

PL ISSN 0324-833X

P.2435
POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

Postępy Biologii Komórki

TOM 19-NR 1'92
(1 – 104)



Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium:

Szczepan BILIŃSKI, Jerzy KAWIAK, Maciej KAWALEC, Wincenty 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*

Artykuły nadesłane do Redakcji i zamieszczone w roczniku 1991 Postępów
Biologii Komórki recenzowali:

prof. Zofia Bielańska-Osuchowska,
prof. Marek Jakóbsiak,
prof. Jerzy Kawiak,
dr Maciej Kawalec,
prof. Wanda M. Krajewska,
prof. Jan Michejda,
prof. Maria Olszewska,
prof. Danuta Rożynkowa,
prof. Maciej Zabel.

Za tę społecznie wykonaną pracę i miłą współpracę serdecznie dziękujemy.

Fundacja •Rozwój SGGW-AR•

Ark. wyd. 10,2 Ark. druk. 6,5 Oddano do składu w lutym 1992 r. Podpisano do druku w marcu 1992 r. Druk ukończono w kwietniu 1992 r.

■ W tym zeszycie ♦ Postępów Biologii Komórki ♦

- Geny przeciwnowotworowe mogą być uważane za czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek (por. str. 3 tego Zeszytu). W związku z tym może warto wrócić do uprzednio opublikowanego artykułu, w którym omówiono identyfikację genów przeciwnowotworowych oraz opisano niektóre ich produkty (por. M. Hetman, Post Biol Kom 1991; 18: 203).
- Artykuł (na str. 23) poświęcony jest genom efektu matczynego i ich ekspresji w czasie oogenezy. Omówiono rolę produktów tych genów w determinacji głównych osi zarodka *Drosophila*.
- Uzyskiwanie in vitro zarodków somatycznych jest jedną z metod współczesnej biotechnologii roślin. Metoda ta umożliwia uzyskanie nowych osobników drogą wegetatywną, a więc z pominięciem niekontrolowanych zmian genetycznych, jakie następują przy rozmnażaniu generatywnym (rekombinacja genów). Embriogeneza in vitro w połączeniu z transformacją komórek stanowi niezwykle obiecujący kierunek w biotechnologii (patrz artykuł w tym zeszycie na stronie 35) wykorzystywany już w praktyce. Technika kultur in vitro roślin wyższych, jako podstawa biotechnologii, była tematem artykułu M. Rakoczy-Trojanowskiej i S. Malepszego (Post Biol Kom 1990; 17: 247–257).
- Rola witaminy A w organizmie (str. 77 tego Zeszytu) skłania do sugestii, że może ona być uważana za odpowiednik hormonu, a komórki gwiazdiste wątroby zdolne do jej magazynowania za rodzaj gruczołu wydzielania wewnętrznego.
- W ubiegłym roku Nagrodę Nobla w zakresie medycyny i fizjologii przyznano E. Neherowi i B. Sakmannowi. Do osiągnięć tych autorów nawiązuje artykuł na stronie 97 obecnego Zeszytu.

ERRATA

Strona	Wiersz	Jest	Powinno być
204	w 16 d	onkogenu	genu
206	w 11 g	umownie oznakowane p105	(nowsze oznaczenia masy Rb przyniosły wartość 105 kDa)
206	w 12–13 g	przewidywanie sekwencji	przewidywanej sekwencji
207	w 12 g	onkogenu c-jun	genu c-jun
207	w 17 g	onkogenu g-fos	genu c-fos
211	w 20 g	LT[47], E1B[66] czy HPV16[67].	V40LT[47], E1B adenowirusów [66] czy HPV16 [67].

Errata do zeszytu nr 4, tom 18, 1991 r. Postępow Biologii Komórki.

GENY PRZECIWNOWOTWOROWE JAKO CZYNNIKI REGULATOROWE WZROSTU I RÓŻNICOWANIA KO- MÓREK

TUMOR SUPPRESSOR GENES AS REGULATORS OF CELL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION

Antoni HORST

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Poznań

Streszczenie. Przedstawiono poglądy na nowy, wielce obiecujący kierunek badań onkologicznych polegający na wykryciu genów przeciwnowotworowych. Istota zagadnienia sprowadza się do tego, że jako przeciwwaga czynników prokancerogennych w organizmie występują również czynniki przeciwnowotworowe. W myśl tej koncepcji przewaga onkogenów lub niedobór czynników przeciwnowotworowych powodują wzrost nowotworowy, natomiast mała ilość onkogenów z przewagą czynników przeciwnowotworowych zapobiega powstaniu nowotworów. Rola czynników przeciwnowotworowych zasługuje tym więcej na uwagę, że czynniki te zdają się wpływać regulująco na czynniki odpowiedzialne za proliferację komórek, względnie nawet są bezpośrednimi czynnikami regulującymi procesy proliferacji komórek (cyklu komórkowego). Z tego względu omówiono najpierw najważniejsze osiągnięcia w dziedzinie regulacji oraz czynniki biorące udział w cyklu komórkowym (tj. kinazy cdc2 i inne oraz cykliny A, B i G1). Przedstawiono również schemat cyklu komórkowego z udziałem wymienionych czynników. Z kolei omówiono rolę genu RB (retinoblastoma), białka p53, genów zapobiegających przerzutom nowotworowym oraz białka MCC. Na zakończenie omówiono udział genów przeciwnowotworowych w procesie różnicowania komórek.

Summary. Views on new and mighty promising trends of neoplastic investigations based on discovery of tumor suppressor genes are discussed. The nature of this presents a view that prevalence of carcinogenous agents or deficiency of anticarcinogenous agents present in the organism are decisive in developing of neoplasmas. The role of tumor suppressor genes attracts notice because it seems that they are physiological regulators of cell proliferation which regulate directly the processes of cell proliferation. First, the main approaches of agents participating as physiological regulators of cell cycle are discussed (ie. kinases cdc2 and others as well as cycline A, B and G1). A diagram of the cell cycle regulated by the above discussed agents is presented. Than the role of RB gene, p53 protein, genes preventing metastases of neoplasmas, and protein MCC are discussed. Finally, general aspects of tumor suppressor genes in differentiation of cells are presented.

WSTĘP

Proces nowotworowy polega na sekwencyjnym występowaniu zmian prowadzących do stopniowej emancypacji jakiegoś klonu komórkowego wyzwalającego się spod kontroli różnych czynników regulujących wzrost komrek [31]. W prawidłowych komórkach pod wpływem odpowiednich czynników indukujących następuje zazwyczaj ich końcowe zróżnicowanie. Komórki zróżnicowane na ogół tracą zdolność do podziałów i tym samym proliferacji. Jednostronne ukierunkowanie progresji komórek nowotworowych powoduje brak ich zróżnicowania, co początkowo interpretowano jako ich odróżnicowanie, a co obecnie traktowane jest jako blok różnicowania [51]. Ta zmiana poglądu na zachowanie się komórek nowotworowych jest istotna.

Z kolei niezmiernie ważnym etapem w poznawaniu istoty procesu nowotworzenia było wykazanie jego genetycznego podłoża w postaci z jednej strony czynników pobudzających wzrost (onkogenów i czynników wzrostowych), z drugiej strony czynników hamujących wzrost zwanych antyonkogenami (*tumor suppressor genes*) lub produktów genów przeciwnowotworowych. Fizjologiczna rola produktów genów przeciwnowotworowych polega na przeciwstawnej (hamującej) regulacji podziałów komórkowych i tym samym hamowaniu proliferacji komórek [51, 75]. Wychodząc z powyższego założenia przyjmuje się obecnie, że proces nowotworowy powstaje wskutek zakłócenia normalnej równowagi tych czynników. Nadmiar czynników pobudzających wzrost (onkogenów lub czynników wzrostu), powstały na skutek nadprodukcji lub mutacji prowadzącej do niekontrolowanej produkcji – przyczynia się do nowotworzenia, a również niedobór produktów genów przeciwnowotworowych lub ich mutacje wywołują zanik ich funkcji i nowotworzenie.

Wykrycie onkogenów nastąpiło na skutek poznania ich działania w stopniowej transformacji komórek prawidłowych w komórki nowotworowe [8, 86].

Pierwszego wykrycia czynności przeciwnowotworowej dokonano w przypadku mysich komórek hybrydowych, powstałych na skutek fuzji prawidłowych fibroblastów z różnymi komórkami nowotworowymi: komórki nowotworowe polyoma – indukowane wirusem polyoma, komórki mięsaka indukowanego chemicznie, komórki samoistnego nowotworu szpiczaka (*myeloma*). Uzyskane hybrydy w początkowym okresie wzrostu nie wykazywały żadnych cech wzrostu nowotworowego, stając się jednak w późniejszym okresie rozwoju w miarę utraty niektórych chromosomów na powrót komórkami nowotworowymi [51, 75]. Dopiero po wielu latach wykazano, że przyczyną nawrotu kancerogenności była utrata chromosomów zawierających geny przeciwnowotworowe. Z czasem wykazano, że przyczyną wielu dziedzicznych nowotworów u ludzi była utrata fragmentów lub całych chromosomów nosicieli genów przeciwnowotworowych [70, 71]. Pogląd ten uzyskał silne argumenty dzięki eksperymentom z transferem chromosomów zawierających geny przeciwnowotworowe, powodujących regresję komórek nowotworowych [75]. Na przykład eksperymenty z transferem ludzkiego chromosomu 11 do komórek raka szyjki macicy HeLa lub SiHa oraz do komórek nerkowych guza Wilmsa dały wyniki pozytywne, natomiast transfer innych chromosomów (chromosomu X lub 13) do tych samych komórek dał wyniki negatywne [75].

Rewolucyjne w pewnym sensie znaczenie w badaniu genów przeciwnowotworowych i tym samym nowotworów miała hipoteza Knudsona, który na początku lat siedemdziesiątych sformułował tezę, potwierdzoną późniejszymi badaniami molekularnymi, że dziedziczny nowotwór siatkówczak (*retinoblastoma*) jest uwarunkowany dziedziczeniem jednego allelu

chorobowego oraz utratą drugiego allelu (w tym przypadku heterozygotycznego z powodu braku pierwszego z pary alleli) podczas dalszego rozwoju. Stąd określono to zjawisko jako utratę heterozygotyczności (*loss of heterozygosity* – LO). W rezultacie osoba ta nie mając żadnego z wspomnianych alleli staje się podatna na powstanie nowotworu – siatkówczaka [52]. Utrata genu może wystąpić wskutek utraty całego chromosomu (np. wskutek nieprawidłowego podziału) lub jego fragmentu (np. wskutek nieprawidłowego przegrupowania lub inaktywacji). Teza ta, nazwana "podwójnym zdarzeniem" w procesie nowotworzenia, okazała się niezwykle płodną, prowadząc do wykrycia na podobnej zasadzie całej grupy nowotworów (tab. 1). Z tej tabeli wynika ważny wniosek, że powstanie nowotworu może być uwarunkowane zmianami kilku różnych chromosomów i tym samym kilku różnych genów.

TABELA 1 Utrata heterozygotyczności w ludzkich nowotworach

Chromosom	Rodzaj nowotworu
1p	czerniak, MEN2, nerwiak, rak rdzeniasty tarczycy, pheochromocytoma, rak przewodu piersiowego
1q	rak piersi
3p	rak drobnokomórkowy płuc, rak nerki, rak szyjki macicy, choroba Hippel-Lindau
5q	rodzinna polipowatość gruczołakowata, sporadyczny rak jelita grubego
11p	guz Wilmsa, rhabdomyosarcoma, rak piersi, rak wątroby, rak komórek przejściowych pęcherza moczowego
11q	MEN1
13q	siatkówczak (retinoblastoma), kostniako-mięsak, drobnokomórkowy rak płuc, rak przewodu piersiowego, rak żołądka
17p	drobnokomórkowy rak płuc, rak jelita grubego, rak piersi, kostniako-mięsak
18q	rak jelita grubego
22	oponiak, rak (nerwiak) nerwu słuchowego, pheochromocytoma (wg R. Sager, Science 1989; 246: 1408)

(MEN – *multiple endocrine neoplasia*)

Obserwacją o szczególnym znaczeniu w przypadku siatkówczaka było to, że powstaje on tylko u małych dzieci (zwykle w pierwszym roku życia – najpóźniej w wieku 5–7 lat). W późniejszym wieku, kiedy retinoblasty, zdolne do podziałów, przeszły już pełne zróżnicowanie do retinocytów – siatkówczak nie może już się rozwinąć [51]. Wynika stąd oczywisty wniosek, że mechanizm działania genu RB, zapobiegającego powstawaniu siatkówczaka, jest w jakiś sposób związany z procesem wzrostu i różnicowania się komórek.

CYKL ŻYCIOWY KOMÓREK

Tak szczęśliwie się złożyło, że niezależnie prowadzone badania nad kluczowym elementem proliferacji komórek, tj. cyklem komórkowym doprowadziły do istotnego postępu w tej dziedzinie [49, 68, 90]. Jeszcze kilkanaście lat temu istota cyklu komórkowego była całkowicie niejasna, a najczęściej wyrażany był pogląd, że momentem wyzwalającym podział komórki jest jej nieproporcjonalny wzrost, powodujący niestosunek pomiędzy jądrem a cytoplazmą. W tym czasie był też ogólnie wyrażany pogląd, że na cykl życiowy komórki składają się dwie fazy: faza spoczynkowa (inaczej interfaza) oraz faza podziałowa, czyli mitoza.

Do rozwinięcia współczesnych poglądów na podział komórek (tak mitotyczny komórek somatycznych, jak i mejotyczny komórek płciowych) przyczyniły się badania na oocytach. O ile przebieg mejozy męskich komórek płciowych niewiele różni się od mitozy (spermatogonie w pierwszym podziale mejotycznym przechodzą w spermatocyty I-rzędu, te z kolei w II podziale mejotycznym w spermatocyty II-rzędu, aby w końcu zróżnicować się do plemników), to mejoza żeńskich komórek płciowych różni się w sposób istotny. Oogonie w 13–20 tygodniu życia płodowego po przejściu faz leptotenu, zygotenu, pachytenu i diplotenu I mejozy zatrzymują dalszy podział i kończą go dopiero w okresie owulacji, aby potem przejść następną fazę podziału, podobnie jak w spermatogenezie – znów jednak z tą różnicą, że w I, jak i w II podziale mejotycznym powstaje tylko jeden oocyt I i II rzędu, a pozostałe chromosomy nie tworząc oocytów zostają wydalone jako ciała kierunkowe I i II rzędu. Właśnie fakt pozostawania oocytów w postaci niedokończony mejozy, czyli niejako w stanie zamrożenia, który zostaje zniesiony z chwilą zadziałania odpowiednich hormonów, posłużył do zainicjowania niesłychanie doniosłych badań. Badania te przeprowadzone w początkach lat siedemdziesiątych doprowadziły do wykrycia czynnika powodującego dojrzewanie niedojrzałych, będących w stanie "zamrożenia" oocytów. Czynnikiem ten Masui [49, 68, 90] nazwał MPF (*maturation promoting factor*) – jednak całkowite jego wyizolowanie nastąpiło dopiero w 1988 roku [68].

KINAZA BIAŁKOWA cdc2

Następne badania nad procesem mejozy przeprowadzone na komórkach drożdży wykazały, że kontrakcja chromosomów odbywa się niezależnie od samego procesu mitozy. Co więcej okazało się, że odbywa się ona również mimo bloku mitozy, a nawet po usunięciu jądra komórkowego. Stąd wniosek, że w cytoplazmie musi znajdować się jakiś czynnik działający na zasadzie "zegara biologicznego" albo reakcja ta odbywa się w sposób sekwencyjny, to znaczy każde następne stadium jest uwarunkowane ukończeniem poprzedniej reakcji – stąd reakcję tę nazwano *domino*, gdyż odbywa się w myśl zasad tej gry [67]. Geny odpowiedzialne za tę reakcję nazwano *cdc2* (od *cell-division-cycle*), których produkt jest niezbędny do wystąpienia podziału komórkowego [68]. Mutacje tego genu powodowały zahamowanie zapoczątkowania podziału komórkowego, natomiast dodanie produktu genu *cdc2* do tak zmutowanych komórek powodowało ich normalny podział [61, 68]. Białko *cdc2* zostało zidentyfikowane w 1987 roku jako kinaza białkowa, przenosząca grupy fosforanowe z ATP na inne białka [61]. W ten sposób proces ufosforylowania białka przez *cdc2* kinazy powoduje aktywację, zaś defosforylacja tych białek, przez odpowiednie fosfatazy, inaktywację procesu podziałowego komórki.

Przeprowadzone badania u drożdży wykazały, że przemieszczenie czynnika transkrypcji drożdży SW15 jest zależne od kinazy CDC28 [64]. W fazach S, G2 i M czynnik transkrypcji SW15 znajduje się w cytoplazmie będąc pod wpływem CDC28 w stanie ufosforylowanym. Wskutek inaktywacji CDC28 w fazie G1, ulegając defosforylacji, SW15 przechodzi do jądra komórkowego. W ten sposób kinaza CDC28 w odpowiedniej fazie cyklu komórkowego wpływa bezpośrednio na przemieszczenie czynnika transkrypcji SW15 z cytoplazmy do jądra komórkowego.

CYKLINY

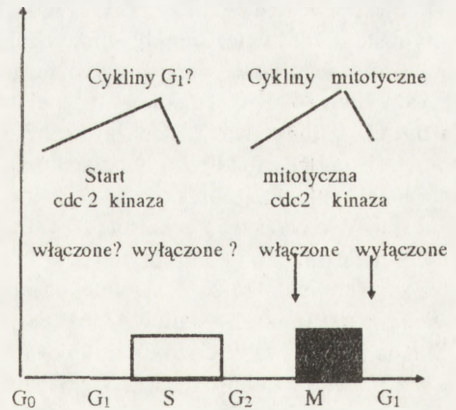
Dalsze badania wykazały, że aktywność kinazy *cdc2*, narastająca w okresie interfazy, zanika w fazie mitozy tuż przed wystąpieniem anafazy z powodu gwałtownej degradacji białka regulatorowego. W interfazie aktywność ta znowu powoli narasta, przy czym ilość białka *cdc2* pozostaje bez zmian, a jedynie okresowo narasta i zanika jego aktywność [68]. Już ten wynik dowodzi, że białko *cdc2* nie może być identyczne z czynnikiem dojrzewania MPF. Badania przeprowadzone na jajach jeżowca we wczesnych latach osiemdziesiątych wykazały, że po zapłodnieniu ilość syntetyzowanych białek w nich nieprzerwanie rośnie, podczas gdy jedno z nich w czasie każdej kolejnej fazy mitozy ulega gwałtownej degradacji, aby w następującej interfazie znowu narastać. Białko to T. Hunt nazwał cyklina [47, 68]. Po uzyskaniu mRNA tego białka i wprowadzeniu go do niedojrzałych oocytów żaby (komórek prekursorowych jaja żaby) następowała mitozą wskutek jego translacji w cyklina – stąd wniosek, że cyklina stanowi drugi składnik skompleksowanego czynnika dojrzewania MPF [22, 35, 36, 79].

Dzięki wyizolowaniu wymienionych składowych czynnika dojrzewania MPF (*cdc2* i cyklina) kilku grupom badaczy udało się przez dodawanie tych czynników dowolnie sterować cyklem komórkowym jaj, czego następstwem było wyprodukowanie *in vitro* dowolnej fazy mitozy (interfaza, metafaza, anafaza wraz z uzyskaniem komórek potomnych) [47, 67].

Badania nad samą cząsteczką cyklina wykazały, że częściowo zdegradowana cyklina (*truncated*) może indukować mitozę, ale nie ulegając degradacji z powodu utraty fragmentu determinującego degradację nie kończy mitozy – innymi słowy powstaje blok mitozy. Stąd wniosek, że degradacja cyklina jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu mitozy [47, 61, 68]. Blok mitozy powoduje również rozkojarzenie faz: mitozy oraz S spowodowane zahamowaniem syntezy DNA lub nieprawidłową syntezą. Przeprowadzone badania wykazały, że specjalne geny przez swoje produkty koordynują fazy cyklu mitotycznego (rys. 1). W ten sposób uszkodzenie chromosomów w fazie S, jak i brak replikacji powodują zahamowanie cyklu komórkowego, zaś odwrotnie, zreplikowane chromosomy indukują przejście komórki do fazy M [26].

Nowsze badania wykazały, że *cdc2* ma prawdopodobnie dwie różne formy: S – aktywującą syntezę DNA i M – aktywującą mitozę [3], przy czym przejście z jednej fazy do drugiej jest prawdopodobnie motorem powodującym przejście cyklu komórkowego z fazy S do fazy M. Przejście *cdc2* z fazy S do fazy M polega na fosforylacji jednych reszt aminokwasowych i defosforylacji innych, na przykład tyrozyna w poz. 15 i treonina w poz. 14 ulegają gwałtownej defosforylacji z początkiem fazy M, natomiast z początkiem fazy S następuje fosforylacja w poz. 277 [3].

W miarę prowadzenia badań liczba znanych cyklina stale rośnie. Według



Rys. 1. Schemat cyklu komórkowego fazy S (biały prostokąt) i fazy M (czarny kwadrat); w górnej części narastanie i degradacja cyklina; czas narastania i degradacji cyklina G1 – hipotetyczny (wg T. Hunta [12])

Hunta, odkrywcy tych białek w jajach jeżowca (*sea urchin eggs*), liczba ich wynosi już obecnie ponad 30 i jeszcze się zwiększa [47]. Według tego autora poszczególne cykliny można zaszeregować do trzech kategorii: typ A, typ B i typ G1. Najlepiej poznany jest typ B, wykryty u wszystkich eukariotów, włączając człowieka. Typ A jest mniej zbadany, chociaż wiele wskazuje, że odgrywa on rolę w kontroli fazy S cyklu komórkowego [82] oraz transformacji komórek [84].

Ta wielka liczba różnych cyklin sugeruje specyficzne miejsca zadziałania w cyklu komórkowym, jak i ich specyficzność tkankową. Na ogromną liczbę ok. 400 reszt aminokwasowych w różnych cząsteczkach cyklin (od drożdży do człowieka), tylko 5 wykazuje całkowity konserwatyzm – są to prawdopodobnie miejsca wiązania podjednostek cdc2/-CDC28 [47]. Z kolei istotna różnica pomiędzy cyklinami typu G1 a typami A i B występuje w N-terminalnej części cyklin. Mitotyczne cykliny A i B mają ok. 40 reszt aminokwasowych od startu i ok. 100 reszt aminokwasowych wyprzedzających fragment destrukcyjny o sekwencji aminokwasów RAALGNISN (pojedynczy kod literowy aminokwasów), natomiast cykliny typu G1 mają krótszy N-terminalny fragment (z powodu braku fragmentu destrukcyjnego) i dłuższy fragment C-terminalny z powodu obecności fragmentu utrwalającego PEST (pojedynczy kod literowy aminokwasów) [37, 47].

SPOSÓB DZIAŁANIA CZYNNIKÓW DOJRZEWANIA MPF

Przeprowadzone badania sugerują, że MPF nie powstaje pod wpływem prostego skompleksowania białka cdc2 z odpowiednią cykliną. Na szczególną uwagę zasługuje białko genu cdc25, którego akumulacja może powodować aktywację nieaktywnego kompleksu p34^{cdc2}/cyklina B, występującego w fazie G2-M cyklu komórkowego oocytów. Dodanie produktu genu cdc25 w postaci białka p54^{CDC25H}, powodując defosforylację p34^{cdc2}, aktywuje kinazę histonu H1 (inaczej cdc2), aktywując tym samym kompleks p34^{cdc2}/cyklina B, czego następstwem jest przejście cyklu komórkowego z fazy G2 do fazy M [37, 78]. Stąd cdc2 może w pewnym stopniu również samodzielnie regulować cykl komórkowy.

Jaja żaby *Xenopus* zawierają dwa różne homologu cdc2 o masach 34 kDa i 32 kDa [27]. O ile kinaza cdc2 34 kDa ulega dramatycznej inaktywacji pod koniec mitozy, to kinaza cdc2 32 kDa nie ulega inaktywacji. Kinaza cdc2 32 kDa nie ulega asocjacji z cyklinami B1 i B2, natomiast asocjuje z cykliną A tworząc kompleks 54 kDa. Ponadto brak cdc2 32 kDa blokuje syntezę DNA, natomiast brak cdc2 34 kDa nie hamując replikacji DNA powoduje blok mitozy. W ten sposób u wyższych eukariotów synteza DNA i wejście w fazę mitozy podlega dwóm różnym mechanizmom kontrolnym [27].

Na podstawie dotąd przedstawionych prac i poglądów, cykl komórkowy można przedstawić jak na rysunku 2 [według 47, 61, 68].

Składa się on z fazy G1, która odbywa się pod wpływem kompleksu złożonego z cdc2 kinazy i prawdopodobnie cykliny G. Badania przeprowadzone na komórkach drożdży wykazały, że w punkcie "startu", kiedy występuje zdeterminowanie komórki do wystąpienia mitozy, aktywny kompleks MPF, oprócz cdc2 kinazy, zawiera również specyficzną cyklinę G1. Z chwilą, kiedy komórka przeszła już fazę G1, dalszy wzrost odbywa się już prawdopodobnie niezależnie, albo pod wpływem nieznanymi czynników przechodzi w fazę S (syntezy DNA), która odbywa się pod wpływem kompleksu utworzonego z kinazy cdc2 oraz

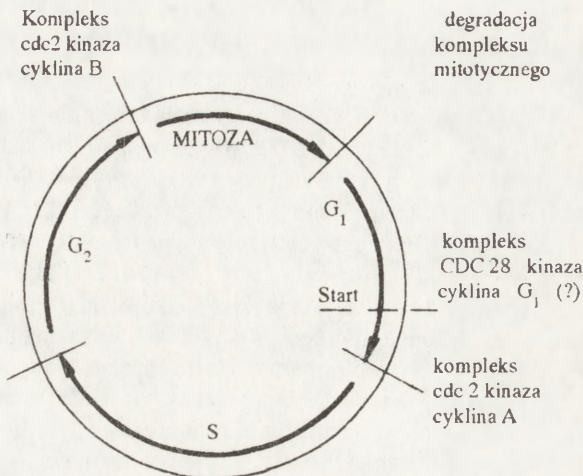
prawdopodobnie cykliny A. Degradacja tej cykliny kończy fazę S, po czym komórka przechodzi w fazę G₂ (drugiej fazy wzrostu), będącej pod wpływem cdc2 kinazy i cykliny B. Pod wpływem degradacji cykliny B komórka przechodzi w fazę M (mitozy).

W komórkach eukariotów przejście do następnej fazy cyklu komórkowego musi zawsze poprzedzać ukończenie poprzedzającej fazy, zgodnie z teorią "domino" [67]. Pewne dane na temat molekularnego mechanizmu tej zależności występują w najnowszych badaniach wykazujących istnienie odpowiednich genów i ich produktów, zwłaszcza odnośnie replikacji chromosomów [78], jak również ukończenie utworzenia wrzeciona kariokinetycznego wraz z prawidłowym zaczepieniem do niego chromosomów, bez którego nie ma utworzenia odpowiedniego aktywnego kompleksu [40, 68, 69]. Genem odpowiedzialnym za współdziałanie DNA (syntezy lub uszkodzenia) jest wyizolowany gen RAD9, wykryty w mutantach drożdży, w których nastąpiło zatrzymanie mitozy z powodu uszkodzenia lub braku syntezy [3, 26, 40].

Replikacja DNA w komórkach somatycznych eukariotów oraz późnych stadiach embrionalnych jest w wysokim stopniu uzależniona od uruchomienia decyzji "startu" komórki do podziału [40]. "Start" do podziału wymaga obecności odpowiednich cyklin, aktywujących białka cdc2 dla umożliwienia mitozy lub mejozy, zaś dla syntezy DNA (replikacji) jeszcze innych cyklin [24, 66].

"Start" do podziału mitotycznego zależy również od szeregu dalszych czynników, takich jak: obecność i dostatek żywności, hormonów, czynników wzrostu itp. Na przykład brak lub niedobór czynników pokarmowych nie pozwala na uruchomienie "startu" do podziału mitotycznego [68]. Czynnikiem dojrzewania MPF wydaje się mieć również ogólny wpływ na całość procesów związanych z mitozą i proliferacją komórek. Między innymi, powodując pośrednio lub bezpośrednio ufosforylowanie białek otoczki jądrowej (*envelope*) – głównie lamin. Laminy stanowią podstawowy składnik otoczki. Zapoczątkowanie fosforylacji lamin przez MPF wywołuje kaskadę reakcji powodujących aktywację enzymów wywołujących dalszą fosforylację lamin aż do ich rozpadu, czego następstwem jest dysocjacja otoczki jądrowej, co z kolei umożliwia podział komórki matczynej na dwie komórki potomne [68].

Dotąd prowadzone badania nad cyklem komórkowym miały za obiekt jaja i komórki drożdży, które w pewnym sensie są komórkami samodzielnymi. Przeniesienie tych badań na komórki organizmów wielokomórkowych i wykazanie wpływu na te procesy bodźców ogólnoustrojowych powinno znacznie wzbogacić naszą wiedzę na temat mechanizmów regulujących wzrost i tym samym również mechanizmów, których zakłócenia powodują wzrost nowotworowy.



Rys. 2. Schemat cyklu komórkowego [wg 9, 11, 12]

SIATKÓWCZAK – PRZYKŁAD GENÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Badania genów przeciwnowotworowych są obecnie najbardziej zaawansowane w dziedzinie genu siatkówcza (*retinoblastoma*). Gen siatkówcza Rb-1 lub Rb (od *retinoblastoma*) został wyizolowany w 1987/1988 roku. Występuje on w chromosomie 13q14 o długości ok. 200 kpz, ma 27 eksonów. Jego mRNA po dokonanych składowaniu (*splicing*) wynosi 4,7 kb. Białko zsyntetyzowane na tej matrycy ma względną masę cząsteczkową 105 kDa, zaś w formie ufosforylowanej 110–114 kDa [20, 87]. Brak aktywnego genu Rb występuje w wielu nowotworach, takich jak: siatkówcza (*retinoblastoma*), kostniako-mięsak (*osteosarcoma*), drobnokomórkowy rak płuc, rak sutka, rak prostaty i inne [10, 38, 54]. Zaburzenia te mogły wywoływać zarówno delecje chromosomu, jak i mutacje punktowe, jak to opisano w przypadku raka pęcherza moczowego, kiedy mutacja punktowa w miejscu składowania (*splicing*) powodowała wyeliminowanie całego jednego eksonu [42]. Brak pierwszego eksonu genu Rb jest stosunkowo częstym zaburzeniem powodującym powstanie raka [9], podobnie jak preferencja mutacji Rb w ojcowskiej linii germinalnej [23, 93]. Wreszcie znane są też przypadki, kiedy występuje dziedziczna delecja chromosomu 13q14, a siatkówcza nie występuje [19]. Dane te dowodzą, że gen Rb odgrywa prawdopodobnie bardziej ogólną rolę w procesie nowotworzenia, aniżeli by to dotyczyło tylko siatkówcza. Niestety, mimo wyizolowania genu Rb oraz zsyntetyzowania jego produktu, istota mechanizmu jego działania wciąż pozostaje niejasna.

Gdy miano do dyspozycji gen Rb oraz jego produkt, samo przez się narzucało się wykonanie eksperymentów z wprowadzeniem genu Rb do szeregu komórek nowotworowych, w tym również do komórek siatkówcza, wykazujących jego niedobór lub brak. Wprowadzenie tego produktu powodowało supresję komórek nowotworowych, objawiającą się zarówno w komórkach siatkówcza, jak i mięsaka kostnego (*osteosarcoma*) zmianą morfologii komórek, zmniejszeniem proliferacji, tworzeniem kolonii w miękkim agarze oraz zdolnością wywoływania nowotworu u bezwłosej myszy [46]. Podobne wyniki uzyskano również wprowadzając do komórek nowotworowych inne chromosomy [81]. Dane te w przekonujący sposób dowodzą, że gen Rb wywiera antagonistyczne działanie w stosunku do nowotworu. W celu wyjaśnienia tego działania autorzy usiłowali skorelować zmiany białka Rb ze wzrostem i różnicowaniem komórek. Okazało się, że w cyklu komórkowym ilość tego białka pozostaje względnie niezmienną, natomiast jego ufosforylowanie ulega wyraźnym zmianom [17].

Z kolei szereg autorów uważa, że produkt genu Rb bierze bezpośredni udział w cyklu komórkowym. W fazie Go/G1 praktycznie całe białko Rb jest nieufosforylowane, podczas gdy w fazie S/G2 ulega ono prawie całkowitej fosforylacji [17, 20]. Należy podkreślić, że transformujący antygen T wirusa SV40 wiąże się tylko z nieufosforylowanym białkiem Rb, natomiast nie wiąże się z jego ufosforylowaną postacią [17, 45]. Wreszcie na podkreślenie zasługuje fakt, że fragment 14 reszt aminokwasowych wiążących się z miejscem transformującym wirusa SV40 może współzawodniczyć z białkiem Rb o to miejsce [17, 45].

Szereg autorów łączy zahamowanie przeciwnowotworowego działania białka Rb z jego skompleksowaniem z onkoproteinami wirusa DNA, co uniemożliwia wiązanie się białka Rb z właściwymi dla jego działania białkami komórkowymi. Na dowód tego autorzy wyizolowali białko komórkowe łączące się z białkiem Rb o względnej masie cząsteczkowej 46 kDa i

określili je nazwą RbAP46. Na dowód tego przytaczają oni następujące argumenty: białko Rb i antygen T SV40 mają te same właściwości wiążące, a szereg zmutowanych białek Rb, nie wiążących antygeny T SV40, nie wiązało również białka RbAP46; peptyd T SV40, jak i reszty aminokwasowe 101–116 peptydu T współzawodniczyły z RbAP46 o wiązanie z białkiem Rb [45]. Dowodzi to, że zablokowanie interakcji białka komórkowego RbAP46 przez onkoproteiny wirusów DNA może uniemożliwić normalne jego działanie wraz z białkiem Rb jako kompleksów hamujących nowotworzenie [45].

INTERAKCJA BIAŁKA Rb Z CZYNNIKAMI CYKLU KOMÓRKOWEGO I RÓŻNICOWANIA

W badaniach przeprowadzonych w trzech niezależnych przypadkach gruczolaków przytarczyc, spowodowanych inwersją chromosomu 11q13 w miejscu występowania fragmentu 5' genu parathormonu – określono locus tego genu jako PRAD1 (od *parathyroid adenoma*). Badania wykazały, że cDNA PRAD1 stanowi kod dla białka o 295 resztach aminokwasowych i sekwencji podobnej do cyklin. Białko to wpływało wyraźnie na cykl komórkowy komórek HeLa. Dodanie białka PRAD1 do lizatów mięczaka (ang. *clam*) zawierających w interfazie nieaktywne białko p34^{cdc2} przy braku endogennych cyklin pozwoliło na wyizolowanie białka wiążącego cdc2 (z drożdży) oraz pokrewne kinazy ulegające koprecypitacji ze zasocjowanymi białkami o charakterze kinaz. Białko PRAD1 powodowało również koprecypitację z histonem H1 będącym preferencyjnym substratem kinazy cdc2. Dane te dowodzą, że PRAD1 stanowi ważny czynnik w rozwoju nowotworów związanych z genami występującymi w chromosomie 11q13 [65]. Ta nowa cyklina (o ile dalsze badania potwierdzą jej charakter cykliny) może wiązać i aktywować cdc2 kinazę. Transkrypcja tego czynnika wskazuje również na pewne związki z cyklem komórkowym wykazując wysoki poziom w fazie G2, a niski poziom w fazie S. Zatem czynnik ten zdaje się odgrywać dużą rolę w regulacji mitozy i cyklu komórkowego [47, 65].

