular CD 3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9709-9713.
- [78] YOSHIKAI YN, KIMURA N, TOYONAGA B, MAK TW. Sequence and repertoire of human T cell receptor alpha chain variable region genes in mature T lymphocytes. *J Exp Med* 1986; 164: 90-103.

Otrzymano: 10 lipca 1990

Przyjęto: 11 sierpnia 1990

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

KRONIKA

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików, Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego oraz Redakcja POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI zorganizowały doroczną, **XX konferencję szkoleniową** z zakresu biologii komórki na temat: **Metody cytohybrydyzacji w badaniach i diagnostyce**. Konferencja odbyła się 10 listopada 1990 w Warszawie.

Program Konferencji przedstawiał się następująco:

doc. dr hab. Jan Lubiński

Wprowadzenie do metodyki inżynierii molekularnej

dr Bożena Kamińska

Rola poliamin w regulacji cyklu komórkowego limfocytów T

doc. dr hab. Jan Lubiński

Molekularne badania DNA w diagnostyce zmian limfoproliferacyjnych

prof. dr hab. Maciej Zabel

Hybrydyzacja i cytohybrydyzacja w badaniach nad ekspresją genu kalcytoninowego

Organizatorzy

KSIĄŻKI NADESŁANE

1 IMMUNOCYTOCHEMIA. – Praca zbiorowa pod redakcją Macieja Zabła, PWN
Warszawa 1990.

2 FIZJOLOGICZNE PODSTAWY ŻYWIENIA PRZEŻUWACZY – prof.
Wiesław Barej, Wyd. SGGW-AR Warszawa 1990

Podręcznik ten jest przeznaczony dla studentów wydziałów weterynaryjnych i zootechnicznych akademii rolniczych, specjalizujących się w żywieniu i dietetyce zwierząt, a także dla młodych pracowników naukowych i instruktorów żywienia bydła. W książce podano opis ilościowych zmian składników pokarmowych podczas ich trawienia, wchłaniania i przemian tkankowych, co pozwala na prawidłową ocenę wartości białka pasz dla bydła. Poznanie tych zmian ułatwi ustalenie zapotrzebowania zwierzęcia na składniki odżywcze. Praca ma charakter nowatorski i jest pierwszą próbą przedstawienia w języku polskim najnowszych badań z dziedziny fizjologii żywienia zwierząt.

Podręcznik jest do nabycia w kioskach Wydawnictwa SGGW-AR przy ul. Rakowieckiej 26/30 oraz ul. Nowoursynowskiej 166 lub może być wysłany na zamówienie skierowane pod adresem Wydawnictwa.

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 zamieszcza:

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

2. 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 wystania do redakcji).

4. Listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednona stronnie 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). Następną stroną 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 białym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem 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 nadbitkę.

TREŚĆ

TOMASIAK M: Mechanizmy transdukcji sygnału w procesie aktywacji płytek krwi.	197
STASIAKOWSKA E. Czynniki martwicy nowotworu	213
JARUZELSKA J., BLIN N.: Zastosowanie elektronicznego frakcjonowania chromosomów do konstrukcji chromosomowo-specyficznych bibliotek DNA człowieka	235
RAKOCZY-TROJANOWSKA M., MALEPSZY S.: Wpływ czynników genetycznych na regenerację roślin w kulturach in vitro	247
NOWICKA-WIELGOSZ J.: Struktura i funkcja receptora dla interleukiny 2	259
RUPNIEWSKA M., WACH M.: Charakterystyka immunologiczna przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej	271

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Prenumerata na rok 1990

Prenumeratę na kraj przyjmuje redakcja ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa. Pieniądze należy wysyłać na konto: Polskie Towarzystwo Anatomiczne, ul. Chałubińskiego 5 02-004 Warszawa; 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, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; Bank Gdański, IV Oddział w Warszawie 300-009-6275-132.

Prenumerata na rok 1991

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za pierwszy zeszyc 1991 r. na nowe konto: FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110. Cena prenumeraty jednego zeszytu dla instytucji (bibliotek) wynosi 45 000 zł a dla odbiorców indywidualnych 25 000 zł.

Indeks 369705