Ostatnio pojawiło się szereg prac wskazujących na charakter czynnika regulującego transkrypcję przez produkt genu Rb [1, 15, 58]. Prawie jednocześnie dwie grupy badaczy wykazały, że białko Rb wiąże się z produktem onkogenu myc, stanowiącym część kompleksu białek E2F regulujących transkrypcję. Obie grupy badaczy wykazały, że białko Rb ulega podczas cyklu komórkowego fosforylacji, jednak tylko postać nieufosforylowana wykazuje aktywność przeciwnowotworową. W ten sposób białko Rb jest jednym z czynników regulujących cykl komórkowy. Ufosforylowanie białka Rb unieczynnia go, znosząc jego hamujący wpływ na normalny przebieg cyklu komórkowego, natomiast w razie jego braku lub mutacji, brak jest czynnika hamującego cykl komórkowy, wskutek czego pozostałe czynniki transkrypcji pozostając czynne, pozwalają na niekontrolowaną proliferację typową dla procesu nowotworowego.

Badania przeprowadzone z białkami transformującymi adenowirusa E1a wykazały, że aktywność czynnika DRTF1 ulega zahamowaniu w okresie, kiedy macierzyste komórki embrionalne wchodzi w fazę różnicowania. Czynnik DRTF1 wchodzi w skład różnych kompleksów, jednak zawsze utrzymuje swoją specyficzność w stosunku do DNA. Jednym z tych kompleksów jest kompleks z białkiem Rb. Kompleks ten może ulegać dysocjacji przez białka adenowirusa E1a – reakcja ta odbywa się zawsze tylko przy udziale regionów adeno-

wirusa odpowiedzialnych za transformację nowotworową [5, 83]. Stąd wniosek, że białko Rb, będąc czynnikiem transkrypcji, tworzy kompleks z DNA. Zatem wynik ten potwierdza charakter białka Rb jako czynnika transkrypcji [4, 21]. Niektórzy autorzy wręcz sugerują, że regulacyjny wpływ białka Rb na transkrypcję opiera się na jednoczesnym łączeniu się białka Rb z czynnikami transkrypcji regulującymi tym samym cykl komórkowy [18].

Dalszym dowodem wpływu białka Rb na syntezę DNA są badania nad właściwościami transformującymi adenowirusa E1a. Białka E1a indukują syntezę DNA w komórkach spoczynkowych jedynie w przypadku, kiedy łączą się z białkiem Rb albo z innymi białkami, np. z białkiem o masie 300 kDa. Brak syntezy DNA wskutek mutacji białka Rb lub białka p300 nie łączy się z żadnym z nich [43]. Dane te sugerują, że białko Rb lub białko p300 (lub inne o podobnych zdolnościach wiązania białek E1a) mogą być czynnikami regulującymi syntezę DNA w cyklu komórkowym.

BIAŁKO p53

Ważnym czynnikiem przeciwnowotworowym, podobnie jak białko Rb, jest białko p53, wykryte w 1979 roku w postaci kompleksu z antygenem T wirusa SV40 i było traktowane początkowo jako onkogen, dopiero w 1989 roku okazało się, że były to nieaktywne, zmutowane formy białka p53, podczas gdy niezmutowane formy hamowały transformację nowotworową komórek w hodowlach [25, 29, 55], proliferację stransformowanych komórek w hodowli [2, 57, 63] oraz onkogeniczny potencjał komórek zwierzęcych. Delecja lub mutacje białka p53 występują w licznych nowotworach zwierzęcych i ludzkich [55]. Częste mutacje p53 opisano w rakach płuc [80], jelit [73], przełyku [41], a przede wszystkim w bardzo rzadkim zespole Li-Fraumeni [56, 60]. Zespół Li-Fraumeni jest bardzo rzadką chorobą, cechującą się już w młodym wieku bardzo licznie występującymi nowotworami (mózgu 12%, piersi 25%, mięsaki tkanek miękkich 12%, białaczki 5%, mięsaki kostne 6%, rak nadnerczy 1% i inne).

Gen p53 znajduje się w ludzkim chromosomie 17p. Typ dziki p53, podobnie jak białko Rb, wpływa ujemnie na wzrost i podział komórek, cykl komórkowy, natomiast w przeciwieństwie do białka Rb, zmutowane formy p53 mogą działać stymulująco na podział komórek – w postaci heterozygotycznej z powodu utraty drugiego allelu (*loss of heterozygosity*) występują jako cecha dominująca i stąd tak częste są te mutanty w nowotworach, brak obydwu alleli p53 w nowotworach jelit występuje z częstością 75–80%. Najczęściej są to delecje lub mutacje punktowe powodujące przede wszystkim wskutek przesunięcia ramy odczytu mutacje typu "nonsense", kiedy od miejsca mutacji dochodzi do syntezy nieprawidłowego białka lub skróconego łańcucha białka [55].

Cechą znaną nowotworów powstałych pod wpływem mutacji p53 jest zwiększenie wpływu egzogennych karcynogenów na występowanie mutacji w określonych pozycjach genu p53 (tzw. miejsca gorące – *hot spot*) wraz z występowaniem określonych nowotworów w określonych narządach. Tak na przykład w krajach o wysokiej częstotliwości występowania wirusa B zapalenia wątroby oraz aflatoksyny w produktach spożywczych występują mutacje w podobnych rejonach genu p53, przy czym sądzi się, że rak wątroby w tych przypadkach jest wynikiem współdziałania wymienionych kancerogenów na gen p53 [14, 39, 44].

REGULACJA WZROSTU KOMÓREK PRZEZ p53

Wprowadzenie typu dzikiego p53 lub jego cDNA do komórek nowotworowych w hodowli powoduje zahamowanie ich wzrostu [16, 29, 57, 89].

Badania przeprowadzone na liniach komórkowych oraz zwierzętach wykazały, że zatrzymanie wzrostu komórek w hodowli następuje w fazie G1 cyklu komórkowego lub w mitozie, powodując jednocześnie zmniejszenie lub zanik potencjału rakotwórczego tych komórek [16, 89]. Z danych tych wynika, podobnie jak w przypadku siatkowczaka, że utrata heterozygotyczności, czyli utrata obydwu alleli genu p53, jest przyczyną rakowacenia [16].

Transformowane fibroblasty szczurze (transformowane przez wrażliwe na temperaturę mutanty p53 lub ras) przestają rosnąć w późnej fazie G1 nie dochodząc do fazy S cyklu komórkowego. Mutanty p53 w temperaturze 37–39,5°C znajdują się w cytoplazmie, natomiast w temperaturze 32°C przechodząc do jądra komórkowego zachowują się jak typ dziki, powodując tym samym zatrzymanie wzrostu komórek nowotworowych [55, 57]. Komórki nowotworowe zatrzymane we wroście przez p53 uzyskują na powrót normalną morfologię, rosną mniej zwarcie i stają się trudniej przeszczepialne. Przechodzenie zmutowanego p53 w niższych temperaturach do jądra komórkowego wraz z pojawieniem się efektu przeciwnowotworowego wskazuje na jego prawdopodobny wpływ na regulację ekspresji genu (transkrypcję), wskutek czego ilość zmutowanego p53 maleje prowadząc jednocześnie do przewagi allelu dzikiego powodującego zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych [57].

MOLEKULARNY MECHANIZM DZIAŁANIA p53

Obecnie wysuwane są dwie hipotezy: p53 może tworzyć kompleksy z inicjującym kompleksem replikacji DNA lub bezpośrednio wpływać na proces transkrypcji. Za wchodzeniem białka p53 w kompleks czynników tworzących kompleks inicjacyjny replikacji DNA przemawiają badania wskazujące na jego wiązanie się z antygenem T wirusa SV40 [6, 13, 32, 85, 88]. Białko p53 wiąże się z antygenem T SV40, który jak wiadomo wpływa na zapoczątkowanie replikacji DNA działając jako helikaza. Antygen T SV40 wiąże się również z komórkową alfa polimerazą DNA niezbędną do syntezy DNA wirusa SV40. Typ dziki p53, ale nie zmutowany, łącząc się z antygenem T wirusa SV40, uniemożliwia utworzenie kompleksu replikacyjnego DNA SV40, jak również jego wiązanie z polimerazą DNA. Ponadto p53 może zahamować aktywność helikazy zależnej od ATP. Ponieważ formy zmutowane p53 nie mogą wiązać się z antygenem T SV40 – nie mogą przeciwdziałać utworzeniu kompleksu replikacyjnego DNA wirusa i tym samym nie mogą hamować namnażania wirusa niezbędnego dla jego efektu nowotworowego – tym samym nie mogą przeciwdziałać powstaniu nowotworu. Z kolei zmutowany p53 ze względu na swoje właściwości wiązania elementów komórkowych potrzebnych do inicjacji replikacji DNA może działać nowotworowo na tej samej zasadzie, co wirus SV40 lub też inne wirusy [6, 13, 16, 32, 85, 88]. Poza tym białko p53 wpływa na transport z jądra do cytoplazmy, ponieważ łącząc się z białkami biorącymi udział w tym transporcie mogą w wypadku mutacji p53 wpływać na syntezę białka [55, 57, 72].

p53 jako transaktywator transkrypcji może zarówno stymulować, jak i hamować syntezę mRNA [28, 72]. C-terminalny koniec p53 (amfipatyczny) umożliwia prawdopodobnie roz-

poznanie i wiązanie odpowiedniej sekwencji DNA, natomiast kwasowy, N-terminalny koniec p53 składający się z 75 reszt aminokwasowych może łączyć się z regionem wiążącym DNA innego białka (np. z GAL-4 – regionem wiążącym galaktozy), czego następstwem może być pobudzenie transkrypcji (np. galaktozydazy). Mutacje p53 w poz. 135 lub 215 tracą zdolność transaktywacji transkrypcji genu, natomiast mutant reszty aminokwasowej w pozycji 273 aktywność tę zatrzymuje [28]. Dane te dowodzą, że niektóre ze zmutowanych p53 w zależności od miejsca mutacji mogą wpływać na transkrypcję aktywująco lub hamująco, co prawdopodobnie jest przyczyną, że zmutowany p53 działa na onkogenezę raz pobudzająco, innym razem hamująco.

Z uwagi na możliwość działania produktów genów przeciwnowotworowych poprzez wpływ na różnicowanie się komórek, przeprowadzono badania wpływu p53 typu dzikiego na komórki białaczki szpikowej. Objawów różnicowania nie stwierdzono, natomiast komórki te szybko traciły żywotność, przyjmując charakterystyczną postać komórek zaprogramowanych do ich śmierci, czemu można było zapobiec przez stosowanie interleukiny-6 [90].

Nadmierna ekspresja interleukiny-6 występuje często w komórkach nowotworowych, wywodzących się z komórek B lub T, wykazujących zmutowane formy p53. W przeprowadzonych badaniach p53 typu dzikiego hamowało nadprodukcję interleukiny-6, natomiast zmutowane formy p53 zarówno pochodzenia mysiego, jak i ludzkiego były pod tym względem mało aktywne [76]. Z badań przeprowadzonych z użyciem różnych czynników proliferacji wynika, że p53 typu dzikiego hamuje proces transkrypcji. Na podstawie analogicznie przeprowadzonych badań w siatkówczakach autorzy [76] wnioskują, że zarówno p53, jak i produkt genu RB wpływają na proces transkrypcji w drodze modulacji genu interleukiny-6 podczas procesu różnicowania i onkogenezy.

GENY PRZECIWNOWOTWOROWE ZAPOBIEGAJĄCE PRZERZUTOM

Punktem wyjścia do wykrycia tych genów były badania mysiego czerniaka [74]. Porównując występowanie przerzutów wśród różnych szczepów czerniaka, autorzy wykryli szczepy o wybitnej i minimalnej zdolności tworzenia przerzutów. W badaniach genetycznych wykazali, że właściwość ta jest uwarunkowana genetycznie i zależy od genu, który nazwali *nm23* (*non-metastatic*, 23 kolejny badany gen). Wyniki te rychło zostały potwierdzone przez kilka grup badawczych, zwłaszcza na larwach drozofili, w których gen ten nazwano *awd* (od *abnormal wing disc*), był on identyczny z genem *nm23* [74].

Rychło okazało się, że podczas eksperymentalnego zakażenia adenowirusem E1a pod wpływem tego samego genu ilość przerzutów uległa zmniejszeniu [77]. Ponadto wykazano, że w silnie przerzutowym raku piersi ilość produktu genu *nm23* jest wyraźnie zmniejszona [7] i wreszcie że transfekcja normalnym genem *nm23* szczepu komórek czerniaka powoduje zmniejszoną częstość występowania raka z jednoczesną zmniejszoną przerzutowością [30].

Badania przeprowadzone na *Dictyostelium discoideum* (gatunek śluzowca) wykazały, że organizm ten w dobrych warunkach bytowania tworzy komórki żyjące oddzielnie. W złych warunkach żywieniowych (podczas głodu) komórki te łączą się w agregaty, które po pewnym czasie ulgając różnicowaniu tworzą rodzaj spor. Proces różnicowania odbywa się przy udziale GTP powodującego aktywację genu kodującego syntezę kinazy NDP (kinazy nukleo-

zydo-dwufosforanowej syntetyzującej GTP lub inne nukleozydy trójfosforanowe) poprzez dodanie grupy fosforanowej do GDP lub innego nukleozydu. Przeprowadzone badania wykazały, że gen NDP jest aktywowany przez produkt genu nm23 lub awd, które wpływając na syntezę GTP (poprzez kinazę NDP) powodują aktywację wzrostu i różnicowania komórek w procesie rozwojowym. Tak więc gen nm23 (lub awd) wpływając na przenoszenie sygnałów do wnętrza komórki (bakterii, drozofili, *Dictyostelium*) staje się kluczowym genem wzrostu i różnicowania komórek, którego aberracje (wskutek mutacji) mogą powodować nowotworzenie, jak również zwiększoną przerzutowość nowotworów [59].

BIAŁKO PRZECIWNOWOTWOROWE MCC

Ostatnio wykrytym produktem genu przeciwnowotworowego jest białko MCC (od *mutated in colorectal cancer*) [50], którego rola zdaje się stanowić niezwykle ważny element współczesnej wiedzy na temat inicjacji i progresji hiperproliferujących zmian prowadzących do powstawania polipów jelita grubego, które z kolei mogą przejść w raki jelita. Grupa Vogelsteina, która dotąd uważała, że inicjacja raka jelit powstaje z jednej strony w wyniku nadprodukcji onkogenu (np. ras), a z drugiej strony z niedoboru produktów dwóch genów przeciwnowotworowych produkujących bliżej nieokreślone białko o zdolności adhezji do komórki oraz białko p53. Obecnie grupa ta jest skłonna uważać, że nie dwa, lecz trzy białka przeciwnowotworowe zapobiegają powstaniu nowotworu, przy czym tym trzecim białkiem jest właśnie białko MCC [11].

Punktem wyjścia do wykrycia białka MCC były dwie obserwacje: w polipach jelita grubego stwierdzano występowanie defektu genu zlokalizowanego w chromosomie 5q21, natomiast w sporadycznie występujących polipach jelita grubego stwierdzano delecje DNA w lub w pobliżu tego genu w chromosomie 5q21. Genem ulegającym mutacji w rodzinie występujących polipach jelita grubego FAP (od *familial adenomatous polyposis*) jest prawdopodobnie gen MCC. Kinzler i wsp. [50] wykryli uderzające podobieństwo 19 reszt aminokwasowych białka MCC i m3-muskaryno-acetylocholinowego receptora (mAChR), stymulującego fosfoinozytydowo-specyficzną fosfolipazę C poprzez białko grupy G, prawdopodobnie Gq. Na wymienionych 19 reszt aminokwasowych 9 było identycznych, w tym 6 występujących po sobie, analogicznych do fragmentu białka G, wchodzącego w interakcję z wymienionym receptorem. Interakcja ta stanowi zapoczątkowanie toru sygnalizacyjnego do wnętrza komórki poprzez produkcję fosfoinozytydowo-specyficznej fosfolipazy C.

Na podstawie podobieństwa białek MCC i G Bourne sugeruje następujący mechanizm ich współdziałania [11, 50]. Białko MCC łącząc się z receptorem (np. m3AChR) hamuje czynność białka Gq (lub innego białka G) hamując w ten sposób mitogenny dla wielu komórek tor Ca^{2+} /fosfoinozytydowy. Mutacje MCC wyłączając kontrolne działanie tego toru (hamujące) mogą spowodować nadmierną proliferację komórek aż do powstania nowotworu.

W celu potwierdzenia tej hipotezy założono, że białko MCC powinno hamować proliferujący wpływ fosfoinozytydowo-specyficznej fosfolipazy C na komórki w hodowli [11]. Badania przeprowadzone na komórkach drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) wykazały, że występująca u nich kinaza CDC39 ma korygujący wpływ na namnażanie. Powstało pytanie, czy MCC i CDC39 są identyczne? Przeprowadzone badania wykazały, że białka te nie są identyczne, nawet znacznie się różnią. Natomiast badania te wykazały, że MCC ma wiele cech

wspólnych z miozyną, keratyną, laminami i szeregiem innych białek, w których ogólną cechą jest występowanie w konfiguracjach wzajemnego owijania się dookoła siebie (*coiled coil*). Stąd defekty białka MCC mogą mieć tak wielką różnorodność, zaś efekty kliniczne tak wielką różnorodność ich objawów wywołanych MCC (od proliferacji poprzez polipowatość i wreszcie zrakowacenie jelita grubego).

Efekt przeciwnowotworowy białka MCC wprowadza nas w sferę wpływu białek G (guanylowych) w procesy kancerogenezy i efektów przeciwnowotworowych [53, 62, 92]. Od dawna wiadano, że białka grupy G w przeciwieństwie do ATP stanowią lub przewodzą sygnały dla mitotycznej czynności komórek. Do grupy białek G należą m.in. czynniki wywołujące translację (np. czynnik elongacji translacji u bakterii EF-Tu) oraz niektóre z onkogenów (np. p21^{ras}) [50].

Rodzina białek G (*GTPase-superfamily*) odgrywa ogromną rolę w procesach rozrostowych komórek. Typową cechą tych białek jest zmieniające się powinowactwo do różnych makromolekuł. Włączanie i wyłączenie sygnałów odbywa się przez hydrolizę GTP na GDP, przy czym jest to reakcja powolna, przyspieszana przez odpowiednie enzymy. Reakcje GTP/GDP mają charakter cykliczny, przy czym przejście GTP w GDP odbywa się przy udziale enzymu GNRP (*guanine nucleotide release proteins*), natomiast przemiana GDP w GTP odbywa się przy udziale enzymu GAP (*GTPase activating proteins*). Dzięki współdziałaniu licznych białek w reakcjach GTP/GDP reakcje te są kontrolowane, przyspieszane lub hamowane oraz ukierunkowywane [50]. Sugeruje się, że jednym z takich ważnych białek jest białko MCC, przy czym białka G nie odgrywają roli jeszcze jednych onkogenów [53, 62], a przeciwnie mogą mieć wpływ hamujący produkty onkogenów (np. c-ras) [92].

GENY PRZECIWNOWOTWOROWE A PROCES RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

Początek badań nad genami przeciwnowotworowymi był związany z procesem różnicowania komórek na przykładzie niezróżnicowanych retinoblastów zdolnych do przejścia w komórki nowotworowe siatkówczaka i końcowo zróżnicowanych retinocytów nie poddających się temu procesowi. Dotąd omówione badania dotyczą raczej kontroli proliferacji komórek. Na wyjaśnienie powiązania funkcji genów przeciwnowotworowych z procesami różnicowania będziemy musieli prawdopodobnie poczekać do poznania biochemicznych mechanizmów różnicowania.

W jednej z pierwszych publikacji na temat genów przeciwnowotworowych w badaniach drozofili Elisabeth Gateff wysunęła tezę, że geny nowotworowe drozofili stanowią geny rozwojowe (*developmental genes*), w których zaburzeniu uległ stosunek proliferacji do różnicowania komórek [34].

W doskonałym przeglądzie Kleina [51] sprawa ominięcia bloku różnicowania w nowotworach jest szeroko dyskutowana. Spośród licznych przykładów tego autora wymienię tylko najbardziej istotne, wskazujące pośrednio na rolę procesu różnicowania w onkogenezie. Mięsak Rousa, mający w swym genomie wrażliwy na temperaturę onkogen ts-v-src, we właściwej dla niego temperaturze powoduje transformację komórek miogenicznych w permanentnie rosnące komórki mięsaka Rousa. Jeżeli jednak nawet na krótki okres komórki te znajdują się w nieodpowiedniej dla wirusa temperaturze, komórki miogeniczne ulegają nie-

odwracalnemu zróżnicowaniu do miotub i już nigdy nie mogą przejść (nawet w temperaturze odpowiedniej dla wirusa Rousa) w komórki mięsaka Rousa, ponieważ podobnie jak w przypadku retinocytów komórki miogeniczne zróżnicowane do miotub nie mogą ulec różnicowaniu do komórek miogenicznych zdolnych do transformacji nowotworowej mięsaka J. Rousa. Na tym przykładzie jest widoczne, że okres wrażliwości komórki na działanie onkogenu jest stosunkowo krótki, a po jego przekroczeniu komórka przechodzi już ostateczne zróżnicowanie stając się niepodatną na działanie wirusa. Bardziej ogólny wniosek z tego doświadczenia polega na stwierdzeniu, że skoro komórka już raz przeszła pewne stadium różnicowania, proces ten staje się nieodwracalny, a komórka nie ulega transformacji nowotworowej.

Dalszym potwierdzeniem przeciwnowotworowego mechanizmu procesu różnicowania się komórek jest fakt, że silne bodźce różnicujące komórki są zdolne spowodować dalsze różnicowanie komórek nowotworowych osłabiając jednocześnie ich onkogeniczne działanie [51]. Takim przykładem jest wywołanie zróżnicowania promielocytowej linii komórek białaczkowych HL60 pod wpływem TPA (*12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) do makrofagów lub pod wpływem kwasu retinoidowego do granulocytów, przy czym komórki te doprowadzone do końcowego zróżnicowania mają niski poziom genu *c-myc*, podczas gdy komórki białaczkowe HL60 wykazywały typową dla procesu nowotworowego, wywołanego tym onkogenem, wysoką amplifikację *c-myc* 40–60 razy.

Szczególnie przekonującego dowodu roli terminalnego zróżnicowania w procesie nowotworowym dostarczyły badania nad odrzucaniem przeszczepu nowotworowego [48]. W badaniach tych przeprowadzonych *in vitro* odsetek komórek białaczkowych różnicujących do makrofagów był odwrotnie proporcjonalny do stężenia komórek przy stałym poziomie czynnika różnicowania (bliżej nieokreślonego). Komórki białaczkowe po 7 dniach hodowli przeszczepione szczurom okazały się być letalne (z powodu białaczki), natomiast przeszczepione po 21 dniach hodowli były odrzucane (były w stanie zróżnicowania). Dalsze badania wykazały, że tkanki 21-dniowych hodowli zawierały znacznie więcej czynnika różnicowania niż 7-dniowe. Wreszcie szczury z 7-dniową białaczką traktowane czynnikiem różnicowania wykazywały regresję białaczki.

Na podstawie analizy wyżej wymienionych i innych przykładów Klein [51] sugeruje, że liczne lub może nawet wszystkie komórki nowotworowe można doprowadzić odpowiednimi induktorami do zróżnicowania (dojrzwiania). Reaktywność komórek nowotworowych na te czynniki zmniejsza się podczas progresji wzrostu nowotworu, kiedy w komórkach tych zwiększa się ilość onkogenu, a maleje ilość produktów przeciwnowotworowych należących do czynników regulujących różnicowanie.

Na ogół jako słuszną przyjmuje się też hipotezę Comingsa [cyt. za 51], że komórka ma strukturalne "transformujące" geny aktywne w okresie embriogenezy, a ulegające supresji podczas różnicowania przez dominujące geny supresorowe lub regulatorowe. Utrata tych genów znosi supresję, a stała ekspresja genów transformujących prowadzi do nowotworu.

Przedstawiając temat genów przeciwnowotworowych jako czynników regulatorowych wzrostu i różnicowania komórek, pragnę nadmienić, że te niezwykle ważne dla poznania procesu onkogenezy badania weszły na właściwe tory dopiero od 2–3 lat, kiedy rozpoczęły się badania tych procesów metodami biologii i genetyki molekularnej. Stąd trudno już teraz o końcowe wnioski. Wydaje się jednak, że kontynuacja tych badań być może w niezbyt odległym czasie powinna przynieść istotne elementy poznawcze nowotworów i być może znajdą one praktyczne rozwiązania dla skutecznej terapii nowotworów.

PODZIĘKOWANIE

Na zakończenie poczuwam się do miłego obowiązku złożenia serdecznego podziękowania prof. drowi M. Ferguson-Smithowi i dr Marii Ferguson-Smith za zaproszenie na miesięczny pobyt w Uniwersytecie w Cambridge, gdzie znalazłem właściwe warunki dla opracowania niniejszego tematu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BAGCHI S, WEINMANN R, RAYCHAUDHURI P. The retinoblastoma protein copurifies with E2f-I, an E1A-inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 1991; **65**: 1063–1072.
- [2] BAKER S, MARKWITZ S, FEARON E, WILLSON J, VOGELSTEIN B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; **249**: 912–915.
- [3] BALTER M. Cell cycle research: Down to the nitty gritty. *Science* 1991; **252**: 1253–1254.
- [4] BANDARA L, ADAMCZEWSKI J, HUNT T, LA THAGUE N. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature* 1991; **352**: 249–251.
- [5] BANDARA L, LA THAGUE N. Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 1991; **351**: 494–497.
- [6] BARGONETTI J, FRIEDMAN P, KERN S, VOGELSTEIN B, PRIVES C. Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequence adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 1987; **65**: 1083–1091.
- [7] BEVILACQUA G, SOBEL M, LIOTTA M, STEEG P. Association of low nm23 mRNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer* 1989; **49**: 185–190.
- [8] BISHOP JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; **235**: 305–311.
- [9] BOOKSTEIN R, LEE Y-H, TO H, YOUNG L-J, SERY T, HAYES R, FRIEDMANN T, LEE H-W. Human retinoblastoma susceptibility gene: genomic organization and analysis of heterozygous intragenic deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 2210–2214.
- [10] BOOKSTEIN R, RIO P, MADREPERLA S, HONG F, ALLRED C, GRIZZLE W, LEE W-H. Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7762–7766.
- [11] BOURNE HR. Consider the coiled coil... *Nature* 1991; **351**: 188–190.
- [12] BOURNE HR, SANDERS DA, MCCORMICK F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991; **349**: 117–126.
- [13] BRAITWAITE A, STURZBACHER H, ADDISON C, PALMER C, RUDGE K, JENKINS J. Mouse p53 inhibits SV40 origin-dependent replication. *Nature* 1987; **329**: 458–460.
- [14] BRESSAC B, KEW M, WANDS J, OZTURK M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; **350**: 429–431.
- [15] CHELLAPAN SP, HIEBERT S, MUDRYJ M, HOROWITZ J, NEVINS JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 1991; **65**: 1053–1061.
- [16] CHEN P-L, CHEN Y, BOOKSTEIN R, LEE W-H. Genetic mechanism of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; **250**: 1576–1579.
- [17] CHEN P-L, SCULLY P, SHEW J-Y, WANG J, LEE W-H. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989; **58**: 1193–1198.
- [18] CHITTENDEN T, LIVINGSTON D, KAELIN jr. W. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 1991; **65**: 1073–1082.
- [19] COWELL J, RUTLAND P, HUNGERFORD J, JAY M. Deletion of chromosome 13q14 is transmissible and does not always predispose to retinoblastoma. *Hum Genet* 1988; **80**: 43–45.
- [20] DE CAPRIO J, LUDLOW JW, LYNCH D, FURUKAWA Y, GRIFFIN J, PIWNICA-WORMS, HUANG CM, LIVINGSTON DM. The product of the retinoblastoma susceptibility gene properties of the cell cycle regulatory element. *Cell* 1989; **58**: 1085–1095.
- [21] DEFOE-JONES D, HUANG P, JONES RE, HASKELL K, VUOKOLO G, HANOBİK M, HUBER A, OLIFF A. Cloning of cDNA for cellular proteins that bind the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; **352**: 251–254.
- [22] DRAETTA J, LUCA F, WESTENDORF J, BRIZUELA L, RUDERMAN J, BEACH D. cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 1989; **56**: 829–838.

- [23] DRYJA TP, MUKAI S, PETERSEN R, WALTON D, YANDELL, RAPAPORT J. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature* 1989; **339**: 556–558.
- [24] EDGAR BA, O-FARELL PH. Genetic control of cell division pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 1989; **57**: 177–187.
- [25] ELIYACHU D, MICHALOVITZ D, ELIYACHU S, PINHASI-KIMHI O, OREN M. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 8763–8767.
- [26] ENOCH T, NURSE P. Coupling M phase and S phase: Controls maintaining the dependence of mitosis on chromosome replication. *Cell* 1991; **65**: 921–923.
- [27] FANG F, NEWPORT JW. Evidence that S1-S and G2M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* 1991; **66**: 731–742.
- [28] FIELDS S, JANG S. Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 1990; **249**: 1046–1049.
- [29] FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; **57**: 1083–1093.
- [30] FLATOW LA, KING CR, SANDEEN M, MARGULIES JM, LIOTTA LA, STEEG P. Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991; **65**: 25–35.
- [31] FOULDS L. The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res* 1954; **14**: 317–339.
- [32] GAMON JV, LANE DP. p53 and DNA polymerase α competes for binding SV40 antigen. *Nature* 1987; **329**: 456–458.
- [33] GAMON JV, LANE DP. Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 1991; **349**: 802–805.
- [34] GATEFF E. Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1978; **200**: 1448–1458.
- [35] GAUTIER J, MINSHULL J, LOHKA M, GLOTZER M, HUNT T, MALLER J. Cyclin is a component of the maturation promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 1990; **60**: 487–494.
- [36] GHIARA JB, RICHARDSON HE, SUGIMOTO K, HENZE M, LOW JD, WITTENBERG C, REED SI. A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: Chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell* 1991; **65**: 163–174.
- [37] GLOTZER M, MURRAY A, KIRSCHNER M. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 1991; **349**: 132–138.
- [38] HARBOUR J, LAI S-H, WHANG-PENG J, GAZDAR A, MINNA J, KAYE F. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988; **241**: 353–356.
- [39] HARRIS A. Telling changes of base. *Nature* 1991; **350**: 377–378.
- [40] HARTWELL LH, WEINERT TA. Checkpoints: Control that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; **246**: 629–634.
- [41] HOLSTEIN M, METCALF R, WELSH J, MONTESANO R, HARRIS C. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **67**: 9958–9961.
- [42] HOROWITZ JM, YANDELL D, PARK SH, CANNING S, WHYTE P, BUCHKOVICH K, HARLOW E, WEINBERG RA, DRYJA TP. Point mutation inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989; **243**: 937–940.
- [43] HOWE JA, MYMRYK JS, EGAN C, BRANTON P, BAYLEY S. Retinoblastoma growth suppressor and a 300-kDa protein appear to regulate cellular DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5883–5887.
- [44] HSU TC, METCALF RA, SUN T, WELSH J, WANG NJ, HARRIS CC. Mutational hot spot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1991; **350**: 427–428.
- [45] HUANG S, LEE W-H, LEE E. A cellular protein that competes with SV40 T antigen for binding to the retinoblastoma gene product. *Nature* 1991; **350**: 160–163.
- [46] HUANG HJ, YEE J-K, SHEW J-Y, CHEN P-L, BOOKSTEIN R, FRIEDMANN T, LEE E, LEE W-H. Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 1988; **242**: 1563–1566.
- [47] HUNT T. Cell cycle gets more cyclins. *Nature* 1991; **350**: 462–463.
- [48] JIMENEZ JJ, YUNIS AA. Tumor cell rejection through terminal cell differentiation. *Science* 1987; **238**: 1278–1280.
- [49] KAWIAK J. Regulacja cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 325–333.
- [50] KINZLER KW i inni. *Science* 1991; **251**: 1366–1370 (cyt. za 11).
- [51] KLEIN G. The approaching era of tumor suppressor genes. *Science* 1987; **238**: 1539–1545.
- [52] KNUDSON AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 820–823.

- [53] LANDIS G, MASTERS S, SPADA A, PACE A, BOURNE HR, VALLAR R. GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_s and stimulate adenyl cyclase in human pituitary tumors. *Nature* 1989; **340**: 692–695.
- [54] LEE E, TO H, SHEW J-Y, BOOKSTEIN Y, SCULLY P, LEE W-H. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 1990; **250**: 1233–1238.
- [55] LEVINE A, MOMAND J, FINLAY C. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; **351**: 453–456.
- [56] MALKIN D, LI F, STRONG L, FRAUMENI J, NELSON G, KIM D, KASSEL J, GRYKA M, BISHOFF F, TAINSKY M, FRIEND S. Germline p53 mutation in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 1990; **250**: 1233–1238.
- [57] MARTINEZ J, GEORGOFF J, MARTINEZ J, LEVINE AJ. Cellular localisation and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes-Development* 1991; **5**: 151–159.
- [58] MARX J. The cell cycle coming under control. *Science* 1989; **245**: 252–255.
- [59] MARX J. New clue to cancer metastasis found. *Science* 1990; **249**: 482–483.
- [60] MARX J. Genetic defect identified in rare cancer syndrome. *Science* 1990; **250**: 1209.
- [61] MARX J. The cell cycle: spinning further afield. *Science* 1991; **252**: 1490–1492.
- [62] MCCORMICK F. Gasp: not just another oncogene. *Nature* 1989; **340**: 678–679.
- [63] MICHALOVITZ D, HALEVY O, OREN M. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 1990; **62**: 671–680.
- [64] MOLL T, TEBB G, SURANA U, ROBITSCH H, NASMYTH K. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell-cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW15. *Cell* 1991; **66**: 743–758.
- [65] MOKOTURA T, BLOOM T, KIM H, JÜPPNER H, RUDERMAN J, KRONENBERG H, ARNOLD A. A novel cyclin encoded by bc1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; **350**: 512–514.
- [66] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Cyclin synthesis and the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989; **339**: 275–280 and 280–285.
- [67] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989; **246**: 614–621.
- [68] MURRAY AW, KIRSCHNER MW. What controls the cell cycle. *Sci Amer March* 1991: 34–41.
- [69] NURSE P. Universal control mechanism regulating onset of M phase. *Nature* 1990; **344**: 503–508.
- [70] PONDER B. Gene losses in human tumours. *Nature* 1988; **335**: 400–402.
- [71] PONDER B. Inherited predisposition to cancer. *TIG* 1990; **6**: 213–218.
- [72] RAYCROFT L, WU H, LOZANO G. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 1990; **249**: 1049–1051.
- [73] RODRIGUES N, ROWAN A, SMITH M, KER I, BODMER W, GANNON J, LANE D. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 7555–7559.
- [74] ROSENGARD AM, KRUTSCH HC, SHEARN A, BIGGS J, BARKERE, MARGULIES I, KING CR, LIOTTA LA, STEEG PS. Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989; **342**: 177–180.
- [75] SAGER R. Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 1989; **246**: 1406–1412.
- [76] SANTHANAN U, RAY A, SEHGAL P. Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7605–7609.
- [77] STEEG PS, BEVILACQUA G, POZZATTI R, LIOTTA LA, SOBEL ME. Altered expression of nm23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus E1a inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 1988; **48**: 6550–6553.
- [78] STRAUSFELD U, LABBEE JC, FESQUET D, CAVADORE JC, PICARD A, SADHU K, RUSSEL P, DOREE M. Dephosphorylation and activation of a p34^{cdc2}/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 1991; **351**: 242–244.
- [79] SURANA U, ROBITSCH H, PRICE C, SHUSTER T, NASMYTH K. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* 1991; **65**: 145–162.
- [80] TAKAHASHI T, NAU M, CHIBA I, BIRBER M, ROSENBERG R, VINCOUR M, LEVITT M, PASS H, GAZDAR A, MINNA J. p54: a frequent target for genetic abnormalities on lung cancer. *Science* 1989; **246**: 491–493.
- [81] TANAKA K, OSHIMURA M, KIKUCHI R, SEKI M, HAYASHI T, MIYAKI M. Suppression of tumorigenicity in human colon carcinoma cells by introduction of normal chromosome 5 or 18. *Nature* 1991; **349**: 340–342.
- [82] d'URSO G, MARRACINO RL, MARSHAK DR, ROBERTS JM. Cell cycle control of DNA replicating by a homologue from human cells of the p34^{cdc2} protein kinase. *Science* 1990; **250**: 786–791.
- [83] WAGNER S, GREEN M. Retinoblastoma, a transcriptional tryst. *Nature* 1991; **352**: 189–190.

- [84] WANG J, CENIVESSE X, HANGLEIN B, BRECHOT C. Hepatitis B virus integration in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990; **343**: 455–457.
- [85] WANG EH, FRIEDMAN PN, PRIVES C. The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA in vitro by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell* 1989; **57**: 379–392.
- [86] WEINBERG RA. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 1985; **230**: 770–776.
- [87] WEINBERG RA. The retinoblastoma gene and cell growth control. *TIBS* 1990; **15**: 199–202.
- [88] WILCOCK D, LANE D. Localization of p53, retinoblastoma and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells. *Nature* 1991; **349**: 429–431.
- [89] WOLF D, HARRIS N, ROZTER V. Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-Mulv-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 1984; **38**: 119–126.
- [90] WÓJCIK C. Współczesne poglądy na temat regulacji cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 153–167.
- [91] YONISH-ROUACH, RESNITZKY D, LOTEM J, SACHS L, KIMCHI A, OREN M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; **352**: 345–347.
- [92] ZHANG K, DECLUE J, VASS W, PAPAGEORGE A, MCCORMICH F, LOWY D. Suppression of c-ras transformation by GTPase-activating protein. *Nature* 1990; **346**: 754–756.
- [93] ZHU X, DUNN J, PHILIPS R, GODDARD A, PATON K, BECKER A, GALLIE B. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. *Nature* 1989; **340**: 312–313.

Otrzymano: 03.10.1991

Przyjęto: 05.11.1991.

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

POWSTAWANIE I DEPOZYCJA MATCZYNYCH CZYNNIKÓW ROZWOJOWYCH W OOCYTACH BEZKRĘGOWCÓW*

FORMATION AND DEPOSITION OF MATERNAL DEVELOPMENTAL FACTORS IN THE OOCYTES OF INVERTEBRATES

Szczepan BILIŃSKI

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie. Za ustalenie biegunowości i przestrzennego planu zarodka *Drosophila melanogaster* odpowiedzialne są tzw. geny matczyne (*maternal-effect genes*). Geny te transkrybowane są wyłącznie z genomu matki (w czasie oogenezy), a ich produkty określa się jako "matczyne czynniki rozwojowe". Zgodnie ze współczesnymi poglądami geny matczyne podzielono na 4 grupy determinujące odpowiednio: biegun przedni (1), biegun tylny (2), struktury terminalne (1 i ostatni odcinek ciała) (3) oraz oś grzbietobrzuszną (4). Szczegółowo scharakteryzowano działanie 3 podstawowych genów: *bicoid* (grupa 1), *nanos* (grupa 2) i *dorsal* (grupa 3). Omówiono też funkcję innych genów matczynych w lokalizacji produktów *bicoid*, *nanos* i *dorsal*.

Słowa kluczowe: oogeneza, rozwój zarodkowy, geny matczyne.

Summary. In *Drosophila* the polarity and spatial pattern of the embryo are determined by maternal-effect genes. These genes are transcribed from maternal genome (during oogenesis), and their products are referred to as "maternal developmental factors". According to current hypotheses maternal effect genes have been divided into 4 groups required for the establishment of anterior pole (1), posterior pole (2), terminal structures (acron and telson) (3) and dorsoventral axis (4). The functioning of 3 central genes: *bicoid* (1st group), *nanos* (2nd group) and *dorsal* (3th group) is described. Furthermore, the involvement of other maternal-effect genes in the localization, and stability of *bicoid*, *nanos* and *dorsal* products is also discussed.

Key words: oogenesis, embryonal development, maternal-effect genes.

*Praca została wykonana w ramach grantu KBN "Cytoplazmatyczne podłoże gradientów rozwojowych w oocytach owadów"; PB 1868/4/91.

WPROWADZENIE

Mechanizmy genetycznej kontroli rozwoju zarodkowego najlepiej poznano u muchówki *Drosophila melanogaster*. Badania nad tym gatunkiem wykazały istnienie złożonego systemu specyficznych genów odpowiedzialnych za ustalenie podstawowego planu ciała: tj. jego osi i segmentacji. System ten składa się z 3 klas genów działających w kolejnych stadiach rozwoju. I tak produkty tzw. genów biegunowości (polarności) komórki jajowej (*egg-polarity genes*) [1] definiują przednio-tylną i grzbietowo-brzuszną oś zarodka, geny segmentacji (*segmentation genes*) [2] determinują podział zarodka na segmenty, a geny homeotyczne (*homeotic selector genes*) [3] zapewniają odrębność poszczególnych segmentów budujących ciało larwy. Dodatkowo klasę II (geny segmentacji) podzielono na 3 grupy: geny luki (*gap genes*), geny *pair-rule* i geny polarności segmentów (*segment polarity genes*). Geny poszczególnych klas i grup działają w ściśle określonej sekwencji (geny biegunowości komórki jajowej – geny luki – geny *pair rule* – geny polarności segmentów i geny homeotyczne) w ten sposób, iż produkty genów każdej z wymienionych grup kontrolują (regulują) ekspresję genów klasy następnej.

Klonowanie i molekularna analiza genów homeotycznych doprowadziły do odkrycia specyficznego, wspólnego dla tych genów elementu DNA tzw. *homeoboxu*. W ostatnich latach wykazano, że poza genami homeotycznymi *homeobox* zawierają też geny biegunowości komórki jajowej (np. *bicoid*), geny *pair rule* (*fushi tarazu*, *even-skipped*, *paired*) i geny polarności segmentów (*gooseberry*, *engrailed*), a także geny innych organizmów, w tym kręgowców. Sekwencje nukleotydowe *homeoboxów* rozmaitych analizowanych genów wykazują dużą homologię sięgającą w niektórych przypadkach 80%. Podobieństwo to jest jeszcze większe na poziomie białka. Sekwencja aminokwasowa *homeoboxu* sugeruje, że białka zawierające tę domenę (tzw. *domena homeo*) mają zdolność do wiązania się ze specyficznym odcinkiem DNA [19]. Warto też zwrócić uwagę, że w przypadku *Drosophila* większość genów zawierających *homeobox* zlokalizowano w prawym ramieniu trzeciego chromosomu. Geny te tworzą 2 bloki tzw. kompleks *Antennapedia* (ANT-C) i kompleks *Bithorax* (BX-C). Przypuszcza się, że geny obu bloków powstały przez duplikację i dywergencję hipotetycznego genu wyjściowego.

Zupełnie inny charakter mają geny luki (*gap*). Geny te nie zawierają *homeoboxu*, są natomiast homologiczne z genami kodującymi u kręgowców pewne białka regulacyjne (np. czynnik transkrypcyjny TF III A). W tym przypadku za interakcję z DNA odpowiedzialne są *domeny* zawierające cynk, tzw. palce cynkowe (*zinc fingers*).

Geny związane z ustaleniem planu ciała można też podzielić ze względu na czas i miejsce ich transkrypcji. Geny transkrybowane wyłącznie z genomu matczynego jeszcze w czasie trwania oogenezy są nazywane genami matczynymi (*maternal-effect genes*), natomiast geny aktywne dopiero po zapłodnieniu to tzw. geny zygotyczne (*zygotic-effect genes*). Do pierwszej kategorii należą prawie wyłącznie geny biegunowości komórki jajowej, do drugiej wszystkie pozostałe klasy i grupy genów. Na uwagę zasługują tu geny z grupy luki, stanowiące swoisty pomost pomiędzy genami matczynymi a pozostałymi genami zygotycznymi.

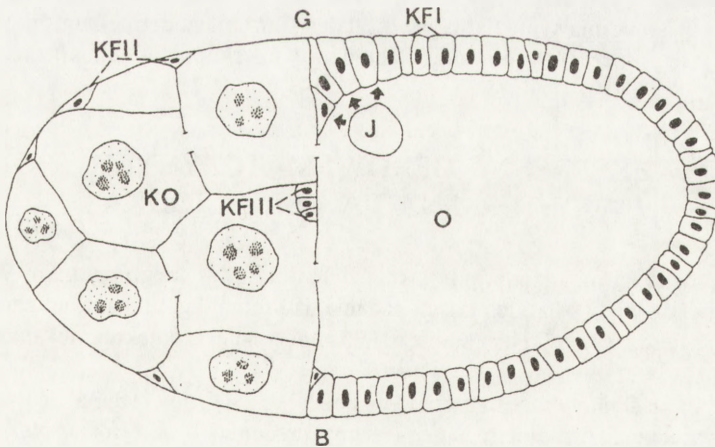
Niniejszy artykuł poświęcony jest genom matczynym i ich ekspresji. Szczególny nacisk zostanie położony na gromadzenie (depozycję) produktów tych genów, tzw. matczynych czynników rozwojowych. Warto też podkreślić, że prawie wszystkie nazwy genów pojawiające się w tym artykule pochodzą od nazw mutacji wywołujących określone nieprawidłowości rozwojowe. Dokonywana na rozmaitych poziomach analiza tych mutacji

pozwala wnioskować o funkcji normalnych alleli poszczególnych genów w rozwoju zarodkowym.

PRZEBIEG OOGENEZY I WCZESNYCH ETAPÓW ROZWOJU ZARODKOWEGO *DROSOPHILA MELANOGASTER*

W rozdziale tym zostaną przybliżone podstawowe procesy zachodzące w czasie oogenezy i wczesnej embriogenezy *Drosophila melanogaster*, co ułatwi zrozumienie kolejnych części artykułu. Należy pamiętać, że procesy te przebiegają podobnie, jeśli nie identycznie również u innych gatunków owadów.

Jajniki *Drosophila* składają się z licznych wydłużonych rurek zwanych owariolami. Część szczytowa owarioli zajęta jest przez germarium, w którym odbywają się mitotyczne podziały komórek płciowych. Pozostałą część owarioli stanowi witelarium składające się z szeregowo ułożonych komórek jajowych (patrz niżej). W wyniku synchronicznych podziałów mitotycznych oogonii w germarium powstają zespoły zbudowane z 16 komórek płciowych. Zespoły te otaczane są przez komórki somatyczne (komórki nabłonka folikularnego) i wędrują do witelarium. Równocześnie w każdym zespole 1 komórka różnicuje się we właściwy oocyt, a pozostałe stają się wspomagającymi oocyt komórkami odżywczymi. W ten sposób formowane są jednostki funkcjonalne jajnika – komory jajnikowe (rys. 1). W witelarium oocyty przechodzą 3 częściowo zachodzące na siebie fazy rozwoju: prewitelogenezę, witelogenezę i choriogenezę. W czasie prewitelogenezy w cytoplazmie oocytu (ooplazmie) gromadzone są rozmaite typy RNA. W procesie tym biorą udział przede wszystkim komórki odżywcze, podczas gdy jądro oocytu wykazuje tylko niewielką aktywność transkrypcyjną. Należy tu podkreślić, że depozycja RNA nie ustaje wraz z końcem fazy prewitelogenezy, trwa ona aż



Rys. 1. Schemat komory jajnikowej *Drosophila melanogaster* (stadium 10/11): B – strona brzuszna; G – strona grzbietowa; J – jądro oocytu; KFI – komórki folikularne otaczające oocyty; KFII, KFIII – komórki folikularne związane z komórkami odżywczymi; KO – komórki odżywcze; O – oocyt; strzałki wskazują rejon, w którym rozpoczyna się dywersyfikacja nabłonka folikularnego

do schyłku fazy następnej, kiedy to komórki odżywcze ulegają degeneracji. Podczas witelogenezy odkładane są materiały zapasowe: kule żółtka i krople lipidów. Białka żółtka (witelogeniny) wytwarzane są u *Drosophila* przez ciało tłuszczowe i nabłonek folikularny. Choriogenezę charakteryzuje bardzo silna aktywność komórek folikularnych, które syntetyzują prekursory osłon jajowych (osłonki żółtkowej i chorionu). Osłony te wspólnie stanowią tzw. kapsułę jajową (por. niżej).

Oogeneza *Drosophila melanogaster* została podzielona przez Kinga [28] na 14 stadiów, które kolejno odpowiadają: zespołom komórek płciowych w germarium (st. 1), prewitelogenezie (st. 2–7), witelogenezie (8–10) i choriogenezie (9–14).

Na początku fazy witelogenezy (stadium 8) jądro oocytu (pęcherzyk zarodkowy) wędruje ku powierzchni oocytu wyznaczając w ten sposób przysłą stronę grzbietową komórki jajowej (i zarodka) (rys. 1). W tym samym czasie nabłonek folikularny rozpoczyna złożony proces dywersyfikacji. W jego wyniku powstają liczne, różniące się strukturalnie i funkcjonalnie subpopulacje komórek folikularnych [12]. Odpowiedzialne są one za wytworzenie rozmaitych elementów kapsuły jajowej, np. wieczka, wyrostków oddechowych (por. [1]). Całkowicie uformowane jaja *D. melanogaster* są wydłużone i wyraźnie spolaryzowane. Strona grzbietowa jest spłaszczona, brzuszna lekko wypukła. Wyrostki oddechowe i wieczko wyznaczają pozycje bieguna przedniego.

Cytoplazma oocytu (ooplazma) nie wykazuje regionalnych różnicowań. Wyjątek stanowi tu obszar bieguna tylnego, w którym zlokalizowany jest tzw. oosom. Ten specyficzny rejon ooplazmy związany jest z determinacją komórek biegunowych, a w konsekwencji linii płciowej (patrz [5]).

Po zapłodnieniu jądro zygoty *Drosophila* ulega 9 synchronicznym podziałom, którym nie towarzyszą podziały cytoplazmy. W efekcie zarodek przekształca się w syncytium zbudowane z dużej liczby jąder zatopionych w masie żółtka. Nieco później większość powstałych jąder wwędrowuje do cytoplazmy powierzchniowej tworząc tzw. blastodermę syncytialną. Inny los spotyka jądra wnikaające w obszar oosomu; są one natychmiast otaczane błoną cytoplazmatyczną i stają się komórkami biegunowymi (rys. 2f). Po 4 dalszych synchronicznych podziałach jąder blastoderma syncytialna przekształca się w blastodermę komórkową. Dopiero w tym momencie poszczególne komórki blastodermi uzyskują indywidualność.

EKSPRESJA GENÓW MATCZYNYCH A DETERMINACJA OSI ZARODKA

Wszystkie dane zgromadzone w tym rozdziale dotyczą jednego gatunku. Warto jednak dodać, że prowadzone w ostatnich latach badania nad innymi gatunkami muchówek [11,41] wydają się potwierdzać wyniki osiągnięte dzięki genetycznej i molekularnej analizie rozwoju *Drosophila*.

Geny matczyne *D. melanogaster* dzieli się obecnie na 4 grupy [10, 35, 36]:

1 – geny bieguna przedniego (geny grupy przedniej – *anterior group*) związane z determinacją przedniej części zarodka;

2 – geny bieguna tylnego (geny grupy tylnej – *posterior group*) odpowiedzialne za determinację części tylnej zarodka i komórek biegunowych;

3 – geny struktur terminalnych (geny grupy terminalnej – *terminal group*) odpowiedzialne za powstanie pierwszego i ostatniego odcinka ciała (akronu i telsonu);

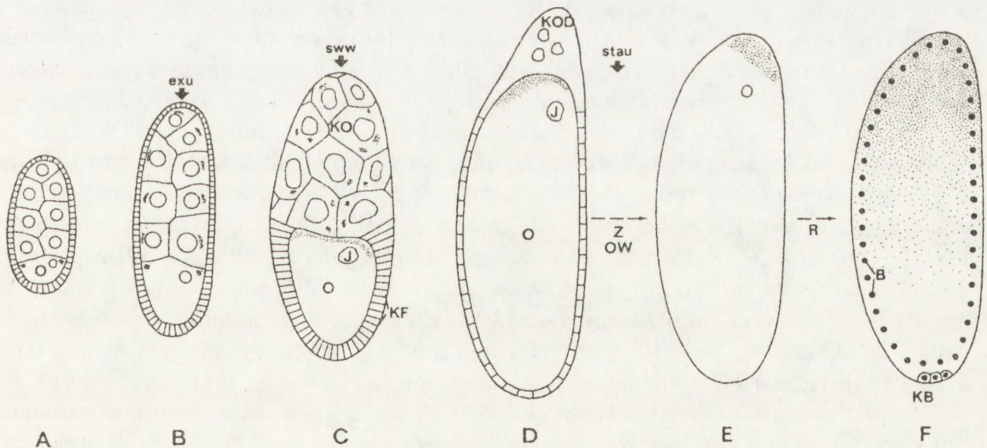
4 – geny osi grzbieto-brzuszej (geny grupy grzbietowej – *dorsal group*) determinujące grzbieto-brzuszną oś zarodka.

Geny grup 1–3 odpowiedzialne są za ustalenie osi przód-tył. Według Nüsslein-Volhard i wsp. [35, 36] interakcje pomiędzy genami tych grup są niewielkie; w efekcie duże obszary zarodka determinowane są niezależnie od siebie.

GENY GRUPY PRZEDNIEJ

Centralnym genem tej grupy jest niewątpliwie *bicoid* (*bcd*) [9]. Gen ten zlokalizowany jest w 3 chromosomie, w kompleksie *Antennapedia* (ANT-C), a kodowane przez niego białko zawiera (oczywiście) homeodomene. Białko to reguluje zgotychną ekspresję genu *hunchback* (*hb*) z grupy luki (patrz też niżej) [36]. Ostatnio wykazano, że białko *bicoid* wiąże się z promotorem *hb* i jest aktywatorem transkrypcji tego genu [49].

Ciekawe wyniki przyniosła analiza rozmieszczenia *bcd* RNA w kolejnych stadiach oogenezy [23]. W badaniach tych posłużono się metodą hybrydyzacji *in situ* (z otrzymanym uprzednio *bicoid* cDNA). Transkrypcja *bicoid* rozpoczyna się stosunkowo wcześnie, bo już w prewitelogenezie (stadium 5/6 wg Kinga). Początkowo transkrypt zlokalizowany jest wyłącznie w oocycie (rys. 2a), później pojawia się też w komórkach odżywczych (rys. 2b). W starszych komorach jajowych (stadium 10–12) cały wytworzony *bcd* RNA deponowany jest w cytoplazmie przedniego bieguna oocytu (rys. 2c–e). Podczas oogenezy, nawet w



Rys. 2. Schemat przedstawiający lokalizację *bicoid* RNA (obszary zakropkowane) w kolejnych stadiach oogenezy (a – stadium 8, b – 9, c – 10, d – 12) oraz w zarodku tuż po owipozycji (e); f – rozmieszczenie białka *bicoid* w stadium blastodermy syncytialnej, B – jądra blastodermy; J – jądra oocytu; KB – komórki biegunowe; KF – komórki folikularne; KO – komórki odżywcze; KOD – degenerujące komórki odżywcze; o – oocyt; OW – owipozycja; R – rozwój zarodkowy; Z – zapłodnienie; strzałki wskazują stadia, w których działają poszczególne geny (*exu*, *sww*, *stau*) związane z lokalizacją *bcd* RNA (wg Johnstona i wsp. [23] zmienione)

całkowicie wykształconych oocytach, *bcd* RNA nie ulega translacji. Proces ten jest inicjowany dopiero po złożeniu jaja (owipozycji). W stadium blastodermi syncytialnej białko *bcd* tworzy wyraźny, stromy gradient stężenia wzdłuż osi przód-tył. Gradient ten obejmuje około 2/3 zarodka, a jego maksimum występuje w obszarze bieguna przedniego (rys. 2f). Takie rozmieszczenie białka *bcd* powoduje, że transkrypcja genu *hb* aktywowana jest tylko w jądrach blastodermi przedniej części zarodka (patrz wyżej).

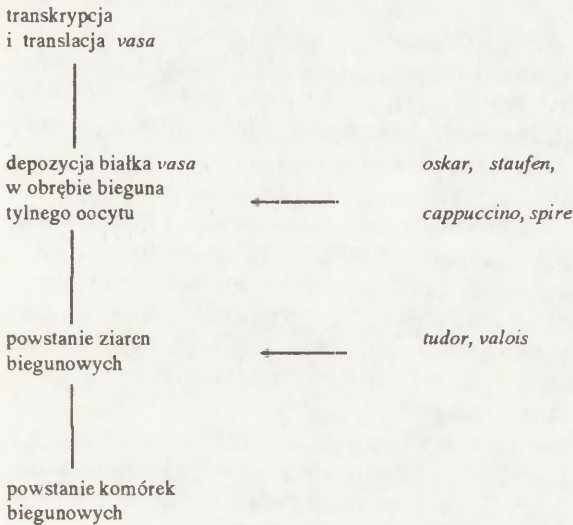
Pozostałe geny matczyne "grupy przedniej": *exuperantia* (*exu*), *swallow* (*sww*), *staufer* (*stau*) i *Bicaudal* (*Bic*) odpowiedzialne są za właściwe rozmieszczenie *bcd* RNA. Według Johnstona i wsp. [23] produkty genów *exu*, *sww* i *stau* działają w ściśle określonej sekwencji wpływając na kolejne fazy gromadzenia *bcd* RNA (rys. 2a-f).

Produkt *sww* jest najprawdopodobniej komponentem cytoszkieletu [23]. Brak tego białka mógłby powodować destabilizację elementów cytoszkieletu odpowiedzialnych za "zakotwiczenie" *bcd* RNA w cytoplazmie korowej bieguna przedniego. Zbliżoną funkcję można przypisać białku *Bicaudal D*, które wykazuje dużą homologię z łańcuchem ciężkim meromiozyny [51]. Z kolei produkt genu *stau* wydaje się być związany z lokalizacją również innych (poza *bicoid*) matczynych czynników rozwojowych (patrz niżej). W świetle powyższych danych jest oczywiste, iż białko *bcd* reprezentuje jedyny autonomiczny morfogen determinujący przednią część zarodka.

GENY GRUPY TYLNEJ

W ostatnich latach wykazano, że gen *hb* (grupa luki) ulega transkrypcji zarówno w fazie blastodermi syncytialnej (por. wyżej), jak i w rozwijających się oocytach [10, 48]. Gen ten jest więc równocześnie genem matczynym i zygotycznym. Początkowo (w czasie oogenezy) matczyne transkrypty *hb* rozmieszczone są w ooplazmie równomiernie. Po zapłodnieniu w tylnej części zarodka transkrypty te ulegają destabilizacji [48], co zapobiega gromadzeniu białka *hb* w tym rejonie. Za destabilizację *hb* RNA odpowiedzialny jest gen *nanos* (*nos*), którego produkt uważany jest za centralny morfogen grupy tylnej [30, 43, 48]. Działanie *nos* polega na wytworzeniu (w tylnej części zarodka) obszaru pozbawionego produktu *hb*. W strefie tej segmenty odwłoka determinowane są przez inne geny grupy luki: *Krüppel*, *knirps* i *tailless* [48]. Równocześnie w części przedniej zarodka (por. wyżej) dochodzi do aktywacji zygotycznej transkrypcji *hb* (pod wpływem gradientu *bcd*), co warunkuje powstanie głowy i tułowia. Lokalizację morfogenu *nanos* w ooplazmie bieguna tylnego [43, 50] zapewniają produkty genów: *pumilio*, *oskar*, *valois*, *vasa*, *staufer*, *tudor* [30] i *mago nashi* [6]. Wszystkie te geny, z wyjątkiem *pumilio*, związane są również z wytworzeniem oosomu i jego składników [30]. Innym ważnym genem grupy tylnej jest *caudal* (*cad*), który zawiera *homeobox*, a kodowane przez niego białko reguluje ekspresję genu *pair-rule* – *fushi-tarazu* [33, 34].

Jak już wyżej wspomniano, część genów należących do omawianej grupy warunkuje powstanie oosomu, a w konsekwencji komórek biegunowych. Produkty 3 genów *vasa*, *tudor* i *valois* są konieczne do uformowania charakterystycznego składnika oosomu, tzw. ziaren biegunowych [29]. Z kolei białka kodowane przez geny: *cappuccino*, *spire*, *oskar* i *staufer* są odpowiedzialne za lokalizację białka *vasa* w ooplazmie bieguna tylnego. Według Lasko i Ashburnera [29] właśnie *vasa* odgrywa ważną rolę w determinacji komórek biegunowych. Sekwencję procesów prowadzących do powstania tych komórek zaprezentowano na rysunku 3.



Rys. 3. Udział genów grupy tylnej w kolejnych procesach prowadzących do powstania komórek biegunowych (wg Lasko i Ashburnera [29] zmienione)

GENY GRUPY TERMINALNEJ

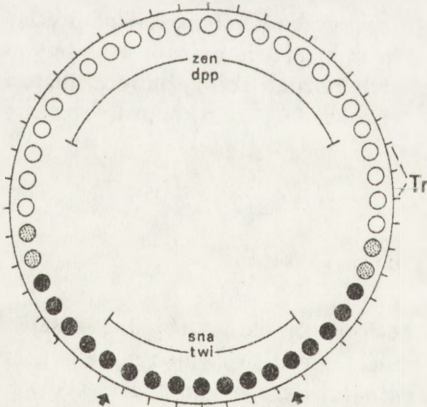
Najważniejszym genem tej grupy jest *torso* (*tor*), którego produkt jest białkiem błonowym [7, 46]. Uważa się obecnie, że powstanie struktur terminalnych uzależnione jest od aktywacji białka *torso* przez ligand uwalniany selektywnie z biegunowych komórek folikularnych (tj. komórek pozostających w kontakcie z przednim i tylnym biegunem oocyty). Podobny mechanizm aktywacji sugerowany jest również w przypadku białka *Toll* z grupy grzbietowej (patrz niżej). Innym genem grupy terminalnej jest *1 (1) polehole*. Białko kodowane przez ten gen wykazuje podobieństwo do onkogenu *raf* [10].

GENY GRUPY GRZBIETOWEJ

Spośród kilkunastu genów biorących udział w determinacji osi grzbieto-brzuszej kluczową rolę odgrywa gen *dorsal* (*dl*) [16, 47]. Produkt *dorsal* jest więc morfogenem o podobnym znaczeniu jak *bicoid* (grupa przednia) i *nanos* (grupa tylna). Początkowo w niezapłodnionych jajach i młodych zarodkach morfogen *dl* rozmieszczony jest równomiernie w całej cytoplazmie. Około 90 minut po zapłodnieniu białko *dl* wnika selektywnie do jąder blastodermny strony brzusznej [14, 42, 47]. W tym czasie całkowite stężenie morfogenu w części brzusznej i grzbietowej zarodka jest wciąż podobne, powstaje natomiast gradient jego subkomórkowej lokalizacji. W części grzbietowej zarodka białko *dl* występuje w cytoplazmie, natomiast w części brzusznej lokuje się w jądrach blastodermny [42, 47] (rys. 4). Po następnej godzinie rozwoju ten specyficzny gradient zastępowany jest przez klasyczny gradient "stę-

zenia". Selektywny, cytoplazmatyczno-jądrowy transport morfogenu *dl* kontrolowany jest "pozytywnie" przez 10 dalszych genów z grupy grzbietowej (*easter*, *gastrulation defective*, *nudel*, *pipe*, *pelle*, *snake*, *spätzle*, *Toll*, *tube*, *windbeutel*) [16, 45]. Wśród tych genów niewątpliwie najbardziej interesujący jest gen *Toll* (*Tl*). Gen ten koduje białko błonowe (prawdopodobnie receptorowe) [17, 45], które rozmieszczone jest równomiernie w całej błonie cytoplazmatycznej zarodka [18]. W tym świetle zaproponowano, że determinacja osi grzbieto-brzusznej związana jest z ograniczoną przestrzennie aktywacją receptora (*Toll*). Za aktywację odpowiedzialny byłby ligand produkowany wyłącznie w komórkach foliularnych pokrywających brzuszną część oocytu (komórki jajowej) [45]. W ten sposób lokalna aktywacja receptora *Toll* inicjowałaby powstanie gradientu subkomórkowej lokalizacji morfogenu *dorsal*. Odmianą rolę przypisuje się dwunastemu genowi grupy grzbietowej – genowi *cactus* [40]. Według Rotha i wsp. [40] produkt tego genu jest inhibitorem transportu białka *dl* do jąder blastodermi. Do inhibicji tej dochodzi jedynie w grzbietowej części zarodka, a związana jest ona z bezpośrednią interakcją białek *dorsal* i *cactus*.

Ostatnio wykazano, że morfogen *dl* zawiera specyficzną, odpowiedzialną za interakcję z DNA domenę *rel* [21]. Domena ta jest homologiczna z odpowiednimi odcinkami proto-onkogenu *rel* i czynnika regulacyjnego NF-KB. Genetyczna analiza pozwoliła zidentyfikować 4 geny, których transkrypcja kontrolowana jest przez produkt *dl*. Wysokie stężenie tego morfogenu (w jądrach blastodermi strony brzusznej) inicjuje ekspresję genów *twist* i *snail* odpowiedzialnych za zróżnicowanie mezodermi [16]. Równocześnie ten sam morfogen jest represorem genów *zerknüllt* [21] i *decapentaplegic*. W rezultacie te ostatnie geny ulegają ekspresji jedynie po stronie grzbietowej kontrolując powstanie amnioserozy i ektodermi grzbietowej [16]. W opisany powyżej sposób działanie jednego morfogenu zapewnia "zróżnicowaną transkrypcję" w rozmaitych rejonach zarodka, a w rezultacie powstanie osi grzbieto-brzusznej [16, 39] (rys. 4).



Rys. 4. Schemat ilustrowujący "gradient lokalizacji" białka (morfogenu) *dorsal* w jądrach blastodermi; zaznaczono obszary, w których ekspresji ulegają geny *zerknüllt* (*zen*) i *decapentaplegic* (*dpp*) (strona grzbietowa) oraz *twist* (*twi*) i *snail* (*sna*) (strona brzuszna); strzałki wskazują miejsce aktywacji receptora *Toll* (*Tr*) (wg Govind i Steward [16] zmienione)

Odmianą, a niezmiernie interesującą klasą genów związanych z ustaleniem osi grzbieto-brzusznej zarodka są geny kontrolujące polarność (dorsalizację) rozwijającej się komory jajowej (patrz rozdział 2). Zaliczane są tu 3 geny *fs 1(1)* *K 10* (*K10*) [38], *gurken* i *torpedo* [44]. Analiza drugorzędowej struktury produktu *K 10* wskazuje, że białko to zawiera domenę wykazującą pewne podobieństwo do domeny *homeo* [38].

Równocześnie metodami immunofluorescencyjnymi stwierdzono stopniową depozycję tego białka w karioplazmie pęcherzyka zarodkowego [38]. Obserwacje te wydają się wskazywać na regulacyjną funkcję produktu genu *K 10*.

Według spekulatywnego modelu zaproponowanego przez Prosta i wsp. [38] pod wpływem białka *K 10* w ekscentrycznie leżącym pęcherzyku zarodkowym aktywowana jest

transkrypcja genów, których dyfundujące produkty mogłyby wpływać na różnicowanie najbliższej leżących komórek folikularnych (rys. 1). W ten sposób zapoczątkowany byłby proces dywersyfikacji nabłonka folikularnego (por. rozdz. 2).

Działanie 2 pozostałych genów tej grupy *torpedo* i *gurken* nie było szczegółowo analizowane, wiadomo jednak, że mutacje tych genów prowadzą do zaburzeń w różnicowaniu nabłonka folikularnego, a w konsekwencji do powstania nietypowych "zwentralizowanych" jaj [44].

CYTOPLAZMATYCZNE PODŁOŻE MATCZYNYCH CZYNNIKÓW ROZWOJOWYCH

Według klasycznych poglądów matczyne czynniki rozwojowe (informacja rozwojowa) zlokalizowane są w pozbawionej materiałów zapasowych cytoplazmie powierzchniowej (periplazmie), którą tradycyjnie określa się terminem warstwa korowa.

Elektronowo-mikroskopowa analiza cytoarchitektury oocytów i jaj owadów wykazała, że jedynym specyficznym rejonem tej warstwy jest oosom (por. rozdz. 2). W obszarze oosomu deponowane są produkty genów *vasa*, *tudor* i *valois* (rys. 3) warunkujące powstanie komórek biegunowych. Pozostałe rejony periplazmy nie wykazują lokalnych zróżnicowań, które mogłyby mieć związek z depozycją czynników rozwojowych [15, 31, 52].

Dużą rolę w lokalizacji matczynych czynników rozwojowych przypisuje się obecnie cytoszkieletowi warstwy korowej [22, 24]. Według Pokrywki i Stephensona [37] elementy cytoszkieletu (mikrofilamenty, mikrotubule lub związane z nimi białka) mogłyby "zakotwiczać" poszczególne morfogeny (lub ich mRNA) w odpowiednich obszarach komórki jajowej. Modele takie, choć bardzo atrakcyjne, wymagają eksperymentalnego potwierdzenia, a przede wszystkim udokumentowania regionalnego zróżnicowania cytoszkieletu warstwy korowej.

W ostatnich latach wykazano, że oocyty owadów z rzędu błonkówek zbudowane są odmiennie. Ich warstwa korowa jest stosunkowo gruba i zawiera liczne sferyczne organelle tzw. jądra dodatkowe [2, 3, 4, 8, 20, 27]. U wszystkich badanych gatunków [2, 8, 32] jądra dodatkowe powstają dzięki aktywności (pączkowaniu) jądra oocytu. Struktury te otoczone są podwójną, poprzębianą porami osłonką i zawierają RNA pozytywne ziarnistości [8, 20, 32].

Rozmieszczenie jąder dodatkowych jest nierównomierne; są one skupione w okolicy bieguna przedniego, a wzdłuż osi przód-tył ich ilość (a także wielkość) wyraźnie maleje [2, 3], w tym świetle zaproponowano, że jądra dodatkowe biorą udział w transporcie RNA z jądra do określonych rejonów periplazmy i mogą być związane z depozycją czynników rozwojowych [2, 3]. Podobną funkcję przypisuje się również innym powstającym z osłonki jądrowej organellom, tzw. błonom pierścieniowym (*annulate lamellae*). Są one częste w oocytach niektórych bezkręgowców (np. osłonicy [25]), a także płazów [26]). W tym drugim przypadku uzyskano pierwsze eksperymentalne dowody na asocjację tych organelli z mRNA [13].

LITERATURA*

- [1] BILIŃSKI S. Różnicowanie nabłonka folikularnego w jajnikach owadów. *Zesz Nauk UJ, Pr z Biol Molek* 1990; **18**: 149–161.
- [2] BILIŃSKI S. Are accessory nuclei involved in the establishment of developmental gradients in hymenopteran oocytes? Ultrastructural studies. *Roux's Arch Dev Biol* 1991a; **199**: 423–426.
- [3] BILIŃSKI S. Morphological markers of anteroposterior and dorsoventral polarity in developing oocytes of the hymenopteran *Cosmoconus meridionator* (Ichneumonidae). *Roux's Arch Dev Biol* 1991b; **200**: 330–335.
- [4] BILLEN J. Ultrastructure of the worker ovarioles in *Formica* ants (Hymenoptera: Formicidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 1985; **14**: 21–32.
- [5] BOSWELL RE, MAHOWALD AP. Cytoplasmic determinants in embryogenesis. In: Kerkut GA, Gilbert LI. eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. vol. 1. Oxford, New York: Pergamon Press, 1985: 387–405.
- [6] BOSWELL RE, PROUT ME, STEICHEN JC. Mutations in a newly identified *Drosophila melanogaster* gene, *mago nashi*, disrupt germ cell formation and result in the formation of mirror-image symmetrical double abdomen embryos. *Development* 1991; **113**: 373–384.
- [7] CASANOVA J. Pattern formation under the control of the terminal system in the *Drosophila* embryo. *Development* 1990; **110**: 621–628.
- [8] CASSIDY JD, KING RC. Ovarian development in *Habrobracon juglandis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). I. The origin and differentiation of the oocyte-nurse cell complex. *Biol Bull* 1972; **143**: 483–505.
- [9] DRIEVER W, SIEGEL V, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Autonomous determination of anterior structures in the early *Drosophila* embryo by the *bicoid* morphogen. *Development* 1990; **109**: 811–820.
- [10] DWORKIN MB, DWORKIN-RASTLE. Functions of maternal mRNA in early development. *Mol Reprod Devel* 1990; **26**: 261–297.
- [11] ELBETIHA A, KALTHOFF K. Anterior determinants in embryos of *Chironomus samoensis*: characterization by rescue bioassay. *Development* 1988; **104**: 61–75.
- [12] FASANO L, KERRIDGE S. Monitoring positional information during oogenesis in adult *Drosophila*. *Development* 1988; **104**: 245–253.
- [13] GANION LR. Cytoplasmic distribution of poly(a)-containing RNA in developing *Necturus maculosus* oocytes with reference to annulate lamellae. *Anat Rec* 1991; **230**: 218–224.
- [14] GAY NJ, KEITH FJ. Formation of a gradient of the *Drosophila* dorsal morphogen by differential nuclear localization. *BioEssays* 1990; **12**: 181–182.
- [15] GEYSEN J, CARDOEN J, VAN EYNDE S, GEENS C, DE LOOF A. Cellular and molecular markers of anteroposterior and dorsoventral organisation in the vitellogenic follicles of adult *Sarcophaga bullata* (Diptera) and dorsoventral orientation of follicles in the ovary. *Roux's Arch Dev Biol* 1988; **197**: 101–109.
- [16] GOVIND S, STEWARD R. Dorsoventral pattern formation in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 1991; **7**: 119–125.
- [17] HASHIMOTO C, HUDSON KL, ANDERSON KV. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; **52**: 269–279.
- [18] HASHIMOTO C, GERTTULA S, ANDERSON KV. Plasma membrane localization of the *Toll* protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development* 1991; **111**: 1021–1028.
- [19] HAYASHI S, SCOTT MP. What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins. *Cell* 1990; **63**: 883–894.
- [20] HOPKINS CR. The histochemistry and fine structure of the accessory nuclei in the oocyte of *Bombus terrestris*. *Q J Microsc Sci* 1964; **105**: 475–480.
- [21] IP YT, KRAUT R, LEVINE M, RUSHLOW CA. The *dorsal* morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* 1991; **64**: 439–446.
- [22] JEFFERY WR. An ultraviolet-sensitive maternal mRNA encoding a cytoskeletal protein may be involved in axis formation in the ascidian embryo. *Dev Biol* 1990; **141**: 141–148.
- [23] JOHNSTON DS, DRIEVER W, BERLETH T, RICHSTEIN S, NÜSSLEIN-VOLHARD C. Multiple steps in the localization of *bicoid* RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 1989; Suppl. 13–19.

*Ze względu na bardzo dużą liczbę prac dotyczących omawianego zagadnienia w niniejszym artykule cytowane są głównie publikacje z lat ostatnich oraz artykuły przeglądowe.

- [24] KASTERN WH, WATSON CA, BERRY SJ. Maternal messenger RNA distribution in silkworm eggs I. Clone Ec4B is associated with the cortical cytoskeleton. *Development* 1990; **108**: 497–505.
- [25] KESSEL RG. The cytoarchitecture of the cortical ooplasm of *Styela* oocytes with special reference to annulate lamellae-endoplasmic reticulum relationships. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1989; **21**: 509–519.
- [26] KESSEL RG. A novel and transient structure associated with annulate lamellae morphogenesis: the *Necturus* oocyte revisited. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1990; **22**: 551–564.
- [27] KING PE, FORDY MR. The formation of accessory nuclei in the developing oocytes of the parasitoid hymenopterans *Ophion luteus* (L.) and *Apanteles glomeratus* (L.). *Z Zellforsch* 1970; **109**: 158–170.
- [28] KING RC. Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. New York, London: Academic Press 1970.
- [29] LASKO PF, ASHBURNER M. Posterior localization of *vasa* protein correlates with, but is not sufficient for pole cell development. *Genes & Devel* 1990; **4**: 905–921.
- [30] LEHMANN R, NÜSSELEIN-VOLHARD C. The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* 1991; **112**: 679–691.
- [31] LOOF A, DE GEYSEN J, CARDOEN J, VERACHTERT B. Comparative developmental physiology and molecular cytology of the polytrophic ovarian follicles of the blowfly *Sarcophaga bullata* and the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol* 1990; **96A**: 309–321.
- [32] MEYER GF, SOKOLOFF S, WOLF BE, BRAND B. Accessory nuclei (nuclear membrane balloons) in the oocytes of the dipteran *Phryne*. *Chromosoma* 1979; **75**: 89–99.
- [33] MLODZIK M, GEHRING WJ. Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis. *Cell* 1987; **48**: 465–478.
- [34] MLODZIK M, GIBSON G, GEHRING WJ. Effects of ectopic expression of *caudal* during *Drosophila* development. *Development* 1990; **109**: 271–277.
- [35] NÜSSELEIN-VOLHARD C, FROHNHOFER HG, LEHMANN R. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 1987; **238**: 1675–1681.
- [36] NÜSSELEIN-VOLHARD C, ROTH S. Axis determination in insect embryos. In: Cellular Basis of Morphogenesis, Ciba Foundation Symposium, New York: Wiley and Sons, 1989: 37–55.
- [37] POKRYWKA NJ, STEPHENSON EC. Microtubules mediate the localization of *bicoid* RNA during *Drosophila* oogenesis. *Development* 1991; **113**: 55–66.
- [38] PROST E, DERYCKERE F, ROOS C, HAENLIN M, PANTESCO V, MOHIER E. Role of the oocyte nucleus in determination of the dorsoventral polarity of *Drosophila* as revealed by molecular analysis of the *K10* gene. *Genes & Devel* 1988; **2**: 891–900.
- [39] RAY RP, ARORA K, NÜSSELEIN-VOLHARD C, GELBART WM. The control of cell fate along dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 1991; **113**: 35–54.
- [40] ROTH S, HIROMI Y, GODT D, NÜSSELEIN-VOLHARD C. *Cactus*, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos. *Development* 1991; **112**: 371–388.
- [41] RUBACHA A, TUCKER MA, VALOIR T DE, BELIKOFF EJ, BECKINGHAM K. Genes with specific functions in the ovarian follicles of *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *Devel Biol* 1988; **129**: 449–463.
- [42] RUSHLOW CA, HAN K, MANLEY JL, LEVINE M. The graded distribution of the *dorsal* morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* 1989; **59**: 1165–1177.
- [43] SANDER K, LEHMANN R. *Drosophila* nurse cells produce a posterior signal required for embryonic segmentation and polarity. *Nature* 1988; **335**: 68–70.
- [44] SCHUPBACH T. Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 1987; **49**: 699–707.
- [45] STEIN D, ROTH S, VOGELSANG E, NÜSSELEIN-VOLHARD C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 1991; **65**: 725–735.
- [46] STEVENS L, FROHNHOFER H, KLINGLER M, NÜSSELEIN-VOLHARD C. Localized requirement for torsolike expression in follicle cells for the development of terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* 1990; **346**: 660–663.
- [47] STEWARD R. Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* 1989; **59**: 1179–1188.
- [48] STRUHL G. Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in *Drosophila* embryos. *Nature* 1989; **338**: 741–744.
- [49] STRUHL G, STRUHL K, MACDONALD PM. The gradient morphogen *bicoid* is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 1989; **57**: 1259–1273.
- [50] SUGIYAMA S, OKADA M. Cytoplasmic factors determining anteroposterior polarity in *Drosophila* embryos. *Roux's Arch Dev Biol* 1990; **198**: 402–410.

- [51] SUTER B, ROMBERG M, STEWARD R. *Bicaudal-D* a *Drosophila* gene involved in developmental asymmetry: localized transcript accumulation in ovaries and sequence similarity to myosin heavy chain tail domains. *Genes & Devel* 1989; 3: 1957–1968.
- [52] ZISSLER D, SANDER K. The cytoplasmic architecture of the insect egg cell. In: King RC, Akai H. eds. *Insect Ultrastructure*, vol. 1. New York: Plenum Press, 1982: 189–221.

Otrzymano: 16.11.1991

Przyjęto: 18.11.1991.

Adres autora: Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA ROŚLIN IN VITRO. II. CHARAKTERYSTYKA CYTOLOGICZNA I PROBLEM STABILNOŚCI GENETYCZNEJ

IN VITRO SOMATIC EMBRYOGENESIS IN PLANTS. II. CYTOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS AND THE PROBLEM OF GENETIC STABILITY

Halina KONONOWICZ

Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin, Instytut Fizjologii i Cytologii
Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie. W artykule została przedstawiona cytologiczna i histologiczna charakterystyka różnych rodzajów kalusa: embriogennego i nieembriogennego. Badania ultrastrukturalne wskazują na wyższą aktywność metaboliczną kalusa embriogennego niż nieembriogennego. In vitro zarodki somatyczne powstają z pojedynczych komórek merystematycznych zlokalizowanych w merystemoidach. W artykule dyskutowane jest zagadnienie konieczności izolacji komórek na etapie indukcji embriogenezy jako warunku ujawnienia totipotencji. Długotrwałe hodowanie komórek roślinnych in vitro może prowadzić do poważnych zmian genetycznych, takich jak zmiana liczby chromosomów czy mutacje chromosomowe. Jednakże embriogeneza in vitro wydaje się być procesem selektywnym, faworyzującym komórki niezmienione genetycznie. Zjawisko selektywnej przewagi komórek diploidalnych w hodowłach miksploidalnych zostało omówione w odniesieniu do regeneracji roślin poprzez somatyczną embriogenezę in vitro.

Summary. Cytological and histological characterization of different types of callus, both embryogenic and non-embryogenic, is presented in this paper. Ultrastructural studies suggest that there is higher metabolic activity in embryogenic than non-embryogenic callus. Somatic embryos in vitro are formed from single meristematic cells, which are localized in meristemoids. The necessity for isolation of the embryogenic cells as a prerequisite for expression of cell totipotency is discussed. The prolonged culture of plant cells in vitro may result in severe genetic changes such as chromosome number variation and chromosome mutation. However, embryogenesis in vitro seems to be a selective process which favors diploid cells. The selective advantage of diploid cells in mixoploid cultures is discussed in relation to plant regeneration via somatic embryogenesis in vitro.

WSTĘP

Większość danych dotyczących powstawania i rozwoju zarodków somatycznych *in vitro* pochodzi z badań nad kulturami kalusa i zawieszin komórkowych marchwi. Informacje dotyczące innych gatunków są podane w [27]. Dane te wskazują, że embriogeneza przebiega w sposób podobny lub identyczny u większości badanych gatunków. Indukcja embriogenezy, tj. namnażania embriogennych tkanek, odbywa się zwykle na pożywkach zawierających auksyny (lub auksyny plus cytokiny), natomiast formowanie zarodków jest inicjowane przez auksyny w niskich stężeniach lub przy ich całkowitym braku w pożywce [37].

Morfologia embriogenego kalusa różni się w zależności od gatunku, np. u wielu traw i zbóż kalus embriogeny opisywany był jako zwarty i gładki, natomiast u innych okrytozalążkowych, np. u kakaowca, ten rodzaj kalusa jest sypki i odznacza się chropowatą strukturą.

CHARAKTERYSTYKA CYTOLOGICZNA I HISTOLOGICZNA

Badania cytologiczne wykazały, że kalus ma budowę niejedolitą i składa się z dwóch rodzajów komórek: centrum tkanki kalusa zajmują duże, starzejące się komórki parenchymatyczne, wysoce zwakuolizowane, z cienką warstwą przyściennej cytoplazmy, małym jądrem i słabo barwiącymi się jąderkami. W komórkach tych obserwowano nieliczne struktury siateczki śródplazmatycznej i rybosomy. Także sferosomy występowały w niewielkich ilościach lub też notowano ich całkowity brak. Aktywność dehydrogenaz była zwykle niewysoka. Komórki te nie biorą udziału w tworzeniu somatycznych zarodków. Drugi rodzaj to małe, izodiametryczne komórki odznaczające się gęstą cytoplazmą, dużym, centralnie położonym jądrem, dużą liczbą rybosomów, licznymi strukturami szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, plastydami z ziarnami skrobi, mitochondriami i sferosomami. Wakuole są niewielkie i nieliczne. Komórki te zdolne są do podziałów i mogą tworzyć skupienia o charakterze merystatycznym, zwane merystemoidami, merystatycznymi skupieniami lub proembriogennymi masami. Niekiedy komórki te są ograniczone do powierzchniowych części masy kalusa. Dalsze ich podziały powodują tworzenie wypukłości, co nadaje tkance wygląd guzkowaty [6, 18, 22, 30, 32].

Skupienia komórek merystatycznych po osiągnięciu odpowiednich rozmiarów oddysocjują od macierzystej tkanki kalusa i jednocześnie ulegając fragmentacji tworzą małe skupienia, w których powtarzają się podziały i formowanie nowych merystemoidów. Jeśli te merystatyczne skupienia przeniesione zostaną na pożywki nie zawierające auksyn lub zawierające je jedynie w niewielkich stężeniach, mogą tworzyć zarodki.

Ultrastrukturalna analiza 3 typów kalusa, uzyskanych z eksplantatów liściowych *Aesculus hippocastaneum*, pozwoliła na porównanie właściwości kalusa embriogenego i nieembriogenego [24, 25]. Kalus zwarty, wolno rosnący (prekursor kalusa embriogenego) po pewnym czasie hodowli wytwarzał żółty, sypki, intensywnie rosnący kalus embriogeny zdolny do produkcji znacznej liczby zarodków. Mechaniczne wytrząsanie kalusa "prekursorowego" w płynnej pożywce, a następnie pasażowanie na pożywkę stałą powodowało powstawanie miękkiego, niesypkiego kalusa nieembriogenego.

Ultrastrukturalne różnice między kalusem embriogennym i jego prekursorem związane są z nabyciem przez komórki embriogenne cech wskazujących na wyższą aktywność metaboliczną. Przykładem jest większa szybkość wzrostu, duża liczba rybosomów, zwiększenie liczby grzebieni mitochondrialnych. Ponadto następowała proliferacja diktiosomów i błon siateczki śródplazmatycznej oraz prawdopodobnie zwiększenie syntezy i sekrecji enzymów litycznych ściany komórkowej, odpowiedzialnych za rozdzielanie się komórek i w konsekwencji za sypkość kalusa. Sypkość jest charakterystyczna dla wielu embriogennych kalusów [3, 11, 23, 28, 30, 32, 36]. Uzyskanie zdolności embriogennych związane było z pojawieniem się skrobi [6, 22, 23]. Ponieważ kalusy embriogenne, jak i nieembriogenne hodowane były na pożywkach o identycznym składzie zarówno substancji odżywczych, jak i hormonalnych, fakt pojawienia się ziaren skrobi tylko w komórkach embriogennych wydaje się ich cechą charakterystyczną.

Kalus nieembriogeny składał się z dużych zwakuolizowanych komórek pozbawionych ziaren skrobi. Znaczna szybkość wzrostu, a także duża liczba organelli komórkowych, takich jak: mitochondria bogate w grzebienie, polirybosomy i szorstka siateczka śródplazmatyczna, wskazywały podobnie jak w kalusie embriogennym na wysoką aktywność metaboliczną. Jednakże w przypadku kalusa nieembriogenego komórki nie produkują enzymów hydrolizujących ściany komórkowe i wobec tego kalus ten jest sypki. Ponadto cechą charakterystyczną kalusa nieembriogenego jest obecność peroksosomów zawierających kryształki. Zwiększenie liczby peroksosomów i pojawienie się w nich krystalicznych rdzeni, które zawierały katalazę i prawdopodobnie różne peroksydazy, bywa związane ze starzeniem się komórek lub ich degradacją. Jednakże ze względu na intensywność podziałów komórek kalusa nieembriogenego przypuszcza się, że obecność peroksosomów nie wskazuje na starzenie się komórek, ale raczej jest przejawem takiego rodzaju metabolizmu, który wymaga wysokiej aktywności oksydaz i katalaz [25, 32].

Somatyczne zarodki powstające *in vitro* tworzą się z pojedynczej komórki o charakterze merystematycznym, która jest częścią wielokomórkowego skupienia – merystemoidu. Sugeruje się [37], że prawdopodobnie wszystkie komórki należące do embriogennych skupień są potencjalnie zdolne do tworzenia zarodków. Jednakże liczba rozwijających się jednocześnie centrów merystematycznych i tym samym liczba powstających zarodków będzie ograniczana w wyniku wzajemnie hamujących oddziaływań sąsiadujących centrów analogicznie do rozmieszczenia primordiów liściowych na wierzchołku pędu. Enzymatyczne wytrawianie embriogenego kalusa wykazało, że praktycznie każda wyizolowana w ten sposób komórka badanego kalusa jest potencjalnie embriogenna.

Komórki inicjalne zarodków mogą być odróżnialne w masie kalusa lub zawiesinach komórkowych [10, 19, 22, 24, 29, 34]. Dla szeregu gatunków komórki takie opisano jako charakteryzujące się bardziej gęstą cytoplazmą i podlegające nierównocennym podziałom, w których wyniku tworzy się komórka inicjalna wieszadełka i mniejsza będąca komórką macierzystą zarodka. Nie wykazano [14, 22, 24, 29] istnienia cech pozwalających na odróżnienie komórek inicjalnych zarodków od komórek sąsiadujących. Natomiast na późniejszym etapie stadia wielokomórkowe są łatwo odróżnialne, bowiem tworzą guzkowatości na powierzchni kalusa charakteryzujące się pewnym stopniem przezroczystości spowodowanym zanikiem skrobi na tym etapie rozwoju zarodków [14, 22, 23, 29, 37].

Grupy dzielących się komórek siostrzanych mogą pozostawać wewnątrz komórki macierzystej oddzielone od otoczenia jej ścianą komórkową. Te wewnętrzne komórki początkowo pozostają połączone między sobą licznymi plasmodesmami, następnie po osiągnięciu

określonych rozmiarów rozdzielają się i tworzą nowe centra merystematyczne, których powstanie wydaje się być kontrolowane przez określony poziom auksyn [23, 30, 31, 32, 37].

Nie jest dotąd całkowicie jasne, czy zarodki powstające w kulturach *in vitro* tworzą się z pojedynczej komórki czy z grupy komórek. Prześledzenie rozwoju zarodków powstających z pojedynczych komórek izolowanych z kultur marchwi [4] dostarczyło danych wskazujących, że izolowane komórki nie podlegają embriogenezie bezpośrednio. Pierwsze podziały mitotyczne są nierównocenne i tworzą jedną małą komórkę o gęstej cytoplazmie i drugą dużą – zwakuolizowaną. Dalsze podziały komórek małych prowadzą do powstania skupień komórek embriogennych, z których część może tworzyć zarodki [4] (patrz też przegląd literatury [22, 37]). Zarodki mogą tworzyć się:

- a) bezpośrednio ze skupień komórek embriogennych,
- b) z pojedynczych komórek zlokalizowanych peryferyjnie,
- c) z wielokomórkowych "pączków",
- d) przy udziale więcej niż jednego z wymienionych procesów.

Decyzja o inicjacji embriogenezy z pojedynczej komórki czy z ich grupy może być wynikiem interakcji pomiędzy komórkami sąsiadującymi w tkance eksplantatu lub kalusa [37]. Sugeruje się, że zarodki tworzące się ze skupień wielokomórkowych połączone są ściśle z tkanką macierzystą ponad granicą pola korzeniowego, zaś zarodki powstające z pojedynczej komórki mają struktury przypominające wieszadełka, poprzez które utrzymują kontakt z komórkami rodzicielskimi [37].

Zasadnicze kontrowersje dotyczą problemu izolacji komórek podczas indukcji embriogenezy [8, 22, 30, 37]. Zakłada się powstawanie zarodków z pojedynczej komórki zawiesiny raz sugeruje się, że separacja komórki od sąsiadującej tkanki jest warunkiem podstawowym ujawnienia się jej totipotencji. Inicjacja embriogenezy zależy od zniesienia hamującego oddziaływania sąsiadujących komórek. Poparciem tej koncepcji wydaje się być fakt izolacji zygoty w woreczku zalążkowym od wpływu innych tkanek. Grubienie ściany w komórkach inicjalnych zarodków [6, 14, 23] wskazuje na izolację komórek na pierwszych etapach embriogenezy. Podobnie kalus *Citrus sinensis* [7] utworzony z ośrodka (*nucellus*) zawierał komórki embriogenicznie zdeterminowane, charakteryzujące się grubymi ścianami i brakiem plasmodesm lub też plasmodesmami nie funkcjonującymi. Dalsze cykle komórkowe zachodzące w obrębie zgrubiałych ścian komórkowych prowadziły do powstania embrioidu. Nie jest jasne, kiedy plasmodesmy embriogennych komórek zostają zablokowane, ale wydaje się prawdopodobne, że proces ten zachodzi przed rozpoczęciem wewnętrznych podziałów. Ponadto komórki we wczesnych stadiach rozwoju zarodków są połączone przez liczne plasmodesmy, które nie wychodzą jednak poza obręb komórek skrajnych, tj. oddzielających zarodek od innych komórek skupienia [37].

Brak jest dowodów wskazujących na konieczność fizycznej izolacji komórek inicjalnych w procesie embriogenezy. Komórki te wydają się pozostawać w normalnym kontakcie ze sobą i innymi komórkami sąsiadującymi aż do etapu kilkukomórkowego zarodka. Natomiast zachodzące na wczesnym etapie rozwoju zarodka grubienie wewnętrznych ścian, oddzielenie plasmodesm i prawdopodobnie kutynizacja ścian mogą być wtórnym efektem procesu embriogenezy [14, 18, 23, 30]. Także szczegółowe badania somatycznej embriogenezy u *Ranunculus* (patrz praca przegląd. [37]) ujawniły, że chociaż zarodki tworzą się z pojedynczej komórki, to jednak podczas ich formowania i wczesnych etapów rozwoju mają one symplastyczne połączenia za pośrednictwem plasmodesm z sąsiednimi, nieembriogenicznymi komórkami.

Rozwiązanie tych sprzecznych danych może ułatwić określenie fizjologicznego stanu komórki podlegającej embriogenezie. Jest prawdopodobne, że pewien stopień izolacji konieczny dla indukcji somatycznej embriogenezy zależy od tego, czy komórka jest już embriogenicznie zdeterminowana oraz czy występuje w otoczeniu komórek nieembriogenicznych. Jeśli komórki sąsiadujące są także embriogenicznie zdeterminowane, może nie zachodzić konieczność separacji [37].

Wspomniana wyżej sypkość kalusa embriogenicznego uwarunkowana przez auksyny umożliwia szybką separację komórek, która może być konieczna dla indukcji komórek embriogenicznie zdeterminowanych. Komórki embriogeniczne będą następnie podlegały zintegrowanej kontroli rozwoju obejmującej także komunikację między komórkami. Jest to zgodne z obserwacjami ścisłych połączeń między komórkami zarodka w porównaniu z luźnym ułożeniem komórek embriogenicznego kalusa [37].

Kryterium uznania danych struktur wielokomórkowych za wczesne stadia rozwojowe zarodków jest ich bipolarność, tj. wyróżnienie biegunów wierzchołkowego pędu i korzeniowego. Do tej pory somatyczna embriogeneza opisana została dla ponad 200 gatunków okrytozależkowych, jednakże liczba ta jest znacznie niższa, jeżeli przestrzega się kryterium bipolarności. Rozpoznanie bipolarności i znalezienie chociażby jednego stadium bardziej zaawansowanego niż globularne opisano dla 102 gatunków. Szczegółowe dane na ten temat zawiera przegląd [27].

Mimo że wczesne etapy różnicowania zarodków powstających *in vitro* były opisywane u różnych gatunków, niewiele jest danych dotyczących sekwencji stadiów rozwojowych poczynając od struktur dwu- lub kilkukomórkowych do dojrzałych zarodków [6, 22]. Nie można wykluczyć, że zarodki somatyczne powstające z komórek kalusa i rozwijające się w warunkach odmiennych od tych, w jakich zachodzi wzrost zarodków zgotycznych, mogą podlegać innym przemianom na wczesnych, kilkukomórkowych etapach różnicowania [37]. Po utworzeniu stadiów globularnych dalsze etapy rozwoju są zbliżone do opisywanych dla zarodków zgotycznych, tj. stadium sercowatego, torpedy i laski. U szeregu gatunków obserwowano struktury przypominające wieszadełka występujące u zarodków zgotycznych, które łączą zarodki z macierzystą tkanką kalusa [6, 19, 22]. W niektórych jednak przypadkach takie struktury przypominające wieszadełka nie pełniły żadnych funkcji lub też zupełnie nie występowały. Być może więc stanowią one szczątkowy kompleks proembrionalnych komórek zdolnych do tworzenia dalszych zarodków.

Somatyczne zarodki mogą powstawać w kulturach haploidalnych gametofitów nagolazkowych [2]. Szybkość embriogenezy jest zwykle nieduża i zarodki nie przechodzą tych samych etapów różnicowania jak u zarodków zgotycznych. Powstawanie haploidalnych zarodków somatycznych z gametofitów *Larix decidua* poprzedzone jest odróżnicowaniem komórek żeńskiego gametofitu i następnie różnicowaniem niektórych spośród nich [2]. Czasami inicjacja kalusa z fragmentów gametofitu *Larix decidua* jest poprzedzona utworzeniem jednej lub wielu długich komórek, które dzielą się poprzecznie w części szczytowej i tworzą małe komórki o gęstej cytoplazmie. Późniejsze podziały prowadzą do powstawania luźnych agregatów komórek, zwanych mikrokalusem, w których rozwijają się długie komórki dzielące się terminalnie i tworzące agregaty małych komórek. Ta zmiana prowadząca od długich do krótkich komórek jest powtarzana kilkakrotnie. W rezultacie długie komórki tworzą struktury przypominające wieszadełko, natomiast małe merystematyczne komórki podlegają dalszym podziałom tworząc masy komórek embriogenicznych. Haploidalne zarodki mogą także powstawać z długich komórek. Podkreśla się niezwykłość odwrócenia normalnej

ontogenezy, bowiem zazwyczaj embriogenne komórki produkują komórki wieszadełka, zaś w opisanym przypadku komórki wieszadełka tworzą komórki embriogenne. Końcowe etapy rozwoju haploidalnych zarodków przebiegają podobnie do embriogenezy *in situ*, z tym wyjątkiem że struktury podobne do wieszadełka nie zamierają, ale przez długi czas produkują komórki embriogenne.

Zarodki somatyczne wielu gatunków powstające w warunkach *in vitro* wykazują często pewne cechy nie występujące nigdy u zarodków zygotycznych, takie jak: wielokrotne liścienie o nietypowym rozwoju oraz powstawanie zarodków przybyszowych z hypokotyli. Te anomalie mogą być w wielu przypadkach eliminowane poprzez dodanie do pożywek kwasu abscysynowego (ABA) [37].

GENETYCZNA STABILNOŚĆ W KULTURACH *IN VITRO*

Istotnym problemem podczas regeneracji roślin *in vitro* zarówno drogą embriogenezy, jak i organogenezy jest zachowanie całkowitej wierności genotypu.

Komórki merystematyczne cechuje zazwyczaj wysoka stabilność genetyczna, wobec tego tworzące się w wyniku podziałów mitotycznych komórki siostrzane powinny zawierać identyczny zespół chromosomów. Cytologiczna organizacja komórek embriogennych, intensywność podziałów, jakim one podlegają [12, 13], jak i obecność wysokiej puli endogennych hormonów [26] wskazują na ich podobieństwo do komórek merystematycznych. Można więc oczekiwać występowania w komórkach embriogennych tego samego typu genetycznej stabilności, jaki charakteryzuje komórki merystematyczne. Jednakże w przeciwieństwie do oczekiwań w kulturach *in vitro* obserwowana jest często znaczna zmienność genetyczna.

Poznano wiele przykładów zmienności obejmującej zmiany liczby chromosomów, jak poliploidia czy aneuploidia, translokacje czy inwersje (przegląd [1, 9, 16, 17, 21, 37]). Aberracje strukturalne nie zawsze są łatwe do wykrycia, zwłaszcza u gatunków o małych chromosomach.

Mimo że istnieje wiele dowodów świadczących o genetycznym zróżnicowaniu komórek w kulturach *in vitro* oraz regenerowanych z nich roślin, nasuwają się wątpliwości, czy wyniki te nie są rezultatem braku systematycznych badań, przede wszystkim dotyczących zależności pomiędzy występowaniem zmian genetycznych a rodzajem użytego do badań kalusa. Poparciem dla takich sugestii były wyniki badań prowadzonych na różnych gatunkach traw, które wykazały fenotypową jednolitość, niezmienną liczbę chromosomów oraz brak roślin albino-tycznych. Nie stwierdzono także komórek poliploidalnych i aneuploidalnych. Ponadto analiza zawartości DNA przeprowadzona na 3–4-letnich embriogennych zawieszinach komórek dwóch traw wykazała, że większość, bo ponad 57% jąder zawiera 2C lub 4C DNA i ma normalny zespół chromosomów [12]. Uznano więc, że nawet nieznaczne genetyczne zmiany nie mają miejsca w komórkach embriogennych hodowanych *in vitro*. Wydaje się jednak, że zmiany o małym natężeniu dotyczące jedynie niewielkich strukturalnych modyfikacji chromosomów, mutacje punktowe czy zmiany zawartości DNA mogą występować, lecz są trudne do wykrycia.

W większości przypadków, kiedy opisywano niestabilność genetyczną, do badań używany był sypki, nie wykazujący żadnej organizacji kalus. Takie kultury są prawdopodobnie bardziej podatne na zaburzenia mitozy oraz związane z tym zmiany w zespołach chromosomów.

Sugerowano [5], że regularność mitoz jest zależna od stopnia zróżnicowania tkanki. Nieprawidłowe mitozy zachodzą znacznie częściej w dużych, zwakuolizowanych komórkach w czasie niezorganizowanego wzrostu niż w skupieniach mitotycznie aktywnych komórek lub podczas zorganizowanego wzrostu.

Pojawienie się w kulturach in vitro komórek o zmienionym genotypie jest zwykle poprzedzone okresem stabilności genetycznej. Opóźnienie w powstawaniu zmian genetycznych [5] świadczy o istnieniu mechanizmu odpowiedzialnego za takie zmiany. Jednakże mechanizm ten nie jest uruchamiany od razu i nie funkcjonuje u wszystkich gatunków. Istnieją bowiem dane świadczące o braku zmian genetycznych nawet po długim okresie hodowli w kulturach [35]. Jednakże raz powstałe modyfikacje dotyczące liczby chromosomów czy kariotypów będą podlegać akumulacji wraz z przedłużającym się czasem hodowli [10].

Brak zarodków somatycznych powstających z komórek o istotnych zmianach genetycznych może być spowodowane przez fakt, że nie rozwijają się one poza wczesne stadia i nie tworzą dojrzałych roślin. Utrata zarodków z poważnymi aberracjami jest zjawiskiem często spotykanym. Potwierdza to sugestię, że embriogeneza jest procesem wysoce selektywnym, faworyzującym normalne, niezmienione genetycznie komórki. Z drugiej strony nieliczne dane wskazują, że także wysokopoliploidalne komórki zdolne są do tworzenia somatycznych embrionów i regeneracji roślin [10].

ZNACZENIE KOMÓREK DIPLOIDALNYCH W KULTURZE EMBRIOGENEJ

Nie wszystkie komórki heterogennej genetycznie populacji mają jednakowe szanse przetrwania. Istnieją dowody wskazujące na selektywną przewagę komórek diploidalnych znajdujących się w kulturze heteroploidalnej [9, 31]. W kulturze heteroploidalnej składającej się z komórek o różnym stopniu ploidalności oraz komórek aneuploidalnych stopniowo przewagę ilościową uzyskiwały komórki $2n$ i w efekcie kultury stawały się prawie całkowicie diploidalne. Podobne wyniki uzyskano w kulturach *Daucus carota* zawierających komórki poliploidalne indukowane przy pomocy kolchicyny [5]. Kiedy uzyskane linie heteroploidalne zawierające komórki $2n$, $4n$ i $8n$ były pasażowane na nowe pożywki, eliminacji w pierwszej kolejności podlegały komórki oktaploidalne, a następnie tetraploidalne. Po pewnym więc czasie kultura zawierała prawie wyłącznie komórki diploidalne. Analogicznie po zmieszaniu równych ilości komórek linii diploidalnych i tetraploidalnych te ostatnie ulegały stopniowej eliminacji podczas pasażowania [5]. Dane te sugerują, że stabilność linii diploidalnych jest spowodowana kompetycyjną eliminacją komórek poliploidalnych. Obserwowano wprawdzie niewielkie ilości komórek poliploidalnych i aneuploidalnych po dłuższym okresie hodowli embriogenego kalusa *Pennisetum americanum* [31], jednakże kultury pozostawały zasadniczo jednolite pod względem cytologicznym, co sugeruje istnienie silnej selekcji faworyzującej komórki diploidalne w procesie tworzenia somatycznych zarodków. Jest możliwe, że selekcja faworyzująca komórki diploidalne zależy od ilości tych komórek w eksplantacie i inicjalnym kalusie.

Badania kariologiczne oraz cytofotometryczna ocena poziomu ploidalności wykazały, że kalus jęczmienia uzyskany z diploidalnych eksplantatów utrzymuje zwykle dominującą liczbę

komórek 2n w czasie hodowli, podczas gdy kalus haploidalny pochodzący z haploidalnych zarodków był znacznie mniej stabilny genetycznie niż kultury diploidalne [20].

Cytofotometryczna ocena poziomu ploidalności komórek w zarodkach uzyskanych z kultury haploidalnych komórek kilku odmian jęczmienia dowiodła, że częstotliwość występowania komórek poliploidalnych była związana z rozmiarami zarodków będących w tym samym wieku, tj. zarodki małe zawierały wyższy procent komórek haploidalnych niż zarodki duże [15]. Prześledzenie zmian zawartości DNA w haploidalnym kalusie uzyskanym z tych zarodków wykazało, że każda linia kalusa charakteryzuje się własną, specyficzną szybkością poliploidyacji, chociaż linie tej samej kultury wykazywały podobne tendencje. Cechą charakterystyczną haploidalnego kalusa jęczmienia było zwiększenie liczby komórek diploidalnych wraz z przedłużaniem czasu hodowli. Po 11 miesiącach nastąpił całkowity zanik komórek haploidalnych i dominującą część populacji stanowiły komórki diploidalne [15].

Akumulacja aneuploidów i postępująca poliploidyacja tkanek kalusa są często podawane jako przyczyna utraty potencjału morfogenetycznego.

Badania somatycznych zarodków *Theobroma cacao* L. oraz produkowanych przez nie 2 klonów kalusa: embriogenego i nieembriogenego wykazały różnice w liczbie chromosomów i zawartości DNA. W kalusie powstającym z somatycznych zarodków poziom ploidalności pozostawał typowy dla eksplantatów, co świadczy, że proces tworzenia kalusa nie jest związany z indukcją dodatkowych cykli endoreplikacyjnych. Jednakże istniejące różnice w poziomie ploidalności między liniami embriogenego i nieembriogenego kalusa sugerują, że potencjał embriogeny może być związany z obecnością komórek poliploidalnych [Kononowicz, Floryanowicz nie publ.]. Należy zaznaczyć, że udział komórek o zwiększonej zawartości DNA w kalusie embriogenym i tworzących się z niego zarodkach jest bardzo niewielki, natomiast większość populacji stanowią komórki 2-4C.

Zróznicowanie genetyczne komórek spotyka się czasami w roślinach regenerowanych z kultur mieszanych wykazujących zarówno zdolności embriogenne, jak i organogenne [20].

WNIOSKI

Totipotencja komórek roślinnych budzi zrozumiałe zainteresowanie zarówno ze względu na możliwość praktycznego zastosowania, jak i z punktu widzenia badań podstawowych.

Postęp, jaki się dokonał w ostatnich latach w badaniach nad somatyczną embriogenezą in vitro, umożliwia wykorzystanie tych metod do szybkiego namnażania ważnych użytkowo roślin. Przykładami wykorzystania somatycznej embriogenezy może być produkcja na dużą skalę haploidów z mikrospor lub triploidów z komórek endospermy, uzyskiwanie roślin niezakażonych wirusami, otrzymywanie trwałych mutantów. Istotne znaczenie ma także fakt, że rośliny uzyskiwane poprzez somatyczną embriogenezę wyprowadzane są z pojedynczej komórki, co może prowadzić do powstania nowych linii i w efekcie nowych odmian.

Kluczem do dotychczasowych sukcesów było precyzyjne określenie stadium rozwojowego eksplantatu warunkującego uzyskanie embriogennej kultury oraz opracowanie metod hodowli tych kultur.

Somatyczna embriogeneza, szczególnie zachodząca drogą pośrednią poprzez kalus, stanowi dogodnie narzędzie do badań procesów różnicowania komórek roślinnych. Jednakże skuteczność manipulacji w systemach somatycznej embriogenezy in vitro, powtarzalność

uzyskiwanych wyników będą zależały od poznania mechanizmów sterujących tym typem różnicowania. Konieczne są dalsze badania biochemiczne, biofizyczne i ultrastrukturalne, bowiem różnicowanie osiągnięte przez eksperymentalną manipulację *in vitro* może nie stanowić dokładnej kopii procesów zachodzących w warunkach naturalnych.

LITERATURA

- [1] D'AMATO F. Cytogenetics of plant and tissue cultures and their regenerates. *CRC Crit Rev Plant Sci* 1985; 73-112.
- [2] ANDERKAS von P, BONGA JM. Formation of haploid embryoids of *Larix decidua*: early embryogenesis. *Amer J Bot* 1988; 75: 690-700.
- [3] ARMSTRONG CL, GREEN CE. Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 1985; 164: 207-214.
- [4] BUCKS-HUSSEMANN D, REINERT J. Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Gewebekulturen von *Daucus carota*. *Protoplasma* 1970; 70: 49-60.
- [5] BAYLISS MW. Chromosomal variation in plant tissue in culture. International Review of Cytology, Suppl. 11A. Perspectives in plant cell and tissue culture. 1980; 113-144.
- [6] BHANSALI RR. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in pomegranate. *Ann Bot* 1990; 66: 183-190.
- [7] BUTTON J, KOCHBA J, BORMAN CH. Fine structure of embryoid development from embryogenic ovular callus of "Shamouti" orange (*Citrus sinensis* Osb.). *J Exp Bot* 1974; 25: 446-457.
- [8] DUBOIS T, GUEDIRA M, DUBOIS J, VASSEUR J. Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*; Is callose an early marker? *Ann Bot* 1990; 65: 539-545.
- [9] EARLE ED, GRACEN VE. Somaclonal variation in progeny of plants from corn tissue cultures. [w] Henke R, Hugnes A, Constantin MJ, Hollaender A. (red.) Tissue culture in forestry and agriculture. Plenum Press, New York 1985; 139-152.
- [10] JHA S. Cytological analysis of embryogenic callus and regenerated plants of *Urginea indica* Kunth, Indian squill. *Caryologia* 1989; 42: 165-173.
- [11] KAMO KK, VASIL IK. Regeneration of *Zea mays* from embryogenic callus. *Bot Gaz* 1985; 146: 327-334.
- [12] KARLSON SB, VASIL IK. Growth, cytology and flow cytometry of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) and *Pennisetum purpureum* (Napier grass). *J Plant Physiol* 1986; 123: 211-227.
- [13] KARLSON SB, VASIL IK. Morphology and ultrastructure of embryogenic cell suspension cultures of *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass) and *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier grass). *Amer J Bot* 1986; 73: 897-901.
- [14] KLIMASZEWSKA K. Recovery of somatic embryos and plants from protoplast cultures of *Larix eurolepis*. *Plant Cell Rep* 1989; 8: 440-444.
- [15] KOTT LS, FLACK S, KASHA KJ. A comparative study of initiation and development of embryogenic callus from haploid embryos of several barley cultivars. II. Cytophotometry of embryos and callus. *Can J Bot* 1985; 64: 2107-2112.
- [16] KUDIRKA DT, SCHAEFFER GW, BAENZIGER PS. Wheat; Genetic variability through anther culture. [w] Bajaj YPS. (red.) Biotechnology in agriculture and forestry 2. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1988; 236-254.
- [17] LAVANIA UC, SRIVASTOVA S. Ploidy dependence of chromosomal variation in callus cultures *Hyoscyamus muticus* L. *Protoplasma* 1988; 145: 55-58.
- [18] LU C, VASIL IK. Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* Jacq. (Guinea grass). *Amer J Bot* 1985; 72: 1908-1913.
- [19] LUTZ JD, WONG JR, ROWET J, TRICOLI DM, LAWRENCE RH. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. [w] Henke RP, Huges KW, Constantin MJ. (red.) Tissue culture in forestry and agriculture, Plenum Press, New York 1986.
- [20] MADDOCK SE. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in wheat, barley, oats, rye and triticale. [w] Bright SW, Joines MGK. (red.) Cereal tissue cell culture. Martinus Nijhoff/Dr W Junk, Publ. Dordrecht, The Netherlands, 1985; 131-174.
- [21] MATHIAS RJ, FUKUI R. The effect of specific chromosome and cytoplasmic substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus. *Theor App Genet* 1986; 71: 797-800.

- [22] EL MAATAOUI M, ESPAGNACH H, MICHAUX-FERRIER N. Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured in vitro. *Ann Bot* 1990; **66**: 183–190.
- [23] MICHAUX-FERRIER N, MARC-PHILLIPE C. Histology of early embryogenesis in *Hevea brasiliensis*; The importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 1989; **19**: 243–256.
- [24] PROFUMO P, GASTALDO P, DAMERI RM, CAFFARO L. Histological study of calli and embryoids from leaf explants of *Aesculum hippocastanum* L. *J Plant Physiol* 1986; **126**: 97–103.
- [25] PROFUMO P, GASTALDO P, RASCIO N. Ultrastructural study of different types of callus from leaf explants of *Aesculum hippocastanum* L. *Protoplasma* 1987; **138**: 89–97.
- [26] RAJASEKARAN K, HEIN MB, DAVIS GC, CARNES MG, VASIL IK. Endogenous plant growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J Plant Physiol* 1987; **130**: 13–25.
- [27] RANGASWAMY NS. Somatic embryogenesis in angiosperm tissue and organ cultures. *Proc Indian Acad Sci (Plant Sci)* 1986; **96**: 247–271.
- [28] RASCIO N, CASADORO G. Effect of light intensity and the E283B olive necrotic maize mutant. *Cytobios* 1985; **42**: 179–191.
- [29] REDWAY FA, VASIL V, VASIL IK. Characterization and regeneration of wheat (*Triticum aestivum*) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Rep* 1990; **8**: 714–717.
- [30] SANTOS DOS AVP, MACHADO RD. A scanning electron microscope study of *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. *Ann Bot* 1989; **64**: 239–296.
- [31] SWEDLUND B, VASIL IK. Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.). *Theor Appl Genet* 1985; **69**: 575–581.
- [32] TAYLOR MG, VASIL IK. Ultrastructural characterization of embryogenic callus formation in cultured embryos of *Pennisetum americanum*. *Amer J Bot* 1985; **72**: 833–834.
- [33] THORPE TA, JOY IV, LEUNG DWM. Starch turnover in shoot-forming tobacco callus. *Physiol Plant* 1986; **66**: 58–62.
- [34] TULECKE W. Somatic embryogenesis in woody perennials. [w]Bonga JM, Durzan DJ. (red.) Cell and tissue culture in forestry. vol 2. Martinus Nijhoff Publisher, Boston 1987; 61–91.
- [35] VASIL IK. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J Plant Physiol* 1987; **28**: 193–218.
- [36] VASIL V, VASIL IK. Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. *J Plant Physiol* 1986; **124**: 339–408.
- [37] WILLIAMS EG, MAHESWAREN G. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 1986; **57**: 443–462.

Otrzymano 05.12.1991

Przyjęto: 10.12.1991.

Adres autora: ul. Banacha 2/6, 90-237 Łódź.

ANTYGEN CD 5 I JEGO ROLA W STANIE FIZJOLOGICZNYM I W PATOLOGII

ROLE OF CD 5 ANTIGEN IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Zofia Monika RUPNIEWSKA, Anna DMOŚZYŃSKA

Klinika Hematologii przy II Katedrze Chorób Wewnętrznych AM w Lublinie

Streszczenie. Glikoproteina CD 5 występuje na powierzchni wszystkich dojrzałych komórek T i w małym odsetku – limfocytów B. Szereg danych wskazuje, że CD 5 pełni czynność receptora w kontaktach między komórkami pomocniczymi T a komórkami B. Subpopulacja komórek B CD 5⁺ w warunkach prawidłowych jest populacją wydzielającą "naturalne" polireaktywne przeciwciała o niskim powinowactwie, wiążące niektóre z własnych antygenów, jak również egzogenne antygeny. Obok tej fizjologicznej roli komórki B CD 5⁺ mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie pewnych chorób autoimmunologicznych i w przewlekłej białaczce limfatycznej B komórkowej.

Summary. The glycoprotein CD 5 is expressed on the membrane of all mature T cells and a small proportion of B lymphocytes. Studies indicate that CD 5 act as a receptor in the communication between T helper cells and B cells. CD 5⁺ B-cell subset in normal condition secretes polyreactive, low affinity, "natural" antibodies which bind to several self antigens and to exogenous components. In addition to these physiological role of CD 5⁺ B-cells, they may be implicated in the pathogenesis of certain autoimmune diseases and B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Antygen określany zgodnie z nazewnictwem CD (*human leukocyte differentiation antigens*) jako antygen CD 5 jest powierzchniową glikoproteiną komórkową. Jego masa cząsteczkowa wynosi 67 kDa (gp 67) i jest homologiczny z antygenem Ly-1 komórek T myszy [53]. Początkowo uważano go za swoisty marker limfocytów T, który w ontogenezie pojawia się nieco później, bo dopiero w III generacji tymocytów, równocześnie z CD 3 (tzw. kompleks CD 3 stanowi układ trzech łańcuchów: gamma, delta i epsilon składających się na jedną z dwu części receptora komórki T) (*T cell receptor* – w skrócie TCR). W dalszym procesie dojrzewania CD 5 pozostaje nadal na obwodowych komórkach T i to zarówno na subpopulacji komórek induktorowo-pomocniczych, jak i cytotoksyczno-supresorowych [34].

Niespodziewanie CD 5 wykryto również na prawidłowych komórkach B, chociaż komórki te noszą zaledwie 1/10 liczby molekuł występujących na komórkach T [8, 45]. Antygen CD 5 pojawia się między 22 a 24 tygodniem życia płodowego na powierzchni głównej populacji komórek B, którą cechuje niski stopień ekspresji powierzchniowych immunoglobulin (SIgM i SIgD). Ponadto komórki B CD 5⁺ noszą jeszcze drugi antygen komórek T – Tu-33 [8], a także

mają zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy. Komórki B CD 5⁺ stanowią główną populację (40–60%) komórek B w płodowej śledzionie, węzłach chłonnych i krwi pępowinowej [2, 8, 14, 42, 85]. Po okresie okołoporodowego zmniejszenia się populacji komórek B wywołanego przeciwciałami anti- μ regenerują niemal wyłącznie komórki B CD 5 ujemne. Niemniej jednak antygen CD 5 występuje na powierzchni subpopulacji komórek B u osób dorosłych stanowiącej 15–25% populacji komórek B krwi obwodowej i śledziony [16]. Komórki B CD 5⁺ spotyka się także na obwodzie centrów rozrodczych węzłów chłonnych [14] i w migdałkach, ale nie znaleziono ich w szpiku [35]. Wydaje się więc, że komórki B CD 5⁺ stanowią samoodnawiającą się subpopulację odmienną od typowych komórek B CD 5 ujemnych [43].

U dorosłych myszy komórki CD 5⁺, a właściwie komórki Ly-1⁺ (ponieważ antygen Ly-1 jest mysim homologiem ludzkiego antygeny CD 5), stanowią główną populację komórek limfoidalnych w jamach: otrzewnowej, opłucnowej i osierdziowej, które wykształcają się z płodowej jamy ciała. W wysiękach otrzewnowych [43, 74] i opłucnowo-osierdziowych [69] przeważa populacja komórek B Ly-1⁺, na których niezwykle fenotyp składają się jeszcze [68]:

- słaba ekspresja antygeny B 220,
- wyraźna ekspresja SIgM przy słabej ekspresji SIgD oraz
- ekspresja antygeny Mac-1.

Antygen ten charakteryzuje układ granulocytów - monocytów - makrofagów i naturalne komórki cytotoksyczne. Według nazewnictwa CD Mac-1 odpowiada CD 11b cząsteczce adhezyjnej z nadrodziny integryn i pełniącej czynność receptora dla fragmentu bi trzeciej składowej dopełniacza (R-C 3 bi) [3]. Populacja ta jest odpowiedzialna za wytwarzanie większości osoczowej IgM i naturalnych przeciwciał [32], a także odgrywa istotną rolę w regulacji repertuaru rozwijających się później w życiu pozapłodowym komórek T i B [67, 74, 80]. Ostatnio Marcos i wsp. (cyt. wg [68]) wykazali, że limfocyty B z płodowej jamy ciała w sposób wybiórczy kontrolują powstawanie i rozwój komórek pre-B i B w szpiku osobników dorosłych.

Komórki B Ly-1⁺ stanowią także istotną część populacji komórek B w blaszce właściwej jelit (komórki w większości wytwarzające IgA) [58] i w grasicy [1, 72]. Z drugiej strony podobnie jak u ludzi komórki B Ly-1⁺ w innych obwodowych narządach limfoidalnych występują w znikomym odsetku (poniżej 5%).

Istotna przewaga w jamach ciała myszy populacji komórek B Ly-1⁺ związanej ze strukturami epitelialno-mezenchymalnymi może zdaniem Marcosa i wsp. [68] wynikać:

- albo z wybiórczego zadomowienia się komórek w tych miejscach, który to proces jest sterowany przez lokalne antygeny,
- albo z programu ukierunkowania i dojrzewania komórek B Ly-1⁺, który narzuca ich specyficzną lokalizację w jamach ciała.

Wybiórcze nagromadzenie się tych komórek w anatomicznie odrębnych jamach opłucnowo-osierdziowej i otrzewnowej sugeruje, że albo one same albo ich prekursorzy skolonizowały płodową jamę ciała jeszcze przed podziałem jej przez przepoń (w 13–14 dniu życia płodowej myszy).

Autorzy ci przypuszczają, że komórki B Ly-1⁺ odpowiadają najwcześniejszemu okresowi limfopoezy w życiu zarodkowym ssaków i są komórkami "założycielskimi". Prawdopodobnie są one pierwszą generacją pochodzącą od płodowej limfo-hemopoetycznej komórki macierzystej znajdującej się w ogniskach przyaortalnych i zdolnej do regionalnego kolonizowania tkanek hemopoetycznych.

Za tą teorią przemawia także fakt, że komórki B Ly-1⁺ mają kilka cech wspólnych z płodowymi komórkami B, a mianowicie:

- są one dużych rozmiarów (nawet w fazie spoczynkowej G₀/G₁),
- charakteryzuje je słaba ekspresja antygeny B 220 [105],
- raczej rzadko mają zdolność sekrecji immunoglobulin [69].

Ponadto komórki B Ly-1⁺ wykazują podobieństwo czynnościowe do komórek B pochodzących z torebki Fabrycjusza ptaków (jak np. zdolność do samoodnowy i przetrwania ekspansywnych klonów) [110], a więc wykazują cechy "atawistyczne".

Pozostające w fazie spoczynkowej (okres G₀/G₁) w płodowej jamie ciała komórki B Ly-1⁺ z kolei migrują do przedziału aktywnych komórek B w śledzionie, gdzie pod wpływem komórek T ulegają wybiórczej proliferacji [51].

Natomiast związane ze zrębem tkankowym limfocyty B SIg⁺, Ly-1 ujemne zdaniem Marcosa i wsp. [68] pojawiają się w późniejszym okresie ontogenezy, po okołoporodowym zasiedleniu szpiku przez komórki macierzyste, które zapoczątkowują tę dominującą u osobników dorosłych populację krótko żyjących limfocytów B. Jednakże powstanie i rozwój tej populacji są regulowane przez komórki B z płodowej jamy ciała.

Interesujące są także takie fakty, jak:

- ◆ powiązania czasowe w procesie ontogenezy między limfocytami B Ly-1⁺ a limfocytami T z ekspresją łańcuchów gamma, delta, receptora komórki T,

- ◆ lokalizacja obu populacji w strukturach związanych z jelitami,

- ◆ zdolność pewnych komórek T gamma, delta do specyficznego rozpoznawania idiotypów SIg na komórkach B Ly-1⁺,

- ◆ ekspansja obu populacji w różnych stanach immunopatologicznych [68].

Fizjologiczna rola CD 5 nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona. Przypuszcza się [20, 50, 53, 59, 78, 92, 103, 106], że CD 5 zarówno u myszy, jak i u ludzi pełni czynność receptora dostarczającego dodatkowych sygnałów koniecznych dla stymulacji komórek T, przy czym czynność ta jest zbliżona do czynności CD 2 [93] i CD 28 [63], o których to antygenach będzie mowa dalej. Natomiast zainicjowany przez CD 5 łańcuch sygnałów transdukcji jest odmienny od zapoczątkowanego przez receptor komórki T (kompleks CD 3). Przeciwciała anti-CD 5 stymulują zarówno proliferację komórek T przez oddziaływanie z CD 3, jak i sekrecję interleukiny-2 (IL-2) z równoczesną ekspresją jej receptora, a ponadto indukują wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ [20, 59, 78, 92, 103, 106].

Na komórkach B podobnie jak na komórkach T CD 5 jest cząsteczką dostarczającą dodatkowych sygnałów koniecznych dla ich aktywacji [35, 37, 38, 71]. Wykazano np., że śledzionowe komórki B ekspozycje na estry forbolu (TPA) ujawniają CD 5 [35, 38]. Jednakże inne stymulatory komórki B, takie np. jak: przeciwciała antyimmunoglobulinowe, wirus Epsteina-Barr, wiele cytokin (IL-1, IL-2, IL-4, interferon-gamma, nisko cząsteczkowy czynnik wzrostu komórki B (BCGF), a także ich kombinacje) nie wywołują ekspresji CD 5. Natomiast dodanie IL-4 pochodzącej z komórek T do komórek B stymulowanych TPA blokuje ekspresję CD 5 przez hamowanie transkrypcji mRNA CD 5 [34].

Występowanie na komórkach B CD 5⁺ innych antygenów tego rodzaju przemawia za tym, że CD 5 na komórkach B jest antygenem aktywacji. Tak np. komórki B CD 5⁺ z krwi pępowinowej noworodków noszą takie antygeny aktywacji, jak: CD 23 (receptor Fc o niskim powinowactwie wobec IgE), CD 25 (receptor IL-2, łańcuch α), CD 71 (receptor transferyny), co sugeruje, że są one w stanie preaktywacji [15]. Gdy komórki te hodowano z dodatkiem IL-1 i IL-2 jako jedynych stymulatorów, zaczęły upodabniać się zarówno pod względem

fenotypu immunologicznego, jak i morfologicznie do aktywnych blastycznych komórek B z centrów rozrodczych grudek chłonnych. Ponadto istnieją sugestie, że komórki B CD 5⁺ wytwarzając szczególnie limfokiny pomagają w aktywacji i rozwoju typowych komórek B CD 5 ujemnych [40].

Kluczowym zdarzeniem w przebiegu odpowiedzi immunologicznej na specyficzny antygen jest współdziałanie limfocytów T o czynności pomocniczej z limfocytami B wiodące do obopólnej aktywacji. Jak to wykazali van de Velde i wsp. [104], jedną z par uczestniczących w tym procesie i wzajemnie uzupełniających się receptorów komórkowych są antygeny: CD 5 na komórkach T i CD 72 na komórkach B. Autorzy ci oczyścili metodą powinowactwa z przeciwciałem (*antibody-affinity method*) cząsteczki CD 5 z ludzkiej linii komórki T i wykazali, że wiąże się ona wybiórczo i specyficznie z komórkami B. Z kolei ligand komórek B wiążący CD 5 zidentyfikowano stosując zestaw przeciwciał skierowanych przeciw cząsteczkom powierzchni komórki B i badając, które z nich interferują w powyższej reakcji. Tylko monoklonalne przeciwciała anti-CD 72 blokowało wiązanie CD 5. Możliwość, że CD 5 reaguje bezpośrednio z CD 72, potwierdzono dalszymi badaniami. Mianowicie wykazano, że komórki nie-B (komórki L myszy i komórki T ludzkiej linii Jukart), które transferowano klonowanym ludzkim CD 72 lub homologicznym Lyb 2 myszy i które cechuje ekspresja tego ligandu [108] wiążą się z oczyszczoną CD 5. Natomiast komórki kontrolne nie wiązały CD 5. Istnieje więc bardzo duża doza prawdopodobieństwa, że CD 5/Ly 1 i CD 72/Lyb 2 stanowią parę współdziałających cząsteczek. Na znaczenie tej interakcji dla czynności komórek B wskazują obserwacje wielu autorów, że przeciwciała specyficzne wobec CD 72/Lyb 2 odpowiednio człowieka i myszy wywołują proliferację komórki B bądź same, bądź w połączeniu z czynnikami wzrostu komórki B [55, 81, 91, 96, 99]. Mogą też indukować ekspresję antygenów klasy II [55, 97] i niewielki wzrost wewnątrzkomórkowego Ca²⁺ [81, 97]. Co więcej przeciwciała anti-Lyb 2 myszy blokują różnicowanie komórek B w komórki wydzielające przeciwciała w odpowiedzi na antygeny zależne od komórek T [98, 113]. Wszystkie te dane wskazują, że CD 72/Lyb 2 jest receptorem dla czynnika wzrostu komórki B [104].

CD 72 jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej 39/43 kDa. Na komórkach linii B występuje ona jako homodimer, którego podjednostki są połączone wiązaniem dwusiarczkowym [29, 88, 108, 109]. Pojawia się w bardzo wczesnym okresie ontogenezy limfocytów B, już na komórce pro-B i utrzymuje się przez wszystkie następne etapy dojrzewania włącznie z komórką pamięci, ale nie występuje na komórkach plazmatycznych [29, 30, 88, 102, 108, 109]. CD 72 jest integralnym białkiem błony komórkowej. Jego zewnątrzkomórkowy segment jest homologiczny z asialoglikoproteinowymi receptorami i wzmiankowanym wcześniej CD 23 (Fc epsilon R II) [77, 109].

Dalsze badania interakcji CD 5-CD 72 umożliwiają lepsze poznanie bezpośredniej komunikacji między limfocytami T i B przez kontakt komórka-komórka oraz roli tej interakcji w aktywacji i proliferacji komórek T i B w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź komórki B wymaga wcześniejszego rozpoznania antygeny przez receptor immunoglobulinowy. Komórka B jeszcze wcześniej musi otrzymać pewne sygnały aktywacji pochodzące z pomocniczej komórki T. Na sygnały te składa się zarówno sekrecja interleukin, jak i czynników wynikających z bezpośredniego kontaktu komórka-komórka. Pogląd ten potwierdzają badania, w których wykazano, że plazmoderma aktywnych komórek T współdziała z interleukinami w powstaniu takiej aktywacji [11, 48, 79].

Wykryto wiele współdziałających cząsteczek pomocniczych, które mogą wysyłać i otrzymywać sygnały wynikające z kontaktu komórka-komórka. Cząsteczki te pełnią czynność zastępczą lub czynność połączeń omijających (*bypass*), która jest konieczna dla interakcji między komórkami T i B. W wielu przypadkach działają jako receptory i związanie ich z ligandami drugiej komórki zwiększa siłę sygnałów biochemicznych. W innych przypadkach pomocnicze cząsteczki mogą warunkować adhezję komórki do komórki. Wszystkie pełnią niezwykle ważną rolę w wywoływaniu i utrzymywaniu kontaktów zarówno między komórkami, jak i między komórkami a zrębem tkankowym i co za tym idzie mają kluczowe znaczenie w regulacji hemopoety, dojrzewaniu tymocytów, kontrolowaniu selektywnej-tkankowo migracji (*homing receptor*), a zwłaszcza w rozwoju zarówno odpowiedzi immunologicznej, jak i nie immunologicznej odpowiedzi zapalnej. Wyróżniono dwie główne nadrodziny tych molekuł:

- ◆ nadrodzinę integrzyn (*integrin superfamily*) i
- ◆ nadrodzinę immunoglobulin (*immunoglobulin superfamily*) [116].

Na rysunku 1 cytowanym z pracy De Franco [25] przedstawiono pary współdziałających cząsteczek pomocniczych komórek T i komórek B. Do cząsteczek tych należą:

- antygen CD 3 (receptor komórki T) i antygeny głównego układu zgodności tkankowej klasy II (*major histocompatibility complex*, w skrócie MHC) komórek B;
- dwie pary cząsteczek adhezji leukocytów (*leukocyte adhesion molecules*);
- LFA-1 (skrót od *lymphocyte function associated antigen-1*) i ICAM (skrót od *intercellular cell-adhesion molecules*), które to cząsteczki występują zarówno na komórkach T, jak i B;
- CD 2 na komórkach T i LFA-3 na komórkach B;
- dwie niedawno wykryte pary ligand/receptor:
 - ◇ CD 28 z komórek T i B 7 z komórek B oraz
 - ◇ CD 5 i CD 72, o których już była mowa.

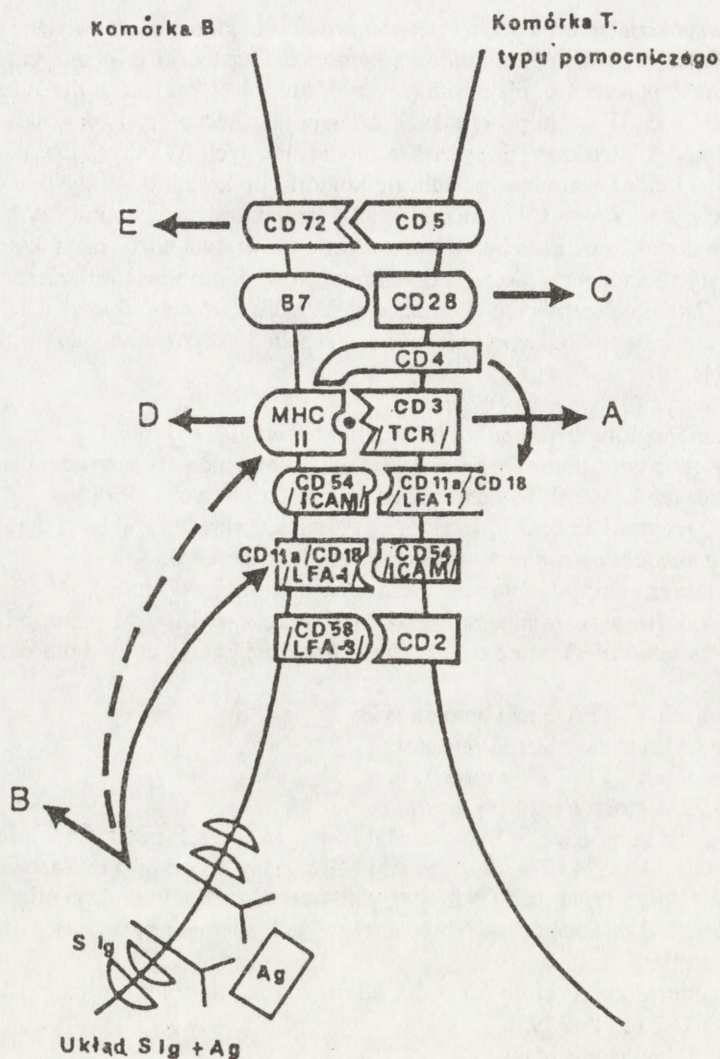
Krytyczny sygnał dla komórek T, a być może także dla komórek B pochodzi z interakcji między antygenem CD 3 komórki T a cząsteczkami MHC klasy II komórki B. Zarówno CD 3, jak i antygeny MHC klasy II należą do nadrodziny immunoglobulin. Interakcja między CD 3 a MHC klasy II inicjuje kaskadę zdarzeń biochemicznych, ale nie jest wystarczająca dla pełnej aktywacji komórki B.

Aby wystąpiła adhezja komórki do komórki, konieczna jest łączność między LFA-1 i ICAM oraz między CD 2 i LFA-3 [93].

LFA-1 składa się z dwu łańcuchów:

- alfa 1 określanego jako antygen CD 11 a
- beta 2 określanego jako antygen CD 18

stąd jego druga nazwa CD 11 a/CD 18. LFA-1 występuje zarówno na limfocytach T, jak i B (zwłaszcza na limfocytach B CD 5⁺), na dużych ziarnistych limfocytach, monocytach-makrofagach i granulocytach. Jego ligandami są ICAM-1 i ICAM-2. ICAM-1 jest obecnie określanany jako CD 54. ICAM podobnie jak LFA-1 występuje na aktywnych limfocytach, monocytach-makrofagach, a ponadto na fibroblastach, komórkach śródbłonkowych i nabłonkowych. LFA-1 należy do rodziny integrzyn leukocytów, zaś ICAM do nadrodziny immunoglobulin [3, 116]. Ponieważ LFA-1 i ICAM-1 występują zarówno na limfocytach T, jak i B możliwa jest dwukierunkowa interakcja. Co więcej aktywacja receptorów dla antygeny komórki T [93] lub komórki B [24] indukuje wysokie powinowactwo wiązań między LFA-1



Rys. 1. (wg [25]) Przedstawiono pary cząsteczek powierzchni komórkowej, które uczestniczą we wzajemnych kontaktach między komórkami B a pomocniczymi komórkami T, w dolnej części rysunku na komórce B zaznaczono powierzchniowe immunoglobuliny (S Ig), które dostarczają antygen (Ag) do wnętrza komórki, gdzie ulega on degradacji i gdzie jego peptydy mogą się wiązać z klasą II cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej (MHC II); na rysunku zaznaczono strzałką przerywaną; strzałkami jednolitymi zaznaczono poszczególne, już znane sygnały transdukcji; strzałki A i B odpowiadają sygnałom transdukcji, które wywołuje reakcja antygen-przeciwciało; podczas przebiegu tych sygnałów zachodzi fosforylacja tyrozyny i rozkład fosfoinozytolu; receptory dla antygeny regulują także powinowactwo CD 11a/CD18 (LFA-1) do CD 54 (ICAM), a być może również udział tych cząsteczek w transdukcji sygnałów; cząsteczka CD 28 na komórce T wysyła do jej wnętrza szczególny sygnał (strzałka C); jak się wydaje, na komórkach B antygeny klasy II MHC i ligand CD 72 (Lya-2) indukują odrębne sygnały (strzałki D i E); nie ustalono jednak, czy występuje wymiana interleukin i wiązanie z odpowiednim receptorem drugiej komórki; objaśnienie skrótów: MHC II (skrót od *major histocompatibility complex*) – klasa II antygenów głównego układu zgodności tkankowej; TCR (skrót od *T-cell receptor*) – receptor komórki T; LFA (skrót od *lymphocyte-function associated antigens*) – antygeny związane z czynnością limfocytów; ICAM (skrót od *intercellular cell-adhesion molecules*) – molekuly komórek warunkujące adhezję międzykomórkową

a ICAM, co ułatwia dwukierunkowy przebieg sygnałów i reguluje związanie jednej komórki z drugą.

Następną parę adhezyjnych cząsteczek tworzą CD 2 komórki T i LFA-3 (CD 58) komórki B. CD 2 wcześniej znany jako receptor dla krwinek czerwonych barana w istocie pośredniczy w przyleganiu limfocytów T do swoistych dla nich partnerów komórkowych, a następnie odgrywa rolę w transdukcji sygnałów do wnętrza komórki, w wyniku czego dochodzi do aktywacji limfocytów T [73]. Na powierzchni limfocytów T CD 2 jest związany fizycznie z CD 45 [87]. LFA-3 jest ligandem CD 2 znajdującym się na limfocytach B. LFA-3 występuje na komórkach różnych typów i m.in. jest homologiczny z białkiem T 11TS krwinek czerwonych barana odgrywającym istotną rolę w tworzeniu rozet z limfocytami T [101]. Zarówno CD 2, jak i LFA-3 należą do nadrodziny immunoglobulin [116]. Geny CD2 i LFA-3 leżą w bezpośredniej bliskości w chromosomie 1 i sugeruje się ich pieczętowitz przechowywanie w procesie ewolucji [66].

Niedawno wykazano interakcję innej pary cząsteczek. Są to: B 7/BB 1 z komórek B i CD 28 z komórek T [62]. Antygen B 7 należy do antygenów aktywacji, ale jego występowanie ogranicza się wyłącznie do linii komórek B [36, 114] i to albo komórek B preaktywowanych, albo do blastycznych komórek B [102]. Jest członkiem nadrodziny immunoglobulin.

CD 28 podobnie jak B 7 należy do antygenów aktywacji [54, 89]. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 44 kDa występująca na ok. 80% komórek T krwi obwodowej człowieka. Struktura CD 28 jest zbliżona do struktury immunoglobulin (*immunoglobulin-like*). W ontogenezie limfocytów T pojawia się na tymocytach, które są jeszcze CD 3 ujemne. Podczas dojrzewania komórek T w grasicy słaba ekspresja CD 28 występuje na powierzchni niedojrzałych, podwójnie dodatnich (*double-positive*) tymocytów CD 4⁺ i CD 8⁺. Na dojrzałych tymocytach stopień ekspresji CD 28 jest istotnie wyższy. We krwi obwodowej ok. 95% pomocniczych komórek T nosi antygen CD 28, a ponadto występuje on na ok. 50% supresorowych komórek T [54]. Przeciwciała skierowane przeciw CD 28 komórek T działają synergistycznie z przeciwciałami skierowanymi przeciw receptorowi komórki T pobudzając transkrypcję IL-2 [33] i stabilizując informacyjny RNA (mRNA) [61].

De Franco [25] sugeruje, że para cząsteczek B 7 - CD 28 wysyła kluczowy sygnał komórce T. Sygnał ten może być ekwiwalentem dodatkowego działania stymulującego, pochodzącego od komórki prezentującej antygen. Wiadomo zaś, że stymulacja przez komórki prezentujące antygen jest niezbędna dla wywołania silnej dodatniej reakcji na antygen ze strony komórek T [23, 57, 75]. Ponadto chimeryczne białko B 7-IgG dostarcza dalszych bodźców stymulujących koniecznych dla proliferacji komórki T i akumulacji mRNA IL-2 [62]. Tak więc interakcja między antygenami B 7 z powierzchni komórki B a CD 28 z powierzchni komórki T, jak się wydaje, warunkuje wysłanie ważnego sygnału aktywacji do wnętrza komórki T, który działa synergistycznie z sygnałem receptora dla antygeny komórki T. Przy okazji nasuwa się pytanie, czy interakcja ta powoduje, że B 7 przesyła podobny sygnał komórce B.

Po tych rozważaniach na temat interakcji pomocniczych komórek T i komórek B prowadzącej ostatecznie do odpowiedzi immunologicznej należy się zastanowić nad rolą komórek B noszących antygen CD 5 w warunkach fizjologicznych. Dość liczne dane wskazują, że komórki B CD 5⁺ wytwarzają "naturalne" wielospecyficzne (polireaktywne) przeciwciała, co oznacza, że pojedyncza cząsteczka przeciwciała może wiązać zarówno własne, jak i egzogenne antygeny [76]. W ostatnim dziesięcioleciu nagromadzono dość dużo danych dotyczących autoprzeciwciał. Streszczając wykazano, że:

- naturalne, wielospecyficzne autoprzeciwciała stanowią istotną część prawidłowych krążących immunoglobulin [39];
 - pojawienie się monoklonalnych przeciwciał (które m.in. występują w chorobach autoimmunologicznych [107] i nowotworach) wiąże się z ekspansją klonów wytwarzających w warunkach prawidłowych naturalne autoprzeciwciała [27];
 - prekursorzy (komórki klonogenne) komórek wytwarzających naturalne autoprzeciwciała istnieją w składzie prawidłowej populacji komórek B [28, 83];
 - naturalne autoprzeciwciała są często produktem klonów z ekspresją genów linii zarodkowej [5, 64];
 - u myszy komórki B noszące antygen Ly-1 (homologiczny z CD 5 człowieka) stanowią odrębną, niewielką subpopulację spontanicznie wytwarzającą autoprzeciwciała [41, 45].
- Naturalne, wielospecyficzne przeciwciała syntetyzowane przez ludzkie komórki B CD 5⁺ (choć także, jakkolwiek w niewielkim stopniu komórki B CD 5⁻ uczestniczą w ich wytwarzaniu) najczęściej należą do klasy IgM i cechuje je niski stopień powinowactwa zarówno do własnych, jak i obcych antygenów [17, 18, 19]. Wiążą one szereg autoantygenów, które przedstawiono w tabeli I (wg [4]), jak również egzogenne antygeny, jak np. komponenty ściany komórki bakteryjnej [76]. Jak się wydaje, ich rola m.in. polega na oczyszczaniu (*clearing*) krwi z krążących autoantygenów, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko autoimmunizacji, zwłaszcza że autoantygeny nawet w warunkach prawidłowych są stale uwalniane z rozpadających się starych tkanek. Ponadto wielospecyficzne przeciwciała stanowią pierwszą linię obronną skierowaną przeciw bakteriom i wirusom, działającą jeszcze przed rozwojem specyficznej odporności [17, 18, 19].

TABELA 1. Autoprzeciwciała wykryte w prawidłowej surowicy człowieka [4]

Docelowe antygeny	Izotyp przeciwciała	Wielospecyficzność
Składowe wnętrza komórki		
Aktyna, tubulina, miozyna, keratyna, DNA, mioglobulina, cytochrom C, kolagen, zasadowe białko mieliny	IgM, IgG i IgA	Znana
Protamina	IgM	Nieznana
Składowe błony komórkowej		
Beta2-mikroglobulina, spektryna, białko elektroforetycznie określone jako białko prążka-3 (<i>band-3 protein</i>), komponenta sekrecyjna	IgG	Nieznana
Białka krążące		
Albumina, transferyna, FcIgG	IgM, IgG i IgA	Znana
Cytokiny		
Interferony, interleukina 1 alfa	IgG	Nieznana
Czynnik martwicy nowotworów (<i>tumor necrosis factor</i>) – kachektyna	IgM i IgG	Nieznana
Hormony i związki pokrewne		
Insulina	IgG	Nieznana
Tyreoglobulina	IgM i IgG	Znana
Małe cząsteczki		
VIP (skrót od <i>vasoactive intestinal polypeptide</i>) – polipeptyd jelitowy działający na naczynia, cholesterol, epitop glikozydowy Gal alfa 1 - 3 Gal	IgG	Nieznana
Difosfotydyloglicerol, kwas fosfatydowy, fosfatydyloseryna	IgM, IgG i IgA	Znana

Ta fizjologiczna rola komórek B CD 5⁺ wiąże się ze wzrostem ich populacji w wielu stanach patologicznych i to zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. I tak komórki B CD 5⁺ stanowią większość, jeśli nie wszystkie, komórki we krwi obwodowej krów [26] i owiec [60] zakażonych wirusem białaczki bydła (*bovine leukemia virus*, w skrócie BLV). Przy tym u krów zakażonych BLV rozwija się stosunkowo łagodnie przebiegająca przewlekła limfocytoza, podczas gdy u owiec często dochodzi do powstania mięsaka limfatycznego [13, 84]. Proliferująca populacja komórek B CD 5⁺ nie jest specyficzna dla zakażenia BLV, za czym m.in. przemawiają badania Holmesa i wsp. [49], którzy wykazali ekspresję mysiego homologu CD 5 w większości linii komórkowych transformowanych przez różne retowirusy. Donoszono także o dramatycznym wzroście populacji komórek B CD 5⁺ u owiec po inwazji świdrowca kongijskiego (*Trypanosoma congolense*) [111].

Komórki B CD 5⁺ odgrywają rolę w niektórych chorobach autoimmunizacyjnych u ludzi. I tak istotnie podwyższoną ilość komórek B CD 5⁺ wykryto we krwi obwodowej u młodzieży z seronegatywnym zapaleniem stawów (*juvenile arthritis*) [70], a także u dorosłych z reumatoidalnym zapaleniem stawów [6, 82, 90, 100]. W tym drugim schorzeniu komórki B CD 5⁺ wykryto nie tylko we krwi obwodowej, ale i węzłach chłonnych [112]. Ponadto w reumatoidalnym zapaleniu stawów stwierdzono statystycznie istotną korelację między poziomem czynnika reumatoidalnego klasy IgM a odsetkiem komórek B CD 5⁺ we krwi obwodowej [115]. W warunkach "in vitro" wykazano, że komórki B noszące antygen Leu-1 (CD 5⁺) stymulowane *Staphylococcus aureus* wytwarzają i wydzielają czynnik reumatoidalny IgM [42]. Niektórzy autorzy uważają, że komórki B CD 5⁺ wytwarzają także przeciwciała antyjądrowe, przy czym ich aktywność może być modulowana leczeniem [6].

Smith i Olson [90] obserwowali dramatyczny wzrost (do 68%) komórek B CD 5⁺ we krwi obwodowej u pacjenta z toczniem rumieniowatym trzewnym, przy czym regresja tej subpopulacji wiązała się z poprawą stanu klinicznego w następstwie leczenia. Z drugiej strony Becker i wsp. [6] mówią o tylko nieznacznie podwyższonym odsetku komórek B CD 5⁺ u chorych z toczniem.

Podwyższone odsetki komórek B CD 5⁺ wykryto także w innych chorobach autoimmunologicznych, takich jak:

- w zespole Sjögrena [10],
- w nefropatii IgA [65],
- w chorobie Graves-Basedowa [52],
- w cukrzycy typu I z przeciwciałami skierowanymi przeciw komórkom Langerhansa [6].

W przeciwieństwie do stanu prawidłowego, gdzie wielospecyficzne przeciwciała wydzielane przez komórki B CD 5⁺ charakteryzuje niski stopień powinowactwa zarówno wobec własnych, jak i obcych antygenów – autoprzeciwciała wytwarzane przez komórki B CD 5⁺ u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi wykazują wysokie powinowactwo i specyficzność wobec autoantygenów. Tak np. czynnik reumatoidalny u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów silnie i specyficznie wiąże fragment Fc IgG, chociaż u osób zdrowych cechuje go wielospecyficzność [12].

Wykryto także, że w śledzionach u zdrowych szczepów myszy, które są szczególnie podatne na choroby autoimmunologiczne, takich jak np. szczep NZB i (NZB x NZW) F₁ populacja komórek B Ly-1⁺ jest istotnie większa niż w innych szczepach. Co więcej w hodowli komórki te "spontanicznie", tj. bez stymulacji antygenowej wydzielają IgM [45]. Ponadto klon komórek B Ly-1⁺ wykryto u starzejących się myszy (powyżej 15 miesięcy życia) pochodzących ze szczepów nie wykazujących tendencji do autoimmunizacji, jak np. myszy

BALB/c, CBA itd., a także u starych ludzi (cyt. wg [94]). W tych przypadkach często występują choroby autoimmunologiczne [21, 31].

W modelowym szczepie myszy NZB Stall i wsp. [94] badali powiązanie między autoimmunizacją a rozwojem przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej. Autorzy wykazali, że już u pozornie zdrowych młodych myszy dochodzi do ekspansji klonu komórki B Ly-1⁺. Komórki te poza antygenem Ly-1 noszą jeszcze drugi niekonwencjonalny dla komórek B antygen - CD 11 b (Mac-1), charakteryzujący układ granulocytów - monocytów - makrofagów i naturalne komórki cytotoksyczne [3].

Klon komórki B Ly-1⁺ rozwija się we wczesnym okresie życia myszy NZB w otrzewnej i szerzy się w pewien charakterystyczny sposób (otrzewna - śledziona - węzły chłonne - szpik). Stall i wsp. [94] przypuszczają, że rozwój klonu komórek B Ly-1⁺ jest naturalnym wynikiem swego rodzaju unikalnej ontogenezy linii B Ly-1⁺ zarówno u myszy, jak i jej odpowiednika u człowieka. Stereotypowo komórki B odnawiają się w ciągu całego życia osobniczego z puli komórek macierzystych niezdolnych jeszcze do ekspresji Ig. Natomiast komórki B Ly-1⁺ powstają wprawdzie również z komórek prekursorowych Ig ujemnych, ale ma to miejsce tylko podczas pierwszych kilku tygodni życia zwierzęcia, a następnie tworzą samoodnawiającą się populację, w której dojrzałe komórki B Ly-1⁺ Slg⁺ ulegają podziałom [44, 46, 47]. Wrodzone lub nabyte różnice w zdolności do podziałów komórkowych poszczególnych klonów komórki B Ly-1⁺ ostatecznie prowadzą do dominacji jednego klonu naciekającego cały układ chłonny. Klon ten ma podobnie jak komórki nowotworowe zdolność do nieograniczonego wzrostu i może być łatwo pasażowany do napromienionych lub nienapromienionych, syngenicznych i kongenicznych allotypowo biorców. Charakteryzuje go więc wysoki stopień ekspansywności. Powstanie i rozwój ekspansywnego klonu w populacji komórek B Ly-1⁺ wiąże się z większymi możliwościami ekspozycji długo żyjących i samoodnawiających się komórek tej populacji na różne stymulatory prowadzące do hyperplazji i transformacji nowotworowej. Do stymulatorów tych m.in. należą zarówno autoantygeny, jak i antygeny środowiskowe, na które reagują komórki B Ly-1⁺.

U ludzi, jak to wykazali Borche i wsp. [9], białczkowe komórki z przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej wytwarzają i wydzielają autoprzeciwciała często o aktywności czynnika reumatoidalnego, przy czym autorzy sugerują, że jest to nowotworowy odpowiednik prawidłowych komórek B CD 5⁺. Zdaniem autorów z międzynarodowej Grupy Badaczy Francusko-Amerykańsko-Brytyjskich [7] cztery markery decydują o rozpoznaniu przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej; są to:

- słaba ekspresja powierzchniowych immunoglobulin zwykle klasy mi i delta,
- zdolność tworzenia rozet z erytrocytami myszy przez co najmniej 30% komórek,
- ekspresja antygeny CD 5 na ponad 50% komórek,
- ekspresja antygeny CD 22 na ponad 30% komórek (antygen CD 22 jest częścią adhezji z nadrodziny immunoglobulin, która ułatwia przyleganie monocytów i erytrocytów analogicznie jak antygen CD 2 komórek T) [95].

Chociaż białczkowe komórki noszą jeszcze inne markery immunologiczne (patrz praca pogładowa [86]), to jednak uderzająca zbieżność z markerami prawidłowych komórek B CD 5⁺ pozwala sugerować, że klon nowotworowy w przewlekłej białaczce limfatycznej B komórkowej wychodzi z tej właśnie populacji. Co więcej Ddamarż i wsp. [22] wykazali, że klonogenne komórki z przewlekłej białaczki limfatycznej B komórkowej noszą antygen CD 5. W odniesieniu do biologii tej choroby, jest to o tyle istotne, że na białczkowych komórkach B (podobnie zresztą jak i na prawidłowych komórkach B CD 5⁺) obok antygeny CD 5

występuje także jego ligand CD 72, w związku z czym van de Velde i wsp. [104] sugerują, że interakcja CD 5 - CD 72 powoduje autostymulacyjny wzrost białaczkowych komórek. Sugestia ta znajduje potwierdzenie w fakcie, że białaczkowe komórki B CD 5⁺ wytwarzają i wydzielają czynnik wzrostu komórki B (*B cell growth factor*) [56]. Tak więc ekspresja antygeny CD 5 na komórkach B może odgrywać rolę w ich proliferacji po transformacji nowotworowej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ANDREU JL, FARO J, ALONSO JM, PAIGE CJ, MARTINEZ-A C, MARCOS MAR. Ontogenic characterization of thymic B lymphocytes. Analysis in different mouse strains. *Eur J Immunol* 1990; **20**: 1767-1773.
- [2] ANTIN JH, EMERSON SG, MARTIN P, GADOL N, AULT KA. Leu-1⁺/CD 5⁺ B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J Immunol* 1986; **136**: 505-510.
- [3] ARNAOUT MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD 11/CD 18. *Blood* 1990; **75**: 1037-1050.
- [4] AVRAMEAS S. Natural autoantibodies: from "horror autotoxicus" to "gnothi seauton". *Immunol. Today* 1991; **12**: 154-159.
- [5] BACCALA R, QUANG TV, GILBERT M, TERNYNCK T, AVRAMEAS S. Two murine natural polyreactive autoantibodies are encoded by nonmutated germ-line genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 4624-4628.
- [6] BECKER H, WEBER C, STORCH S, FEDERLIN K. Relationship between CD 5⁺ B lymphocytes and the activity of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; **56**: 219-225.
- [7] 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.
- [8] BOFILL M, JANOSSY G, JANOSSA M, BURFORD GD, SEYMOUR GJ, WERNET P, KELEMEN E. Human B cell development. II Subpopulations in the human fetus. *J Immunol* 1985; **134**: 1531-1538.
- [9] BORCHE L, LIM A, BINET J-L, DIGHIERO G. Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood* 1990; **76**: 562-569.
- [10] BRENNAN F, PLATER-ZYBERK C, MAINI RN, FELDMANN M. Coordinate expansion of "fetal type" lymphocytes (TCR gamma delta⁺ T and CD 5⁺ B) in rheumatoid arthritis and primary Sjören's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1989; **77**: 175-178.
- [11] BRIAN AA. Stimulation of B-cell proliferation by membrane-associated molecules from activated T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 564-568.
- [12] BURASTERO SE, CUTOLO M, DESSI V, CELADA F. Monoreactive and polyreactive rheumatoid factors produced by "in vitro" Epstein-Barr virus-transformed peripheral blood and synovial B lymphocytes from rheumatoid arthritis patients. *Scand J Immunol* 1990; **32**: 347-357.
- [13] BURNY A, CLEUTER Y, KETTMAN R, MAMMERICKX M, MARBAIX G, PORTETELLE D, VAN DEN BROEKE A, WILLEMS L, THOMAS R. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Cancer Surv* 1987; **6**: 139-159.
- [14] CALIGARIS-CAPPIO F, GOBBI M, BOFILL M, JANOSSY G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1982; **155**: 623-627.
- [15] CALIGARIS-CAPPIO F, RIVA M, TESIO L, SCHENA G, GAIDANO G, BERGUI L. Human normal CD 5⁺ B lymphocytes can be induced to differentiated to CD 5⁻ B lymphocytes with germinal center cell features. *Blood* 1989; **73**: 1259-1263.
- [16] CASALI P, BURASTERO SE, NAKAMURA M, INGHIRAMI G, NOTKINS AL. Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1⁺ B-cell subset. *Science* 1987; **236**: 77-81.
- [17] CASALI P, NOTKINS AL. CD 5⁺ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 1989; **10**: 364-368.
- [18] CASALI P, NOTKINS AL. Probing the human B-cell repertoire with EBV: polyreactive antibodies and CD 5⁺ B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 513-535.
- [19] CASALI P, PRABHAKAR BS, NOTKINS AL. Characterization of multireactive autoantibodies and identification of Leu-1⁺ B lymphocytes as cells making antibodies binding multiple self and exogenous molecules. *Int Rev Immunol* 1988; **3**: 17-45.

- [21] CONLEY CL, MISTI J, LASTER AJ. Genetic factors predisposing to chronic lymphocytic leukemia and to autoimmune disease. *Medicine* 1980; **59**: 323-334.
- [22] DADMARZ R, RABINOWE SN, CANNISTRA SA, ANDERSEN JW, FREEDMAN AS, NADLER LM. Association between clonogenic cell growth and clinical risk group in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1990; **76**: 142-149.
- [23] DAMLE NK, LINSLEY PS, LEDBETTER JA. Direct helper T-cell-induced B-cell differentiation involves interaction between T-cell antigen-CD 28 and B-cell activation antigen-B7. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1277-1282.
- [24] DANG LH, ROCK KL. Stimulation of B lymphocytes through surface Ig receptors induces LFA-1 and ICAM-1-dependent adhesion. *J Immunol* 1991; **146**: 3273-3279.
- [25] DEFRANCO A.L. Between B cells and T cells. *Nature* 1991; **351**: 603-604.
- [26] DEPELCHIN A, LETESSON JJ, LOSTRIE N, MAMMERICKX M, PORTETELLE D, BURNY A. Bovine leukemia virus (BLV) infected B cells express a marker similar to the CD 5 T cell marker. *Immunol Lett* 1989; **20**: 69-76.
- [27] DIGHIERO G, GUILBERT B, FERMAND JP, LYMBERI P, DANON F, AVRAMEAS S. Thirty-six human monoclonal immunoglobulins with antibody activity against cytoskeleton proteins, thyroglobulin and native DNA: immunologic studies and clinical correlations. *Blood* 1983; **62**: 264-270.
- [28] DIGHIERO G, LYMBERI P, MAZIE JC, ROUYRE S, BUTTLER-BROWNE GS, WHALEN RG, AVRAMEAS S. Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J Immunol* 1983; **131**: 2267-2272.
- [29] DÖRKEN B, MÖLLER P, PEZZUTTO A, SCHWARTZ-ALBIEZ R, MOLDENHAUER G. [w] "Leukocyte Typing IV". (red.) Knapp W. i wsp.; Oxford University Press, Oxford 1989: 15-32.
- [30] DÖRKEN B, MÖLLER P, PEZZUTTO A, SCHWARTZ-ALBIEZ R, MOLDENHAUER G. [w] "Leukocyte Typing IV". (red.) Knapp W. i wsp., Oxford University Press, Oxford 1989: 99-100.
- [31] FOON KA, GALE RP. [w] "Leukemia: Recent Advances in Biology and Treatment". (red.) Gale RP, Golde DW. Liss, New York. 1985: 675-714.
- [32] FÖRSTER J, RAJEWSKY K. Expansion and functional activity of Ly-1⁺ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 521-528.
- [33] FRASER JD, IRVING BA, CRABTREE GR, WEISS A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD 28. *Science* 1991; **251**: 313-316.
- [34] FREEDMAN AS. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol./Oncol Clin North Am* 1990; **4**: 405-429.
- [35] FREEDMAN AS, BOYD AW, BIEBER F, DALEY J, ROSEN K, HOROWITZ J, LEVY D, NADLER LM. Normal cellular counterparts of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1987; **70**: 418-427.
- [36] FREEDMAN AS, FREEMAN G, HOROWITZ JC, DALEY J, NADLER LM. B 7, a B cell restricted antigen which identifies preactivated B cells. *J Immunol* 1987; **137**: 3260-3267.
- [37] FREEDMAN AS, FREEMAN G, WHITMAN J, SEGIL J, DALEY J, LEVINE H, NADLER LM. Expression and regulation of CD 5 on "in vitro" activated human B cells. *Eur J Immunol* 1989; **19**: 849-855.
- [38] FREEDMAN AS, FREEMAN G, WHITMAN J, SEGIL J, DALEY J, NADLER LM. Studies on "in vitro" activated CD 5⁺ B cells. *Blood* 1989; **73**: 202-208.
- [39] GUILBERT B, DIGHIERO G, AVRAMEAS S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in normal humans. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol* 1982; **128**: 2779-2787.
- [40] HARDIN JA, GIBSON M, KAWANO Y, SPIELBERG S, MARTIN C, COLLINS M, DORF ME, SHERR DH. Characterization of a B cell helper factor(s) derived from CD 5⁺ B cell hybridomas. *Cell Immunol* 1990; **126**: 304-321.
- [41] HARDY RR, HAYAKAWA K. Development and physiology of Ly-1 B and its human homolog Leu-1 B. *Immunol Rev* 1986; **93**: 53-79.
- [42] HARDY RR, HAYAKAWA K, SHIMIZU M, YAMASAKI K, KISHIMOTO T. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1⁺ B cells. *Science* 1987; **236**: 81-83.
- [43] HAYAKAWA K, HARDY RR. Normal, autoimmune, and malignant CD 5⁺ B cells: the Ly-1 B lineage? *Annu Rev Immunol* 1988; **6**: 197-218.
- [44] HAYAKAWA K, HARDY RR, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 1985; **161**: 1554-1568.
- [45] HAYAKAWA K, HARDY RR, PARKS DR, HERZENBERG LA. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983; **157**: 202-218.
- [46] HAYAKAWA K, HARDY RR, STALL AM, HERZENBERG LA, HERZENBERG LA. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol* 1986; **16**: 1313-1316.
- [47] HERZENBERG LA, STALL AM, LALOR PA, SIDMAN C, MOORE WA, PARKS DR, HERZENBERG LA. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 1986; **93**: 81-102.

- [48] HODGKIN PD, YAMASHITA LC, COFFMAN RL, KEHRY MR. Separation of events mediating B cell proliferation and Ig production by using T cell membranes and lymphokines. *J Immunol* 1990; 145: 2025-2034.
- [49] HOLMES KL, PIERCE JH, DAVIDSON WF, MORSE HC. III. Murine hematopoietic cells with pre-B or pre-B/myeloid characteristics are generated by "in vitro" transformation with retroviruses containing *fos*, *ras*, *abl*, and *src* oncogenes. *J Exp Med* 1986; 164: 443-457.
- [50] HUANG HJ, JONES NH, STROMINGER JL, HERZENBERG LA. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T 1 (CD 5). *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 204-208.
- [51] HUETZ F, PONCET P, COUTINHO A, PORTNOI D. Ontogenic development of autoantibody repertoires in spleen and peritoneal cavity of normal mice: examples of T-cell-dependent and -independent reactivities. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1195-1201.
- [52] IWATANI Y, AMINO N, KANEDA T, ICHIHARA K, TAMAKI H, TACHI J, MATSUZUKA F, FUKATA S, KUMA K, MIYAI K. Marked increase of CD 5⁺ B-cells in hyperthyroid Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1989; 78: 196-200.
- [53] JONES NH, CLABBY ML, DIALYNAS DP, HUANG HJ, HERZENBERG LA, STROMINGER JL. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 1986; 323: 346-349.
- [54] JUNE CH, LEDBETTER JA, LINSLEY PS, THOMPSON CB. Role of the CD 28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 1990; 11: 211-216.
- [55] KAMAI M, KATIRA A, GORDON J. Stimulation of lymphocytes-B via CD 72 (human Lyb-2). *Eur J Immunol* 1991; 21: 1419-1424.
- [56] KAWAMURA N, MURAGUCHI A, HORI A, HORII Y, MUTSUURA S, HARDY RR, KIKUTANI H, KISHIMOTO T. A case of human B cell leukemia that implicates an autocrine mechanism in the abnormal growth of Leu 1 B cells. *J Clin Invest* 1986; 78: 1331-1338.
- [57] KOULOVA L, CLARK EA, SHU G, DUPONT B. The CD 28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD 4⁺ T-cells. *J Exp Med* 1991; 173: 759-762.
- [58] KROESE FGM, BUTCHER EC, STALL AM, LALOR PA, ADAMS S, HERZENBERG LA. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int Immunol* 1989; 1: 75-84.
- [59] LEDBETTER JA, JUNE CH, GROSMARE LS, RABINOVITCH PS. Crosslinking of surface antigens causes mobilization of intracellular ionized calcium in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1384-1388.
- [60] LETESSON JJ, MAGER A, MAMMERICKX M, BURNY A, DEPELCHIN A. B cells from bovine leukemia virus-(BLV) infected sheep with hematological disorders express the CD 5 T cell marker. *Leukemia* 1990; 4: 377-379.
- [61] LINDSTEIN T, JUNE CH, LEDBETTER JA, STELLA G, THOMPSON CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244: 339-343.
- [62] LINSLEY PS, BRADY W, GROSMARE LS, ARUFFO A, DAMLE NK, LEDBETTER JA. Bringing of the B-cell activation antigen B 7 to CD 28 costimulates T-cell proliferation and interleukin-2 messenger RNA accumulation. *J Exp Med* 1991; 173: 721-730.
- [63] LINSLEY PS, CLARK EA, LEDBETTER JA. T-cell antigen CD 28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B 7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5031-5035.
- [64] LYMBERI P, DIGHIERO G, TERNYNCK T, AVRAMEAS S. A high incidence of cross-reactive idiotypes among murine natural autoantibodies. *Eur J Immunol* 1985; 15: 702-707.
- [65] MAGYARLAKI T, DAVIN JC, SZABADOS E, KOCSIS B, NAGY J. Peripheral B-lymphocyte markers and function in IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1990; 33: 123-129.
- [66] MAKGOBA MW, SANDERS MW, SHAW S. The CD 2 - LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition. *Immunol Today* 1989; 10: 417-422.
- [67] MARCOS MAR, DE LA HERA A, PEREIRA P, MARQUEZ C, TORIBIO ML, COUTINHO A, MARTINEZ-A C. B cell participation in the rescusive selection of T cell repertoires. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1015-1020.
- [68] MARCOS MAR, GUTIERREZ JC, HUETZ F, MARTINEZ-A C, DIETERLEN-LIÈVRE F. Waves of B-lymphopoesis in the establishment of the mouse B-cell compartment. (Editorial) *Scand J Immunol* 1991; 34: 129-139.
- [69] MARCOS MAR, HUETZ F, PEREIRA P, ANDREU JL, MARTINEZ-A C, COUTINHO A. Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1989; 19: 2031-2035.
- [70] MARTINI A, MASSA M, DE BENEDETTI F, VIOLA S, NEIROTTI G, BURGIO RG. CD 5 positive B lymphocytes in seronegative juvenile arthritis. *J Rheumatol* 1990; 17: 932-935.
- [71] MILLER RA, GRALOW J. The induction of Leu-1 antigen expression in human malignant and normal B cells by phorbol myristic acetate (PMA). *J Immunol* 1984; 133: 3408-3414.

- [72] MIYABA-INABA M, KUMA SI, INABA K, OGATA H, IWAI H, YASUMIZU R, MURAMATSU S, STEINMAN RM, IKEHARA S. Unusual phenotype of B cells in the thymus of normal mice. *J Exp Med* 1988; **168**: 811–816.
- [73] MOINGEON P, CHANG H-C, WALLNER BP, STEBBINS C, FREY AZ, REINHERZ EL. CD 2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* 1989; **339**: 312–314.
- [74] MÖLLER G. (red.) B-cell lineages. *Immunol Rev* 1986; **93**: 5–164.
- [75] MUELLER DL, JENKINS MK, SCHWARTZ RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: A costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 445–480.
- [76] NAKAMURA M, BURASTERO SE, NOTKINS AL, CASALI P. Human monoclonal rheumatoid factor-like antibodies from CD 5 (Leu-1)⁺ B cells are polyreactive. *J Immunol* 1988; **140**: 4180–4186.
- [77] NAKAYAMA E, VON HOEGEN I, PARNES JR. Sequence of the Lyb-2 B-cell differentiation antigen defines a gene superfamily of receptors with inverted membrane orientation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1352–1356.
- [78] NISHIMURA Y, BIERER BE, JONES WK, JONES NH, STROMINGER JL, BURAKOFF SJ. Expression and function of a CD 5 cDNA in human and murine T cells. *Eur. J Immunol* 1988; **18**: 747–753.
- [79] NOELLE RJ, DAUM J, BARTLETT WC, MCCANN J, SHEPHERD DM. Cognate interaction between helper T cells and B cells. Reconstruction of T helper cell function using purified plasma membranes from activated Th1 and Th2 helper cells and lymphokines. *J Immunol* 1991; **146**: 1118–1124.
- [80] OKUMURA K, HAYAKAWA K, TADA T. Cell-to-cell interaction controlled by immunoglobulin genes. Roles of Thy-1, Lyt-1⁺. Ig⁺ (B') cell in allotype-restricted antibody production. *J Exp Med* 1982; **156**: 443–453.
- [81] PAZZUTTO A, DÖRKEN B, VALENTINE MA, SHU GL, CLARK EA. [w] "Leukocyte Typing IV" (red.) Knapp W. i wsp.; Oxford University Press, Oxford. 1989: 178–182.
- [82] PLATER-ZYBERK C, MAINI RN, LAM K, KENNEDY TD, JANOSSY G. A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. *Arthritis Rheum* 1985; **28**: 971–976.
- [83] PRABHAKAR BS, SAEGUSA J, ONODERA T, NOTKINS AL. Lymphocytes capable of making monoclonal autoantibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire. *J Immunol* 1984; **133**: 2815–2817.
- [84] ROGERS RJ, CHUNG YS, DIMMOCK CK. Development of lymphosarcoma in sheep after inoculation with bovine leukemia virus. *Aust Vet J* 1984; **61**: 196–199.
- [85] ROSENTHAL P, RIMM IJ, UMIEL T, GRIFFIN JD, OSATHANONDH R, SCHLOSSMAN SF, NADLER LM. Ontogeny of human hematopoietic cells: Analysis utilizing monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; **31**: 232–237.
- [86] RUPNIEWSKA ZM, WACH M. Charakterystyka immunologiczna przewlekłej białaczki limfatycznej B ko mórkowej. *Post Biol Kom* 1990; **17**: 271–286.
- [87] SCHRAVEN B, SAMSTAG Y, ALTEVOGT P, MEUER SC. Association of CD 2 and CD 45 on human T lymphocytes. *Nature* 1990; **345**: 71–74.
- [88] SCHWARTING R, STEIN H. [w] "Leukocyte Typing IV". (red.) Knapp W i wsp.; Oxford University Press, Oxford 1989: 100–102.
- [89] SHAW S. Not all in a name. *Nature* 1989; **338**: 539–540.
- [90] SMITH HR, OLSON RR. CD 5⁺ B lymphocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1990; **17**: 833–835.
- [91] SNOW EC, MOND JJ, SUBBARAO B. Enhancement by monoclonal anti-Lyb-2 antibody of antigen-specific B lymphocyte expansion stimulated by TNP-Ficoll and T lymphocyte-derived factors. *J Immunol* 1986; **137**: 1793–1796.
- [92] SPERTINI F, STOHL W, RAMESH N, MOODY C, GEHA RS. Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD 5. *J Immunol* 1991; **146**: 47–52.
- [93] SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; **346**: 425–434.
- [94] STALL AM, FARINAS MC, TARLINTON DM, LALOR PA, HERZENBERG LA, STROBER S, HERZENBERG LA. Ly-1 B-cell clones similar to human chronic lymphocytic leukemias routinely develop in older normal mice and young autoimmune (New Zealand Black-related) animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 7312–7316.
- [95] STAMENKOVIC I, SEED B. The B-cell antigen CD 22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. *Nature* 1990; **345**: 74–77.
- [96] SUBBARAO B, MELCHERS F. The action of an Lyb 2.1-specific monoclonal antibody in soluble or immobilized form on resting and activated B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1984; **113**: 72–76.

- [97] SUBBARAO B, MORRIS J, BALUYUT AR. Properties of anti-Lyb-2-mediated B-cell activation and the relationship between Lyb-2 molecules and receptors for B-cell stimulatory factor-1 on murine B lymphocytes. *Cell Immunol* 1988; **112**: 329-342.
- [98] SUBBARAO B, MOSIER DE. Some compartments of B cell differentiation. *Immunol Rev* 1982; **69**: 81-97.
- [99] SUBBARAO B, MOSIER DE. Induction of B lymphocyte proliferation by monoclonal anti-Lyb 2 antibody. *J Immunol* 1983; **130**: 2033-2037.
- [100] TANIGUCHI O, MIYAJIMA H, HIRANO T, NOGUCHI M, UEDA A, HASHIMOTO H, HIROSE S, OKUMURA K. The Leu-1 B-cell subpopulation in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 1987; **7**: 441-448.
- [101] TIEFENTHALER G, DUSTIN ML, SPRINGER TA, HUNIG T. Serologic cross reactivity of T 11 target structure and LFA-3. Evidence for structural homology of the sheep and human ligands of CD 2. *J Immunol* 1987; **139**: 2696-2701.
- [102] UCKUN FM. Regulation of human B-cell ontogeny. *Blood* 1990; **76**: 1908-1923.
- [103] VANDENBERGHE P, CEUPPENS JL. Immobilized anti-CD 5 together with prolonged activation of protein kinase C induce interleukin 2-dependent T cell growth: evidence for signal transduction through CD 5. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 251-259.
- [104] VAN DE VELDE H, VON HOEGEN I, LUO W, PARNES JR, THIELEMANS K. The B-cell surface protein CD 72/Lyb-2 is the ligand for CD 5. *Nature* 1991; **351**: 662-665.
- [105] VELARDI A, COOPER MD. An immunofluorescence analysis of the ontogeny of myeloid, T and B lineage cells in mouse hemopoietic tissues. *J Immunol* 1984; **133**: 672-677.
- [106] VERWILGHEN J, VANDESANDE R, VANDENBERGHE P, CEUPPENS JL. Crosslinking of the CD 5 antigen on human T cells induces functional IL-2 receptors. *Cell Immunol* 1990; **131**: 109-119.
- [107] VIARD J-P, BACH J-F. Clonality in autoimmune diseases. *Semin Hemat* 1991; **28**: 57-65.
- [108] VON HOEGEN I, HSIEH CL, SCHARTING R, FRANCKE U, PARNES JR. Identity of human Lyb-2 and CD 72 and localization of the gene to chromosome-9. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 1425-1432.
- [109] VON HOEGEN I, NAKAYAMA E, PARNES JR. Identification of a human protein homologous to the mouse Lyb-2 B cell differentiation antigen and sequence of the corresponding cDNA. *J Immunol* 1990; **144**: 4870-4877.
- [110] WEILL JC, REYNAUD CA. The chicken B cell compartment. *Science* 1987; **238**: 1094-1098.
- [111] WILLIAMS DJL, NEWSON J, NAESSENS J. Humoral immune responses in trypanotolerant and susceptible breeds of cattle following secondary challenge with *Trypanosoma congolense*. *Immunobiology* 1989; **4** /suppl./: 152.
- [112] WONG SY, SEWELL HF. CD 5 positive B cells in peripheral blood and lymph nodes in rheumatoid arthritis (letter). *J Clin Pathol* 1991; **44**: 85-86.
- [113] YAKURA H, SHEN FW, KAEMMER M, BOYSE EA. Lyb-2 system of mouse B cells. Evidence for a role in the generation of antibody-forming cells. *J Exp Med* 1981; **153**: 129-135.
- [114] YOKOCHI T, HOLLY RD, CLARK EA. B lymphoblast antigen (BB 1 expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J Immunol* 1982; **128**: 823-827.
- [115] YUINOU PY, MACKENZIE LE, KATSIKIS P, MERDRIGNAC G, ISENBERG DA, TUAILLON N, LAMOUR A, LE GOFF P, JOUQUAN J, DROGOU A i wsp. The relationship between CD 5-expressing B lymphocytes and serologic abnormalities in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *Arthritis Rheum* 1990; **33**: 339-348.
- [116] YONG K, KHWAJA A. Leukocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* 1990; **4**: 211-225.

Otrzymano: 14.11.1991.

Przyjęto: 20.12.1991.

Adres autorów: Klinika Hematologii AM, Lublin

HETEROGENNOŚĆ KOMÓREK TUCZNYCH: FAKT CZY ARTEFAKT?

HETEROGENITY OF MAST CELLS: FACT OR ARTIFACT?

Konrad RYDZYŃSKI

Zakład Oceny Toksyczności, Instytut Medycyny Pracy, Łódź

Streszczenie. W artykule omówiono stan wiedzy na temat zróżnicowania fenotypowego i w tym kontekście istnienia subpopulacji komórek tucznych u zwierząt laboratoryjnych i człowieka. Zestawiono dane o barwliwości, morfologii, składzie ziaren wydzielniczych, mediatorach tworzonych de novo, lokalizacji narządowej i reaktywności komórek tucznych, a także ich ontogenezie.

Summary. This review focuses on the evidence for heterogeneity of mast cell (MC) phenotypic characteristics in rodents and humans. The existence of two major MC subpopulations is critically reviewed. The MC ontogenesis, staining properties, morphology, composition of secretory granules, newly generated mediators, tissue distribution and reactivity is discussed.

WSTĘP

Komórki tuczne (KT) budzą żywe zainteresowanie już od ponad 100 lat. Mimo jednak intensywnych badań i setek prac publikowanych każdego roku na ich temat ciągle kryją w sobie wiele tajemnic. Paradoxem wydaje się fakt, że ostatnie lata, które przyniosły szereg nowych jakościowo informacji o powstawaniu, budowie, biochemii i funkcji tych komórek, nie tylko nie wyjaśniły ostatecznie roli biologicznej KT, ale wręcz przeciwnie, zagmatwały poglądy jeszcze bardziej.

W centrum uwagi znalazł się przede wszystkim problem heterogenności KT. Przez pojęcie to zwykle rozumie się, że różne subpopulacje komórek mają pewne wyróżniające je cechy fenotypowe na tyle ważne biologicznie, aby pozwoliły na zaklasyfikowanie ich do oddzielnych grup. Jest to powszechnie akceptowane, jednak mało precyzyjnie określone i stwarza w praktyce wiele problemów. Komórki tuczne np. mogą różnić się wielkością, budową

*Praca dofinansowana z tematu IMP 1.27.

ultrastrukturalną, zawartością mediatorów, odpowiedzią na różne czynniki; które z kryterium należy przyjąć za decydujące?

KT cechuje zróżnicowana zawartość ważnych biologicznie mediatorów, sposób odpowiedzi na cytokiny, na czynniki sekrecyjne itd. Mają one kluczowe znaczenie w tak zróżnicowanych procesach biologicznych i chorobowych, jak: wzrost i odnowa tkankowa, choroby alergiczne, zapalenia oraz zwalczanie pasożytów jelitowych. Dlatego też ważne jest zagadnienie heterogenności KT, a więc odpowiedź na pytanie, czy mamy do czynienia z jednorodną, czy zróżnicowaną populacją KT. Przyjmując bowiem, że KT są populacją jednorodną moglibyśmy popełnić znaczący błąd generalizując otrzymane informacje, przenosząc je z jednej badanej subpopulacji na ich całość.

W chwili obecnej nie ma nawet pełnej zgody co do precyzyjnej definicji KT. Zazwyczaj mianem tym określa się duże komórki mające w swej cytoplazmie liczne metachromatycznie wybarwiające się, elektronowo-gęste ziarna wydzielnicze. Ziarna te mają macierz utworzoną przez proteoglikany, z którymi związana jest histamina. Inną ważną cechą KT jest obecność na powierzchni ich błony komórkowej receptorów dla IgE i zdolność do odpowiedzi na antygen, anty-IgE bądź chemiczne czynniki sekrecyjne. Odpowiedź ta polega na wydzieleniu zawartości ziaren cytoplazmatycznych.

HETEROGENNOŚĆ KOMÓREK TUCZNYCH GRYZONI

Przez wiele lat KT występujące w tkankach zwierząt laboratoryjnych i człowieka traktowano jako jednorodną populację komórek. Wynikało to prawdopodobnie z faktu, że większość danych na temat składu biochemicznego, budowy morfologicznej, funkcji, a także odpowiedzi farmakologicznej KT uzyskano wykorzystując łatwość otrzymywania dużej liczby tych komórek przez płukanie jamy otrzewnowej szczura lub myszy. Okazało się jednak, że choć jest to model bardzo dogodny, to nie uniwersalny.

W 1966 roku Enerback [15, 16] wykazał stosując różne sposoby utrwalania i barwienia, że w jelicie szczura występują dwa rodzaje KT. Te wyniki wzbudziły wiele kontrowersji i nie spotkały się z należyтым zrozumieniem. Dopiero badania lat osiemdziesiątych [5, 44] doprowadziły do przekonania, że u gryzoni występują dwie odrębne subpopulacje tych komórek: komórki tuczne typowe związane z tkanką łączną – CTMC (*typical, connective tissue, type I mast cell*) i komórki tuczne atypowe związane z błonami śluzowymi – MMC (*atypical, mucosal, type II mast cells*).

BARWLIWOŚĆ

W badaniach morfologicznych te dwie subpopulacje KT odróżnia się dwoma sposobami. Pierwszym z nich jest utrwalanie tkanki w utrwalaczach bezwodnych nie zawierających formaliny, najczęściej w utrwalaczu Carnoya oraz barwienie jej błękitem alcjanu i safraniną. CTMC wybarwiają się safraniną, a MMC błękitem alcjanu. Drugim sposobem jest porównanie barwienia KT błękitem toluidyny w tkance utrwalonej formaliną oraz płynem Carnoya. Komórki tuczne atypowe – MMC uwidaczniają się tylko w tkance utrwalonej w płynie Carnoya, barwienie ich jest natomiast zahamowane przez formaldehyd [15, 16]. Innym jeszcze sposobem jest zastosowanie berberyny, która wiąże się z CTMC, a nie z MMC [17] (tab. 1).

TABELA 1. Komórki tuczne (szczur/mysz)

Cecha	CTMC	MMC
BARWLIWOŚĆ		
Utrwalacze aldehydowe	nie blokują	blokują
Błękit alcjaju/safranina	ziarnistości safraninododatnie	ziarnistości alcjanododatnie
Berberyna	fluorescencja	brak fluorescencji
Pinancjanol erytrozyny	barwi	barwi
CECHY MORFOLOGICZNE		
Okres przeżycia	>6 mies.	<40 dni
Wielkość	14–20 μm	4–10 μm
Kształt	duże, kuliste	małe, kuliste
Jądro	duże, okrągłe	plątowane
Ziarna wydzielnicze	duża ilość, kuliste, o podobnej wielkości	mała ilość, polimorficzne
Migracja	migrują	nie migrują
Proliferacja	grasiczno-niezależna	grasiczno-zależna

Metody barwienia stosowane do uwidocznienia KT w mikroskopie świetlnym opierają się na powinowactwie barwników kationowych do glikozaminoglikanów (GAG) zawartych w ziarnach wydzielniczych tych komórek. W macierzy ziaren komórek tucznych występować mogą dwa rodzaje tych substancji: heparyna i siarczan chondroityny. Heparyna jest polimerem anionowym; na jedną jednostkę dwucukru przypada średnio od 3 do 4 grup siarczanowych i jedna karboksylowa. Chondroityno-siarczany obdarzone są mniej licznymi grupami anionowymi; liczba grup siarczanowych szacowana jest na średnio 0,8–1,3 na jednostkę dwucukrową. Z powodu dużej zawartości grup siarczanowych i karboksylowych GAG są substancjami o licznych ładunkach anionowych. W stanie natywnym większość GAG występuje w postaci kowalencyjnie związanej z białkiem, które tworzy rdzeń kompleksu nazwanego proteoglikanem [29]. Klasyczną metodą barwienia KT jest barwienie meta-chromatyczne barwnikami tiazynowymi, przede wszystkim błękitem toluidyny. Za bardziej swoistą uważana jest metoda barwienia komórek tucznych błękitem alcjaju, którą wprowadzili Bloom i Kelly [17], a rozwinął Enerback [16] stosując barwienie sekwencyjne z safraniną. Błękit alcjaju jest kationowym barwnikiem należącym do grupy ftalocyjanin miedziowych. Tworzy on w niskim pH nierozpuszczalne w wodzie kompleksy z wielosiarczanowymi polianionami, jakimi są GAG w niskim pH. Istnieje opinia [1, 29, 59], że barwniki kationowe barwią raczej kompleksy GAG z białkami, czyli proteoglikany niż same GAG. Barwienie safraniną związane jest prawdopodobnie z jej powinowactwem do grup sulfamidowych heparyny. Usunięcie grup sulfamidowych powoduje, że KT jamy otrzewnowej szczura tracą właściwość wybarwiania się tym barwnikiem [49].

Jak już wspomniano wcześniej, za jedną z podstawowych cech pozwalających na rozróżnianie subpopulacji KT u gryzoni uważa się wpływ utrwalania formaliną [15, 16, 17]. Optymalne utrwalenie tkanki przed barwieniem to takie, które daje precypitację GAG w taki sposób, aby pozostały wolne miejsca anionowe do wiązania barwnika. Niepowodzenia w uwidacznianiu KT w utrwalonej tkance może być spowodowane: wypłukaniem w późniejszej preparatyce niedokładnie sprecypitowanych GAG, ograniczeniem przepuszczalności błony ziaren wydzielniczych przez utrwalenie lub zablokowaniem miejsc anionowych przez utrwalacz i uniemożliwienie tym samym związania barwnika. Badania Millera i Walshawa [1, 39] wskazują, że w przypadku utrwalania formaliną najbardziej prawdopodobne są te dwie

ostatnie możliwości. Utrwalacz Carnoya czy octan ołowiu penetrują tkanki bardzo szybko i silnie precypitują zarówno GAG, jak i białka. Niskie pH ułatwia wiązanie jonowe między barwnikiem a GAG, ponieważ doprowadza do silnej dysocjacji grup siarczanowych.

Różnice w barwliwości komórek tucznych gryzoni pozwalające na różnicowanie subpopulacji zebrano w tabeli 1.

MORFOLOGIA I ULTRASTRUKTURA KT

Komórki tuczne subpopulacji CTMC i MMC różnią się szeregiem cech morfologicznych, które zebrano w tabeli 1.

W badaniach ultrastrukturalnych porównawczych [17, 19] wykazano, że obie subpopulacje KT różnią się od siebie jedynie nieznacznie. Błona komórkowa MMC jest pofałdowana w bardzo nieliczne mikrokosmki, podczas gdy błona komórkowa CTMC ma liczne pofałdowania. Na powierzchni błony komórkowej CTMC i MMC występują receptory dla IgE; w MMC IgE zlokalizowano także w cytoplazmie [17]. Cytoplazma CTMC upakowana jest bardzo licznymi, o podobnej wielkości, elektronowogęstymi ziarnami wydzielniczymi, w cytoplazmie MMC tych ziaren jest mniej i są polimorficzne. Jądro komórkowe CTMC jest z reguły duże i okrągłe, natomiast w jądrze komórkowym MMC występują liczne wgłębienia.

Liczba substancji o dużej aktywności biologicznej poznanych w komórkach tucznych jest bardzo duża. Dzieli się je zwykle na dwie grupy: substancje zmagazynowane w ziarnach wydzielniczych oraz tworzone de novo w cytoplazmie po stymulacji KT. Do pierwszej grupy zalicza się aminy biogenne, glikozaminoglikany (GAG), proteazy, egzoglikozydazy i czynniki chemotaktyczne; do drugiej zaś pochodne kwasu arachidonowego – leukotrieny, prostaglandyny, tromboksan i czynnik aktywujący płytki krwi [PAF].

ZIARNA WYDZIELNICZE

W obu subpopulacjach KT można zaobserwować charakterystyczne różnice w zawartości substancji zmagazynowanych w ziarnach [1, 17, 49]. Dane te zebrano w tabeli 2, z której wynika, że CTMC różnią od MMC przede wszystkim: kilkunastokrotnie większa zawartość histaminy, obecność glikozaminoglikanu heparyny, a nie siarczanów chondroityny oraz chymotryptazy typu I (chymaza).

TABELA 2. Komórki tuczne (szczur/mysz) – Zawartość ziaren wydzielniczych

Związek chemiczny	CTMC	MMC
Aminy: histamina	>15 pg/komórkę	1–3 pg/komórkę
serotonina	1 pg/komórkę	< 1 pg/komórkę
Glikozaminoglikany:	heparyna	siarczan chondroityny
Proteazy:	chymotryptaza I	chymotryptaza II
	karboksypeptydaza A	?
Egzoglikozydazy:	arylsulfataza A	arylsulfataza A
	β -heksozaminidaza	β -heksozaminidaza
	β -glukoronidaza	β -glukoronidaza
	β -galaktozydaza	β -galaktozydaza
Czynniki chemotaksji	ECF I NCF	?

MEDIATORY TWORZONE DE NOVO

Bardziej skomplikowana jest sytuacja z określeniem różnic w tworzeniu mediatorów – pochodnych kwasu arachidonowego. Z dostępnych danych z piśmiennictwa [37, 39, 49] wydaje się, że głównym produktem przemiany kwasu arachidonowego w MMC jest leukotrien C₄, podczas gdy w CTMC dominuje szlak prostanoidów, chociaż i CTMC mają zdolność syntezy leukotrienów (tab. 3).

TABELA 3. Komórki tuczne (szczur/mysz) – Mediatory tworzone de novo

CTMC	MMC
Prostaglandyny D2, E2, F2	?
Leukotrien C ₄ – ślad	Leukotrien C ₄
Tromboksan A2	?
Czynnik aktywujący płytki [PAF]	?

LOKALIZACJA NARZĄDOWA

Lokalizacja narządowa obu subpopulacji jest różna. U szczura stwierdzono występowanie CTMC w błonie podśluzowej jelita cienkiego, w skórze, w ścianie pęcherzyków płucnych i na powierzchni błon surowiczych, natomiast MMC w błonie śluzowej jelita cienkiego i w nabłonku oskrzelowym [1, 17, 21].

REAKTYWNOŚĆ

TABELA 4. Komórki tuczne (szczur/mysz) – Reaktywność

Odpowiedź na:	CTMC	MMC
Antygen. anty-IgE	+	+
Czynnik 48/80	+	-
Jonofor A23187	+	+
Bradykinina	+	-
Neurotensyna	+	-
Substancja P	+	+
Peptyd jadu żmij 401	+	-

Ciekawych informacji na temat różnicowania subpopulacji KT dostarczyły badania nad ich reaktywnością, czyli zdolnością do uwolnienia mediatorów markerowych (najczęściej histamina i β -heksozaminidaza) w odpowiedzi na czynnik sekrecyjny. Z tabeli 4 wynika, że różnicować te dwie subpopulacje można na podstawie braku odpowiedzi MMC na czynnik 48/80, neuropeptydy – bradykininę, neurotensynę, somatostatynę czy białko 401 z jadu żmij [2, 44, 57].

HETEROGENNOŚĆ KOMÓREK TUCZNYCH CZŁOWIEKA

Prawie równoległe z odkryciem heterogenności KT gryzoni pojawiło się pytanie, czy i u człowieka występują subpopulacje komórek tucznych i czy można zastosować takie same kryteria różnicujące jak u szczura czy myszy.

BARWLIWOŚĆ

Po raz pierwszy Strobel i wsp. [59] porównując różne sposoby utrwalania i barwienia wykazali, że w błonie śluzowej jelita człowieka po utrwaleniu tkanki w utrwalaczu Carnoya lub zasadowym octanie ołowiu i barwieniu błękitem alcjaju i safraniną, uwidacznia się ok. 5 razy więcej KT niż po utrwalaniu tkanki w utrwalaczach formalinowych. KT barwiły się błękitem alcjaju na niebiesko: nie obserwowano komórek barwiących się safraniną. Spostrzeżenie to zostało później potwierdzone przez Ruitenberga i wsp. [48] oraz Befusa i wsp. [2]. W 3 lata później Befus i wsp. [3] opisali w jelicie człowieka dwie subpopulacje komórek tucznych różniące się opornością na barwienie błękitem toluidyny w niskim pH po utrwaleniu w formalinie. Ostatnio pojawiły się też doniesienia [26, 43] o obecności w skórze ludzkiej komórek safranino-dodatnich.

Stwierdziłem, że KT serca człowieka [49] wybarwiają się błękitem alcjaju po utrwaleniu w utrwalaczach nie zawierających formaliny. Utrwalenie tkanki w utrwalaczach zawierających formalinę powoduje całkowite lub bardzo znaczne zahamowanie wiązania barwnika. W składzie ziaren wydzielniczych tych komórek znajdują się więc GAG o niskiej zawartości grup siarczanowych i karboksylowych prawdopodobnie siarczan chondroityny podobnie jak w KT jelit [14] i płuc [39].

Barwienie komórek przy pomocy pinacjanolu, barwnika z grupy karbocjanin w kompleksie z erytrozyną B (z grupy ksantenów) [50, 51] uwidacznia znacznie więcej KT i to w różnych tkankach od różnych gatunków zwierząt niż po barwieniu błękitem toluidyny. Wskazuje to na duże powinowactwo pinacjanolu erytrozyny do substancji zawartych w ziarnach wydzielniczych zarówno człowieka, jak i zwierząt laboratoryjnych. Niestety, istota histochemiczna tego barwienia pozostaje niejasna. Wydaje się, że wystąpienie takich własności barwiących spowodowane jest podobieństwem budowy chemicznej do barwników tiazynowych i ftalocyjanin (obecność grup amoniowych) z jednej strony oraz obecność grup jodowych z drugiej. Barwienie tą samą metodą nie pozwala jednak na rozróżnienie subpopulacji KT.

Podsumowując dotychczasowe wyniki badań nad możliwością różnicowania subpopulacji KT u człowieka przy pomocy metod barwienia różnicujących KT u gryzoni należy powiedzieć, że żadna z dotychczas zastosowanych metod nie daje zadowalających wyników.

MORFOLOGIA I ULTRASTRUKTURA KT

Wspólne dla KT człowieka cechy morfologiczne zebrano w tabeli 5. Na powierzchni błony komórkowej KT sfałdowanej w liczne mikrokosmki występują receptory o wysokim ($K\alpha = 10^{10} \text{ M}^{-1}$) powinowactwie do IgE [1].

Najbardziej charakterystyczną cechą wyróżniającą KT człowieka od innych komórek oraz KT gryzoni jest występowanie w ich cytoplazmie dużej ilości kulistych lub elipsoidalnych ziaren wydzielniczych o charakterystycznej budowie ultrastrukturalnej. Większość tych otoczonych pojedynczą błoną ziaren zawiera w swojej macierzy struktury parakrystaliczne

zbudowane z koncentrycznych blaszek; jak do tej pory opisano podobnego typu struktury jedynie w KT świnki morskiej [12].

Hammel i wsp. [25] postulują, że ziarna wydzielnicze komórek tucznych płuc składają się z powielanych kilkunastu powtarzalnych jednostek i jednostką tą są opisane wyżej blaszki struktur parakrystalicznych. W swoich badaniach nad KT serca człowieka [49, 50] stwierdziłem, że najczęściej występującą strukturą parakrystaliczną była struktura zbudowana z 3 lub 4 blaszek; okresowość blaszek w tych strukturach ma charakter rozkładu jednorodnego z wartością mediany 85 Å. Inni badacze zajmujący się tym zagadnieniem podają wartość okresowości od 60 Å do 150 Å [8] i opisują jej rozkład albo jako jednorodny [8, 49, 50] albo dwumodalny [8, 49, 50].

Oprócz ziaren zbudowanych z koncentrycznych blaszek opisywano także takie, które były wypełnione siecią o charakterze parakrystalicznym [8, 9, 50].

Trudno się ustosunkować jednoznacznie, czy opisywane różnice są wynikiem różnego składu i budowy struktur parakrystalicznych w różnych komórkach, czy wynikają raczej z różnych procedur przygotowania tkanek i sposobu pomiarów. Wydaje się, że struktury parakrystaliczne są w stanie spoczynku formą magazynowania bardzo zagęszczonych składników wydzielniczych utrzymywanych w tej formie w drodze oddziaływania jonowego [8, 12, 13].

Na podstawie oceny ultrastruktury ziaren w rutynowej procedurze nie daje się rozróżnić subpopulacji KT. Nie mniej jednak Craig i wsp. [9] wskazują, że daje się zauważyć korelację między zawartością tryptazy i chymotrypazy w ziarnach a ich wyglądem ultrastrukturalnym. Szerzej na ten temat będzie mowa poniżej.

ZIARNA WYDZIELNICZE

W ziarnach wydzielniczych ludzkich komórek tucznych występuje szereg bardzo aktywnych biologicznie substancji (tab. 6).

TABELA 6. Komórki tuczne człowieka

Zawartość ziarnistości	
Histamina	1–10 pg/komórkę
Glikozaminoglikan	heparyna m. cz. ok. 60000 siarczan chondroityny E
Proteazy	tryptaza chymotryptaza karboksypeptydaza
Egzoglikozydazy	arylosulfataza B β-heksozaminidaza β-glukoronidaza β-galaktozydaza
Czynniki chemotaksji	dla eozynofiliów – ECF dla neutrofilów – NCF

TABELA 5. Komórki tuczne człowieka

Cecha	Charakterystyka
Wielkość	10–20 μm
Kształt	wielokształtne
Jądro	duże, wydłużone
Ziarna	duża ilość, kuliste,
wydzielnicze	struktury parakrystaliczne
Proliferacja	limfocyto-T-zależna?
IgE	powierzchniowe

Stwierdzono, że w KT człowieka zawartość histaminy może być zmienna i waha się w granicach od ≈ 1 pg do ≈ 10 pg [18, 34, 35, 39, 49, 56], nie stwierdzono natomiast serotoniny [1, 52]. W świetle tych badań wydaje się, że zawartość histaminy nie może być elementem różnicującym subpopulacje KT u człowieka.

Dużą część zawartości ziaren stanowią GAG: siarczan chondroityny E [14, 22, 39], a w KT płuc, także niskopolimeryzowana heparyna o masie cząsteczkowej ok. 60000 [39]. Występują one podobnie jak u gryzoni w formie związanej z monomerami białkowymi tworząc proteoglikany.

Ponieważ barwliwość metachromatyczna KT wynika z właściwości tych kompleksów, należy stwierdzić, że nie mogą one podobnie jak zawartość histaminy stanowić jednoznacznego kryterium różnicowania subpopulacji KT u człowieka.

W ostatnich latach ukazało się szereg prac, głównie z laboratorium Schwartza, w których autorzy sugerują, że markerami komórkowymi pozwalającymi na rozróżnianie typów komórek tucznych u człowieka mogą być występujące w ich ziarnach wydzielniczych dwie obojętne proteiny: tryptaza i chymotryptaza. Wykorzystując techniki immunohistochemiczne stwierdzili, że w różnych narządach człowieka można wyróżnić KT tryptazopoztywne, chymotryptazonegatywne określane jako KT_T i KT tryptazopoztywne, chymotryptazopoztywne określane jako KT_{TC} .

W KT płuc 20–30% ogólnej ilości białka to tryptaza, co daje zawartość ok. 12 pg/komórkę [56]. W KT skóry zawartość tryptazy określono na ok. 35 pg [55, 56]. Ważnym faktem z punktu widzenia różnicowania KT i bazofilów krwi jest bardzo mała zawartość tryptazy (0,04 pg/komórkę) i brak chymotryptazy w bazofilach [39]. Średnią zawartość chymotryptazy w KT_{TC} skóry określono na ok. 4,5 pg/komórkę, natomiast w KT_T na poniżej 0,04 pg/komórkę [53, 56].

Craig i wsp. [9] stosując mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko tryptazie i królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko chymotryptazie stwierdzili, że:

- znakowanie przeciwko tryptazie pojawiało się nad ziarnami wydzielniczymi KT zawierającymi struktury parakrystaliczne w formie koncentrycznych blaszek (*scrolls*),
- znakowanie przeciwko obu proteazom pojawiało się w KT, które mają w cytoplazmie ziarna wydzielnicze zawierające struktury parakrystaliczne w formie sieci (*gratings*).

Wskazuje to, że istniejące różnice w budowie ultrastrukturalnej KT człowieka pozwalają na klasyfikację subpopulacji na KT_T i KT_{TC} . Nie jest to jednak pogląd powszechnie akceptowany.

W ziarnach wydzielniczych KT stwierdzono także obecność innej proteiny: karboksypeptydazy, różnej jednak od opisanych wcześniej u człowieka typów A i B. Wydaje się, że i ten enzym może być markerem subpopulacji ludzkich KT, ponieważ występuje w znacznie większych stężeniach w KT_{TC} skóry [39] niż KT_T płuc [23, 39]. Na temat zawartości i zróżnicowania w występowaniu katepsyny G i elastazy w KT panują sprzeczne opinie [38, 54]. Innymi zlokalizowanymi w ziarnach substancjami są arylosulfataza B, β -heksozaminidaza [56] oraz β -glukoronidaza i β -galaktozydaza [39, 49]. Uważa się także, że w ziarnach wydzielniczych zgromadzone są czynniki chemotaktyczne dla granulocytów kwasochłonnych – ECF [1, 49] i obojętnochłonnych – NCF [1, 17]. W świetle dotychczasowych danych zawartość tych substancji nie wydaje się mieć znaczenia dla różnicowania subpopulacji KT u człowieka.

MEDIATORY TWORZONE DE NOVO

TABELA 7. Komórki tuczne człowieka

Mediatory tworzone de novo

Prostaglandyna D ₂
Leukotrieny C ₄ i E ₄
Tromboksan A ₂
Czynnik aktywujący płytki – PAF

Ciekawym elementem cytoplazmatycznym KT są ciała lipidowe o różnej wielkości, nie otoczone błoną, mające zdolność wychwytywania ³H-kwasu arachidonowego [13]. Wykazano, że po stymulacji KT z kwasu arachidonowego powstają bardzo aktywne biologicznie mediatory: prostaglandyna D₂ i leukotrieny C₄ i E₄ [18, 34, 39, 49], a także tromboksan A₂ [39, 49] i czynnik aktywujący płytki [49]

(tab. 7). W dotychczasowych badaniach nie stwierdzono jednak na tyle typowych torów metabolicznych pochodnych kwasu arachidonowego, które pozwoliłyby na rozróżnianie subpopulacji KT.

LOKALIZACJA NARZĄDOWA

Schwartz i inni [9, 30, 39, 56] przyjmując za kryterium różnicowania KT obecność i zawartość tryptazy i chymotryptazy sądzą, że w różnych, dostępnych do badania narządach człowieka subpopulacje KT_T i KT_{TC} występują w zmiennych zawartościach (tab. 8). I tak w skórze właściwej prawie 90% KT zawiera obie proteinazy (KT_{TC}), a ok. 10 % tylko tryptazę (KT_T). W płucach sytuacja jest natomiast odwrotna: ok. 90% KT to KT_T , a ok. 10% – KT_{TC} . W jelicie cienkim natomiast w błonie podśluzowej stwierdzono 87% KT_{TC} i 13% KT_T , a w błonie śluzowej prawie wyłącznie KT_T . W ścianach naczyń krwionośnych 95% występujących tam KT to KT_{TC} .

TABELA 8. Rozmieszczenie subpopulacji komórek tucznych w badanych narządach człowieka

Tkanka	MC_T	MC_{TC}
Skóra właściwa	12%	88%
Płuca		
nabłonek oskrzeli	95%	5%
ściana pęcherzyka	93%	7%
Jelito cienkie		
błona śluzowa	98%	2%
błona podśluzowa	13%	87%
Błona śluzowa nosa		
nabłonek	98%	2%
warstwa podnabłonkowa	40%	60%
Ściana naczyń krwionośnych	5%	95%

REAKTYWNOŚĆ

Oceną reaktywności KT u człowieka podobnie jak u gryzoni daje się wyróżnić subpopulacje KT odpowiadające w zróżnicowany sposób na czynniki sekrecyjne (tab. 9).

KT izolowane z ludzkiej skóry (głównie KT_{TC}) odpowiadają [4, 35, 60] w odróżnieniu od komórek tucznych z płuc, jelit i kaletki maziowych (głównie KT_T) [12, 18, 34] uwalnianiem histaminy m.in. na czynnik 48/80, siarczan morfiny, substancję P.

TABELA 9. Komórki tuczne człowieka – Reaktywność

Odpowiedź na:	KT płuc – KT_T	KT skóry – KT_{TC}
Anty – IgE	+	+
Czynnik 48/80	–	+
Jonofor A 23187	+	+
Komplement C3a	–	+
Polilizyna	–	+
Substancja P	–	+
Morfina	–	+

ONTOGENEZA KOMÓREK TUCZNYCH

Pochodzenie KT jest nadal źródłem pewnych kontrowersji pośród badaczy. Z uwagi na niewielką liczbę prac traktujących w sposób systematyczny problem ontogenezy poszczególnych subpopulacji KT u człowieka zagadnienie to będzie omówione łącznie dla KT zwierząt laboratoryjnych i człowieka.

Do początku lat osiemdziesiątych przeważała opinia oparta na badaniach Fawcetta [49, 52], że prekursorami KT w tkankach są niezróżnicowane komórki tkanki łącznej pochodzenia mezenchymalnego. Dziś coraz więcej badaczy skłania się do przyznania im pochodzenia z bliżej nieznannej komórki prekursorowej różnicującej się z komórki multipotencjalnej szpiku. Wskazuje na to możliwość hodowli KT ze szpiku w środowisku zawierającym interleukinę 3 i 4 z limfocytów T (np. [33, 40, 46]) czy z prekursorów krążących we krwi [20, 58].

Dodatkowych dowodów dostarczył Kitamura i jego grupa [32, 33, 41, 42]. W swoich badaniach wykorzystali oni szczepy myszy z mutacjami w chromosomie 5, locus W bądź w chromosomie 10, locus S1. Opisane szczepy WBB₆F₁ - W/W^v (W/W^v) oraz WCB₆F₁ - S1/S1^d pozbawione są KT, a także występuje u nich anemia makrocytarna, brak pigmentacji włosów i bezpłodność. Dodatkowo do badań wykorzystano szczep myszy, u których KT mają olbrzymie ziarna wydzielnicze; CS⁺BL/6 - Bg/Bg (*beige*). Badacze ci wykonali serię doświadczeń, w których wykazali, że:

- jeśli kolonie śledzionowe, uzyskane po dożylnym wstrzyknięciu zawiesiny "normalnych" komórek szpikowych napromienionym "normalnym" myszom, poda się dożylnie myszom W/W^v, to w jakiś czas potem u tych myszy w żołądku i śledzionie pojawiają się normalne KT,
- dożylne podanie myszom W/W^v komórek szpikowych od myszy *beige* powoduje powstanie KT o olbrzymich ziarnistościach w żołądku, skórze i śledzionie,
- podanie podskórne myszom W/W^v zawiesiny komórek jednojądrzastych z krwi powoduje powstanie KT w miejscu wstrzyknięcia,
- podanie myszom S1/S1^d czy to do krwi, czy lokalnie zawiesiny komórek zawierających prekursorów KT nie prowadzi do powstania KT ani w miejscu lokalnego podania, ani w narządach,
- podanie zawiesiny komórek szpikowych myszy S1/S1^d myszom W/W^v prowadzi do powstania normalnych KT.

Wynika z tego, że myszy W/W^v miały wadę genetyczną polegającą na braku komórek prekursorowych, natomiast S1/S1^d nie miały czynników niezbędnych do różnicowania się prekursorów KT w dojrzałe KT. Szerszym wnioskiem ontogenetycznym jest, że:

- (1) KT powstają z prekursorów szpikowych.
- (2) Do ich różnicowania i dojrzewania niezbędne są czynniki tkankowe (bliżej dziś nie sprecyzowane).

Licznym pracom poświęconym pochodzeniu i rozwojowi komórek tucznych gryzoni nie towarzyszą niestety podobne dotyczące komórek tucznych człowieka. Ukazało się zaledwie kilka prac na ten temat, wydaje się jednak, że dostarczone dowody przemawiają również za limfocyto-T-zależnym, szpikowym pochodzeniem tych komórek [1, 22, 27, 28, 47, 52]. Stwierdzono w tych badaniach, że KT wykazują dodatni odczyn na wspólny antygen leukocyтары (LCA); część z nich daje pozytywną reakcję z przeciwciałami przeciw markerom makrofagów: lizozymem, α_1 -antytrypsyną i α_1 -antychymotrypsyną. Ujemne odczyny immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko antygenom związanym z komórkami wewnątrzwydzielniczymi (β -endorfina, ACTH, kalcytonina, somatostatyna, chromogranina A,

CGRP, SP-1 czy gastryna i serotonina) pozwalają sądzić, że stara hipoteza o komórkach tucznych jako rozproszonym narządzie endokrynowym jest dziś trudna do utrzymania.

INNE MOŻLIWOŚCI PRZYCZYŃ WYSTĘPOWANIA ZRÓŻNICOWANIA FENOTYPOWEGO KT

Podane powyżej argumenty za występowaniem dwóch odrębnych subpopulacji KT zarówno u gryzoni, jak i u człowieka nie dla wszystkich są jasne i jednoznaczne. W celu uzyskania całości obrazu należy powiedzieć o innych, możliwych przyczynach występowania różnych fenotypów KT.

Wysuwane są co najmniej trzy mechanizmy, które mogą prowadzić do wystąpienia obserwowanych różnic między subpopulacjami KT [19, 20]:

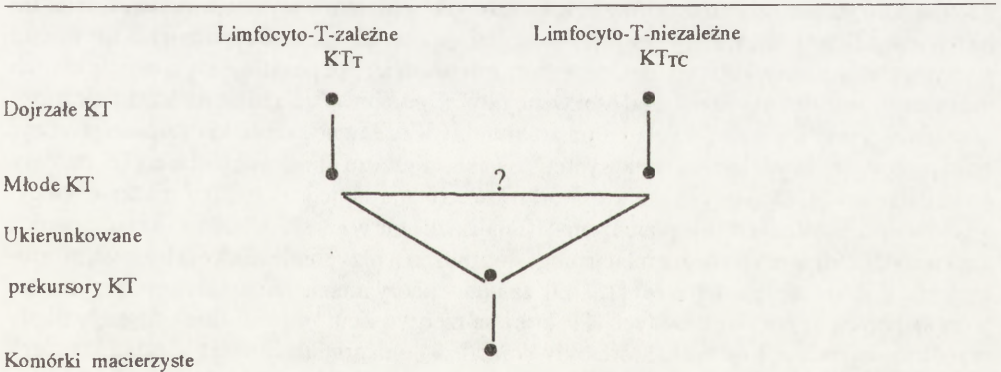
- proces dojrzewania i różnicowania,
- różny stan czynnościowy KT,
- wychwytywanie substancji produkowanych przez inne komórki.

PROCES DOJRZEWANIA I RÓŻNICOWANIA

Pozostaje niejasna sprawa, czy CTMC i MMC pochodzą z dwóch oddzielnych linii komórkowych, czy też dochodzić może do przekształcenia jednych w drugie na różnych etapach rozwoju (tab. 10).

Różne prekursory KT zostały opisane w zawieszynie komórek z jamy otrzewnej myszy;

TABELA 10. Pochodzenie KT_T i KT_{TC}



jedne po stymulacji IL-3 różnicowały się w MMC, z drugich w wyniku działania środowiska z nad hodowli komórek pobudzonych mitogenem szkarłatki powstawały CTMC [40]. Wykazano, że IL-4 razem z IL-3 stymulują wzrost klonów typu CTMC [6, 7, 24]. Te dane są przyjmowane za dowód na istnienie dwóch oddzielnych linii komórkowych.

Z kolei wykazano, że jeśli mysie MMC z hodowli szpikowych hoduje się w obecności fibroblastów linii 3T3, dochodzi do ich konwersji w komórki o cechach CTMC (safraniopozytywne, karboksypeptydazododatnie) [10, 36, 41]. Można zaobserwować także sytu-

ację, kiedy CTMC w pewnych warunkach różnicują się do MMC [41, 58]. W końcu ostatnie dane wskazują, że te przekształcenia mogą być odwracalne w obu kierunkach [32].

Środowisko otaczające KT może w istotny sposób regulować ich różnicowanie, dojrzewanie i fenotyp. Od lat wiadomo, że różne procesy immunologiczne i patologiczne zmieniają liczbę i fenotyp KT. Z obszernej literatury na ten temat można zaproponować np. [17, 20, 31, 49]. Zakłada się kilka mechanizmów tego zjawiska:

- w miejscu limfocyto-T-zależnego odczynu zapalnego stężenie limfokin i innych cytokin może wielokrotnie przekraczać normalnie tam występujące,

- w miejscu odczynu zapalnego z naciekiem eozynofilów dochodzi do wzajemnego wzbudzenia obu typów komórek i internalizacji np. peroksydazy eozynofilów przez KT,

- w miejscu występowania w mikrośrodkowisku tkankowym dużego nagromadzenia czynników sekrecyjnych (np. IgE i specyficzny antygen) dochodzi do degranulacji KT i w konsekwencji zmiany fenotypu,

- badania ostatnich lat wskazują, że same KT przez produkcję takich cytokin, jak IL-3, IL-4, GM-CSF, zmiany w lokalnej przepuszczalności naczyń krwionośnych czy oddziaływania na fibroblasty, komórki nabłonka itp. mogą regulować swój własny fenotyp i liczebność [6, 7, 45, 61].

U człowieka uzyskane informacje mogą świadczyć, że istnieją dwie oddzielne linie rozwoju dla KT_T i KT_{TC} . Wykazano, że pacjenci z zespołami niedoborów immunologicznych mają znacznie mniej KT_T w błonie śluzowej jelita, natomiast liczba KT_{TC} w błonie podśluzowej pozostała niezmienniona [31].

RÓŻNICE WYNIKAJĄCE ZE STANU CZYNNOCIOWEGO

W wyniku zadziałania bodźca (o charakterze immunologicznym bądź chemicznym) na KT dochodzi do uwalniania mediatorów zgromadzonych w ziarnach wydzielniczych. Literatura na ten temat liczy kilka tysięcy pozycji i szczegółowe omawianie tego zagadnienia nie mieści się w ramach tego artykułu, ale pokrótce można powiedzieć, że postuluje się istnienie dwóch rodzajów (sposobów) wydzielania: "sekwencyjny" i "porcjowy". Każdy z nich zmieniać może właściwości wybarwienia i wygląd ultrastrukturalny KT. Pewne składniki cytoplazmatyczne zostają bowiem wydzielone, inne syntetyzowane, jeszcze inne wchłaniane. Te procesy powodują, że obserwujemy te same komórki, które różnią się jednak bardzo znacznie wtedy, gdy są w spoczynku i w stanie pobudzenia. Komórki tuczne w czasie odbudowy składu swoich ziaren wydzielniczych po degranulacji mogą do złudzenia przypominać swoją budową morfologiczną KT "młode, niedojrzałe" [13, 49]. Jak do tej pory nie ma jednoznacznych kryteriów pozwalających na rozróżnienie tych KT, które są rzeczywiście "młode" (nie osiągnęły nigdy przedtem dojrzałości) od tych, które były dojrzałe i po degranulacji mają wygląd komórek niedojrzałych. Nieznany jest także potencjał proliferacyjny tych dwóch rodzajów komórek.

WYCHWYT SUBSTANCJI POCHODZĄCYCH Z INNYCH KOMÓREK

Od wielu lat wiadomo, że KT mogą wychwytywać z otaczającego je środowiska różne substancje i gromadzić je w ziarnach wydzielniczych oraz organellach komórkowych. Wykazano [11], że MMC wychwytyują w drodze endocytozy peroksydazę eozynofilów i transportują ją do ziaren wydzielniczych. Może to w oczywisty sposób zmienić fenotyp KT. •

PODSUMOWANIE

W świetle powyżej przedstawionych faktów wydaje się, że hipoteza o istnieniu co najmniej dwóch subpopulacji KT jest prawdziwa. Niemniej jednak nasuwa się ciągle szereg pytań szczegółowych, o których była mowa w artykule, a na których znalezienie odpowiedzi ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia roli KT w procesach fizjologicznych i patologicznych.

Zrozumienia bowiem znaczenia heterogenności fenotypowego KT trudno przecenić. Wydaje się, że subpopulacje KT o odmiennych fenotypach mogą odgrywać zupełnie inne role w procesach fizjologicznych i patologicznych zarówno u zwierząt, jak i u człowieka. Sytuację komplikuje jednak fakt, że przyczyn zróżnicowania fenotypowego KT może być wiele. Przypomnieć można tylko kilka: proces dojrzewania i różnicowania, różny stan czynnościowy, wychwyty i gromadzenie związków z innych komórek. Te mechanizmy uruchamiane mogą być przez procesy zarówno fizjologiczne, jak i patologiczne. Uzyskanie dokładniejszych danych na temat KT przyczynić się może do lepszego zrozumienia ich roli biologicznej, a także patomechanizmu wielu chorób, w których ich udział jest niepodważalny.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARRET KE, METCALFE DD. Mucosal mast cells and IgE. [w] Heyworth MF, Jones AL. Immunology of the gastrointestinal tract and liver. Raven Press Ltd. New York, 1988: 65–92.
- [2] BEFUS AD, PEARCE F, GAULDIE J, HORSEWOOD P, BIENENSTOCK J. Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. *J Immunol* 1982; **128**: 2475–2480.
- [3] BEFUS AD, GOODACRE R, DYCKN, BIENENSTOCK J. Mast cell heterogeneity in man. I. Histologic studies of the intestine. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; **76**: 232–236.
- [4] BENYON RC, LOWMANN MA, CHURCH MK. Human skin mast cells: Their dispersion, purification, and secretory characteristic. *J Immunol* 1987; **138**: 861–867.
- [5] BIENENSTOCK J, BEFUS AD, PEARCE F, DENBURG J, GOODACRE R. Mast cell heterogeneity: derivation and function., with emphasis on the intestine. *J Allergy Clin Immunol* 1982; **70**: 407–412.
- [6] BROWN MA, PIERCE JH, WATSON CJ, FALCO J, IHLE JN, PAULE WE. B cell stimulatory factor-1-/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell* 1987; **50**: 809–818.
- [7] BURD PR, ROGERS HW, GORDON JR, MARTIN CA, JAYARAMAN S, WILSON SD, DVORAK AM, GALLI SJ, DORF ME. IL-3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 1989; **143**: 135–144.
- [8] CAULFIELD JP, LEWIS RA, HEIN S, AUSTEN KF. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J Cell Biol* 1980; **85**: 299–312.
- [9] CRAIG SS, SCHECHTER NM, SCHWARTZ LB. Ultrastructural analysis of human T and TC mast cells identified by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1988; **58**: 682–691.
- [10] DAYTON ET, PHARR P, OGAWA M, SERAFIN WE, AUSTEN KF, LEVI-SCHAFFER F, STEVENS RL. 3T3 fibroblasts induce cloned interleukin 3-dependent mouse mast cells to resemble connective tissue mast cells in granular consistency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 569–578.
- [11] DVORAK AM, KLEBANOFF SJ, HENDERSON WR, MONAHAN RA, PYNE K, GALLI SJ. Vesicular uptake of eosinophilic peroxidase by guinea pig basophils and by cloned mouse mast cells and granule-containing lymphoid cells. *Am J Pathol* 1985; **118**: 425–436.
- [12] DVORAK AM. Morphologic expressions of maturation and function can affect the ability to identify mast cells and basophils in man, guinea pigs and rats. [w] Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA. (red.) Mast Cell Differentiation and Heterogeneity. Raven Press: New York 1986; 95–114.
- [13] DVORAK AM, SCHLEIMER RP, LICHTENSTEIN LM. Human mast cells synthesize new granules during recovery from degranulation. In vitro studies with mast cells purified from human lungs. *Blood* 1988; **71**: 76–84.

- [14] ELIAKIM R, GILEAD L, LIGUMSKY M, OKON E, RACHMILEWITZ D, RAZIN E. Histamine and chondroitin sulphate proteoglycan E release by cultured human colonic mucosa: indications for possible presence of E mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 461–465.
- [15] ENERBACK L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 1. Effects of fixation. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966a; **66**: 303–312.
- [16] ENERBACK L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye binding and metachromatic properties. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966b; **66**: 313–322.
- [17] ENERBACK L. Mast cell heterogeneity: The evolution of the concept of a specific mucosal mast cells. [w] Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA. (red.) *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*. Raven Press: New York 1986; 1–21.
- [18] FOX CC, DVORAK AM, PETERS SP, KAGEY-SOBOTKA A, LICHTENSTEIN LM. Isolation and characterization of human intestinal mucosal mast cells. *J Immunol* 1985; **135**: 483–491.
- [19] GALLI SJ. Mast cell heterogeneity: can variation in mast cell phenotype be explained without postulating the existence of distinct mast cell lineages? [w] Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA. (red.) *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*. Raven Press: New York 1986; 167–180.
- [20] GALLI SJ. New insight into "the riddle of mast cells": Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; **62**: 5–33.
- [21] GIBSON S, MILLER HRP. Mast cell subsets in the rat distinguished immunohistochemically by their content of serine proteases. *Immunology* 1986; **58**: 101–104.
- [22] GILEAD L, RAHAMIM E, ZVI I, OR R, RAZIN E. Cultured human bone marrow-derived mast cells, their similarities to cultured murine E-mast cell. *Immunology* 1988; **63**: 669–675.
- [23] GOLDSTEIN SM, KAEMPFER CE, PROUD D, SCHWARTZ LB, IRANI AA, WINOTROUB BU. Detection and partial characterization of human mast cell carboxypeptidase. *J Immunol* 1987; **139**: 2724–2729.
- [24] HAMAGUCHI Y, KANAKURA Y, FUJITA J, TAKEDA S, NAKANO T, TORUI S, HONJO T, KIRTAMURA Y. Interleukin 4 as an essential growth factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue - type mast cells. *J Exp Med* 1987; **165**: 268–273.
- [25] HAMMEL I, DVORAK AM, PETERS SP, SCHULMAN ES, DVORAK HF, LICHTENSTEIN LM, GALLI SJ. Differences in the volume distributions of human lung mast cell granules and lipid bodies: Evidence that the size of these organelles is regulated by distinct mechanism. *J Cell Biol* 1985; **100**: 1488–1492.
- [26] HEARD BE. Histochemical aspects of the staining of mast cells with particular reference to heterogeneity and quantification. [w] Kay AB. (red.) *Asthma. Clinical Pharmacology and Therapeutic Progress*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1986; 280–293.
- [27] HORNY H-P, PARWARESCH MR, LENNERT K. Bone marrow findings in systemic mastocytosis. *Hum Pathol* 1985; **16**: 808–814.
- [28] HORNY H-P, REIMANN O, KAISERLING E. Immunoreactivity of normal and neoplastic human tissue mast cells. *Am J Clin Pathol* 1988; **89**: 335–340.
- [29] IOZZO RV. Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia. *Lab Invest* 1985; **53**: 373–396.
- [30] IRANI AA, SCHECHTER NM, CRAIG SS, DE BLOIS G, SCHWARTZ LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **84**: 4464–4468.
- [31] IRANI AA, CRAIG SS, DE BLOIS G, ELSON C, SCHECHTER NM, SCHWARTZ LB. Deficiency of the tryptase-positive chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* 1987; **138**: 4381–4386.
- [32] KANAKURA Y, THOMSON H, NAKANO T, YAMAMURA T, ASAI H, KITAMURA Y, METCALFE DD, GALLI SJ. Multiple bidirectional alterations of phenotype and changes in proliferative potential during the in vitro and in vivo passage of clonal mast cell populations derived from mouse peritoneal mast cells. *Blood* 1988; **72**: 877–875.
- [33] KITAMURA Y, NAKAYAMA H, FUJITA J. Mechanism of mast cell deficiency in mutant mice of W/W^v and S1/S1^d genotype. [w] Galli SJ, Austen FK. (red.) *Mast Cell Basophil Differentiation and Function in Health and Disease*, New York Raven Press 1989; 15–29.
- [34] KOPICKY-BURD JA, KAGEY-SOBOTKA A, PETERS P, DVORAK AM, LENNOX DW, LICHTENSTEIN LM, WIGLEY FM. Characterization of human synovial mast cells. *J Rheumatol* 1988; **15**: 1326–1333.
- [35] LAWRENCE ID, WARNER JA, COHAN VL, HUBBARD WC, KAGEY-SOBOTKA A, LAWRENCE LM. Purification and characterization of human skin mast cells. Evidence for human mast cell heterogeneity. *J Immunol* 1987; **139**: 3062–3069.
- [36] LEVI-SCHAFFER F, AUSTEN KF, GRAVELLESE PM, STEVENS RL. Co-culture of interleukin 3-dependent mouse mast cells with fibroblasts results in a phenotypic change of the mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 6485–6488.

- [37] MACDONALD AJ, HAIG DM, BAZIN H, MCGUIGAN AC, MOQBEL R, MILLER HRP. IgE mediated release of mast cell protease II, β -heksozaminidase and leukotriene C₄ from cultured bone marrow-derived rat mast cells. *Immunology* 1989; **67**: 414–418.
- [38] MEIER HL, HECK LW, SCHULMAN ES, MACGLASHAN jr DW. Purified human mast cells and basophils release human elastase and cathepsin G by an IgE-mediated mechanism. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; **77**: 170–183.
- [39] MILLER J, SCHWARTZ LB. Heterogeneity of human mast cells. [w] Becker L, Simon K, Austen KF. (red.) *Biochemistry of the Acute Allergic Reactions: fifth international symposium*. Alan R. Riss Inc. 1989; 115–130.
- [40] NAKAHATA T, KOBAYASHI T, ISHIGURO A, TSUSI K, NAGANUMA K, ANDO O, YAGI Y, TADOKORO K, AKABANE T. Extensive proliferation of mature connective tissue type mast cells in vitro. *Nature* 1986; **324**: 65–67.
- [41] NAKANO T, SONODA T, HAYASHI C, YAMATODANI A, KANAYAMA Y, YAMAMURA T, ASAI H, YONEZAWA T, KITAMURA Y, GALLI SJ. Fate of bone marrow-derived cultured mast cells after intracutaneous, intraperitoneal and intravenous transfer into genetically mast cell deficient W/W^v mice. Evidence that cultured mast cells can give rise to both connective tissue type and mucosal mast cells. *J Exp Med* 1985; **162**: 1025–1043.
- [42] NAKANO T, KANAKURA Y, NAKAHATA T, MATSUDA H, KITAMURA Y. Genetically mast cell-deficient W/W^v mice as a tool for studies of differentiation and function of mast cells. *Fed Proc* 1987; **46**: 1920–1925.
- [43] OLAFSSON JH, ROUPE G, ENERBACK L. Dermal cells in mastocytosis: Fixation, distribution and quantitation. *Acta Dermatol Venerol* 1986; **66**: 16–22.
- [44] PEARCE FL, ALI H, BARRET KE, BAFUS AD, BIENENSTOCK J, BROSTOFF J, ENNIS M, FLINT KC, HUDSPITH B, JOHNSON NM, LEUNG KBP, PEACHELL PT. Functional characteristics of mucosal and connective tissue mast cells of man, the rat and other animals. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985; **77**: 274–280.
- [45] PLAUT M, PIERCE JH, WATSON CJ, HANLEY-HYDE J, NORDAN RP, PAUL WE. Mast cell line produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc ϵ RI or to calcium ionophores. *Nature* (London) 1989; **339**: 64–66.
- [46] RAZIN E, CORDON-CARDO C, GOOD RA. Growth of pure population of mouse mast cells in vitro with conditioned medium derived from concanavalin A-stimulated splenocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **28**: 2559–2561.
- [47] RIMMER EF, HORTON MA. Origin of human mast cells studied by dual immunofluorescence. *Clin Exp Immunol* 1987; **68**: 712–718.
- [48] RUITENBERG EJ, GUSTOWSKA L, ELGERSMA A, RUITENBERG HM. Effects of fixation on the light microscopic visualization of mast cells in the mucosa and connective tissue of human duodenum. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1982; **67**: 233–238.
- [49] RYDZYŃSKI K. Badania morfologiczne komórek tucznych w biopsjach śródoperacyjnych ludzkiego mięśnia sercowego. *Studia Mat Monogr* 1989; **33**: 151–202.
- [50] RYDZYŃSKI K, DALEN H, SAETHERSDAL TH, ENGEDAL H. Morphologic and morphometric analysis of the mast cells from human heart biopsies. *Agents Actions* 1987; **20**: 288–290.
- [51] RYDZYŃSKI K, KOLAGO B, ZASŁONKA J, KUROCZYŃSKI W. Distribution of mast cells in human heart auricles and correlation with tissue histamine. *Agents Actions* 1988; **23**: 273–275.
- [52] RYDZYŃSKI K, ZABEL M, SURDYK J. Immunohistochemical studies on human myocardial mast cells. *Cell Mol Biol* 1990; **36**: 573–580.
- [53] SCHECHTER NM, CHOI JK, SLAVIN DA, DERESINSKI DT, SAYAMA S, DONG G, LAVKER RM, PROUD D, LAZARUS GS. Identification of chymotrypsin-like proteinase in human mast cells. *J Immunol* 1986; **137**: 962–970.
- [54] SCHECHTER NM, FETTER RD, MALIK N, SPROWS JL, LAZARUS GS, WINOTROUB BU, IRANI AA, SCHWARTZ LB. Is cathepsin G present in mast cells? *Fed Proc* 1988; **2**: A1234.
- [55] SCHWARTZ LB. Monoclonal antibodies against human mast cell tryptase demonstrate shared antigenic sites on subunits of tryptase and selective localization of the enzyme to mast cells. *J Immunol* 1985; **134**: 526–531.
- [56] SCHWARTZ LB, IRANI A-MA, ROLLER K, CASTEKKS MC, SCHECHTER NM. Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol* 1987; **138**: 2611–2615.
- [57] SHANAHAN F, DENBURG JA, FOX J, BIENENSTOCK J, BEFUS AD. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenergetic peptides on histamine release. *J Immunol* 1985; **135**: 1331–1337.
- [58] SONODA S, SONODA T, NAKANO T, KANAYAMA Y, KANAKURA Y, ASAI H, YONEZAWA T, KITAMURA Y. Development of mucosal mast cells after injection of a single connective tissue-type mast cell in the stomach mucosa of genetically mast cell-differentiation W/W^v mice. *J Immunol* 1986; **137**: 1319–1322.
- [59] STROBEL S, MILLER HRP, FERGUSON A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. *J Clin Pathol* 1981; **34**: 851–858.

- [60] THARP MD, KAGEY-SOBOTKA A, FOX CC, MARONE G, LICHTENSTEIN LM, SULLIVAN TJ. Functional heterogeneity of human mast cells from different anatomical sites: In vitro responses to morphine sulphate. *J Allergy Clin Immunol* 1987; **79**: 646–653.
- [61] WODNAR-FILIPOWICZ A, HEUSSER CH, MORONI C. Production of the haemopoietic factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature* (London) 1989; **339**: 150–152.

Otrzymano: 22.08.1991.

Przyjęto: 06.01.1992.

Adres autora: Instytut Medycyny Pracy, skr. poczt. 199, ul. Teresy 8, 90-950 Łódź.

ROLA KOMÓREK GWIAZDZISTYCH W METABOLIZMIE WITAMINY A

THE ROLE OF STELLATE CELLS IN RETINOL METABOLISM

Joanna KOPEĆ-SZLĘZAK

Zakład Fizjopatologii, Instytut Hematologii w Warszawie

Streszczenie. Komórki gwiaździste należą do nieparenchymalnych komórek wątroby, są umieszczone w przestrzeniach Disse'a w zrazikach wątrobowych. Zasadniczą funkcją tych komórek jest gromadzenie witaminy A. Pobieranie, magazynowanie i uwalnianie retinolu przez komórki gwiaździste może decydować o przebiegu przemian witaminy A w organizmie. Komórki gwiaździste mogą przechodzić w tzw. komórki przejściowe i syntetyzować kolagen, zwłaszcza w procesach zwłóknienia wątroby.

Słowa kluczowe: komórki gwiaździste, witamina A, rola w metabolizmie retinolu.

Summary. The stellate cells are nonparenchymal cells localized in Disse spaces in hepatic lobule. Their main function is the storage of vitamin A. The uptake, storing and release of vitamin A by stellate cells may be critical for metabolism of retinoids in organism. The stellate cells in the fibrotic lesion, after transformation into transitional cells, are the crucial cellular source of collagen in liver.

Key words: stellate cells, vitamin A, role in retinol metabolism.

WSTĘP

W ostatnich latach w piśmiennictwie pojawiło się wiele prac wnoszących nowe, istotne informacje na temat znaczenia i metabolizmu witaminy A w organizmie. Dane te dotyczą głównie:

- odkrycia białek wiążących retinoidy podczas transportu tych związków wewnątrz organizmu zarówno w surowicy, jak i w komórkach [13, 37, 50],
- mechanizmu działania kwasu retinowego na materiał genetyczny w komórkach docelowych i wykrycia związanych z tym procesem receptorów w jądrze komórkowym [12, 27, 36, 45],

• właściwości antyoksydacyjnych witaminy A i jej ochronnych własności przed infekcjami i nowotworami poprzez działanie na układ odpornościowy organizmu [6, 9, 14, 24, 39, 41, 52),

• magazynowania witaminy A w komórkach gwiaździstych wątroby [3, 4, 7, 8, 20, 26, 32, 47].

Ponadto często omawiane są w piśmiennictwie skutki niedoboru witaminy A w diecie pokarmowej [2, 28], a także zagadnienia związane z toksycznym i teratologicznym działaniem witaminy A [18, 23]. Niewątpliwie wykrycie antykancerogennych właściwości witaminy A stanowiło moment decydujący o wzroście zainteresowania tą witaminą, co w konsekwencji przyczyniło się do znacznie dokładniejszego poznania jej roli w organizmie.

Szczegółowe nazewnictwo dotyczące karotenoidów określanych jako "witamina A" omówione jest w Postęпах Biochemii [50], tu tylko należy zaznaczyć, że według Komisji Słownictwa Biochemicznego nazwa "witamina A" powinna być używana jako określenie tych retinoidów, które wykazują aktywność retinolu. Retinoidy z kolei to klasa związków zawierających cztery jednostki izoprenoidowe. Najczęściej spotykane związki z tej klasy to:

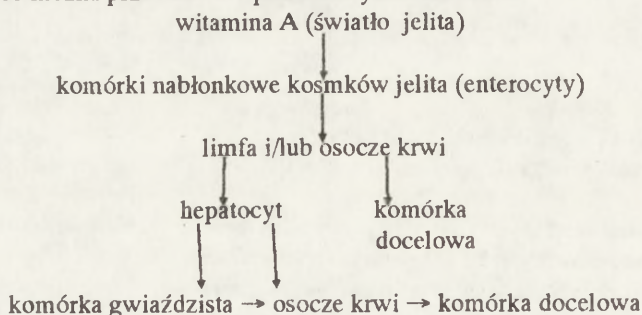
- retinol (znany pod nazwą alkoholu witaminy A),
- retinal (zwany aldehydem witaminy A),
- kwas retinowy (znany również pod nazwą tretinoinu),
- retinyle (np. octan retinyli).

Z procesami magazynowania witaminy A wiąże się ponowne "odkrycie" tzw. komórek gwiaździstych (*stellate cells*) w wątrobie i określenie ich udziału w gromadzeniu i uwalnianiu witaminy A, czym zajmuje się niniejszy artykuł.

DROGA WITAMINY A DO KOMÓREK GWIAZDZISTYCH

Witamina A zawarta jest w diecie pokarmowej głównie w postaci β -karotenu (pokarm pochodzenia roślinnego) i estrów retinyli w pokarmie pochodzenia zwierzęcego [7].

Zanim związki te dotrą z przewodu pokarmowego do komórek docelowych w organizmie, przechodzą wiele przemian, mogą być magazynowane i następnie transportowane z limfą lub osoczem krwi, co można przedstawić uproszczonym schematem:



Pobrany z pokarmem β -karoten może być bezpośrednio pochłaniany przez enterocyty, zaś estry retinyli są w świetle jelita enzymatycznie przeprowadzane w retinol, który następnie jest wchłaniany przez enterocyty [22, 25, 35].

Z transportem retinolu związane jest występowanie białek przenoszących ten związek:

- tzw. białek wiążących retinol w surowicy (RBP – *retinol binding-protein*) należących do białek α_2 o masie cząsteczkowej (20,960 Da) i przenoszonych w kompleksie z prealbuminą – transthyretiną w stosunku 1:1;

- tzw. komórkowych białek wiążących retinol (CRBP – *cellular retinol binding protein*), które przenoszą retinol z cytoplazmy do jąder komórkowych wewnątrz komórek [42].

"Współpraca" między tymi białkami następuje wg schematu: kompleks retinol-białko w surowicy wiąże się z powierzchnią komórki docelowej, retinol jest uwalniany do komórki, gdzie jest przejmowany przez komórkowe białka wiążące retinol w cytoplazmie i ewentualnie przenoszony do jądra komórkowego [51].

W enterocycie retinol łączy się z białkiem komórkowym wiążącym retinol (CRBP – *cellular retinol binding protein*), jest to tzw. CRBP II [22]. Kompleks ten służy jako substrat dla estryfikacyjnych enzymów mikrosomalnych, przede wszystkim dla acylotransferazy lecytynowo-retinowej i reduktazy retinolowej, która może estryfikować wolny retinol [54]. W tych reakcjach estryfikacji powstają estry retinylu z długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi np. z kwasem palmitynowym [25].

Kolejnym ważnym etapem przemian jest połączenie tych estrów z chylomikronami, zasadniczą frakcją lipoprotein osocza. Estry retinylu związane z chylomikronami (a ściślej z resztami chylomikronów) przechodzą z enterocytów do limfy, a następnie wchodzą przez naczynia włosowate do obiegu krwi i mogą wraz z osoczem dotrzeć do wątroby albo do komórek innych narządów, które są docelowe dla retinoidów [7].

W wątrobie dwa rodzaje komórek uczestniczą w metabolizmie witaminy A:

- (1) komórki parenchymalne (hepatocyty) oraz
- (2) komórki gwiazdziste [19].

Najpierw w komórkach parenchymy pobrane z chylomikronami estry retinylu są hydrolizowane do retinolu w błonie cytoplazmatycznej bądź w endosomach przez enzymy hydrolityczne [33]. Następnie retinol przenoszony jest do siateczki śródplazmatycznej, gdzie spotyka białka wiążące retinol CRBP I, w kompleksie CRBP I przechodzi do aparatu Golgiego i tworzy pęcherzyki wydzielnicze. Transport ten może zachodzić bardzo szybko i jak się wydaje, jest on regulowany ilością dostarczonych estrów retinylu do hepatocytu. Niedobór ich blokuje wydzielanie CRBP z siateczki śródplazmatycznej i hamuje transport do aparatu Golgiego [42].

Dalsze losy kompleksu CRBP-I-retinol wydzielanego z hepatocytu mogą być dwojakie:

- albo przechodzi on przez komórki do obiegu krwi i z osoczem wędruje do komórek docelowych,
- albo w celu magazynowania przechodzi do komórek gwiazdzistych w wątrobie, a przypuszczalnie i do takich komórek w innych narządach [3, 7, 20].

Stwierdzono jednakże, że 50–70% witaminy A u ssaków gromadzi się w wątrobie [2, 8], gdzie rolę komórek magazynujących retinoidy spełniają komórki gwiazdziste. Przejście retinolu z komórek parenchymy do komórek gwiazdzistych w wątrobie jest procesem specyficznym. Ani cholesterol, ani witamina D₃ pobierana przez komórki parenchymy z chylomikronów nie są przekazywane do żadnych komórek nieparenchymalnych [5].

Transport retinolu w wątrobie pomiędzy komórkami parenchymalnymi a komórkami gwiazdzistymi zachodzi przy pomocy wewnątrzkomórkowych białek wiążących retinol [5].

Pobieranie retinolu przez komórki gwiazdziste odbywa się poprzez receptory RBP tych komórek. Jak wskazują badania Blomhoff i wsp. [8], zastosowanie przeciwciał anti-RBP

blokuje przejście retinolu z komórek parenchymalnych do komórek gwiaździstych w wątrobie.

KOMÓRKI GWIAZDZISTE WĄTROBY

W wątrobie ssaków obok komórek parenchymalnych (hepatocytów) występują cztery rodzaje komórek, tzw. nieparenchymalnych:

- 1) komórki śródbłonna,
- 2) komórki Kupfera zwane makrofagami wątroby,
- 3) naturalne komórki zabijające – tzw. *pit cells* lub LGL (*large granular lymphocytes*),
- 4) okołozatokowe (okołosinusoidalne) komórki gwiaździste lub wprost komórki gwiaździste (*stellate cells*) [8, 11, 43].

Komórki te zostały opisane w 1876 roku i wadliwie sklasyfikowane przez Kupfera jako komórki gwiaździste o własnościach fagocytarnych. Błąd ten został sprostowany przez Wake w 1980 r., który wyjaśnił, że cząstki, które Kupfer określił jako sfagocytowane fragmenty erytrocytów, są w istocie kroplami lipidów [47].

W piśmiennictwie (również polskim) można spotkać nieścisłości dotyczące komórek gwiaździstych, polegające m.in. na przypisywaniu tej nazwy komórkom Kupfera, a komórkom zawierającym krople tłuszczu – nazwy komórki Ito, od nazwiska japońskiego badacza, który opisał ich ultrastrukturę w latach pięćdziesiątych. Właściwe i zgodne z aktualnym stanem wiedzy nazewnictwo i klasyfikacja nieparenchymalnych komórek w wątrobie są podane w "Histologii" pod redakcją prof. K. Ostrowskiego [29].

W piśmiennictwie anglojęzycznym można jednak do tej pory spotkać kilka terminów określających komórki gwiaździste, np.:

- *fat storing cells* [21, 38],
- *perisinusoidal stellate cells* [7, 8],
- *lipocytes* [44, 47],
- *Ito cells* [32, 53],
- *vitamin A storing cells* [20].

Na konferencji FASE (*Federation American Society Experimental*) dotyczącej retinoidów w 1986 roku ustalono przyjętą przez wielu badaczy nazwę *perisinusoidal stellate cells* lub *stellate cells* [8].

W wątrobie ssaków komórki gwiaździste występują mniej więcej równomiernie w zrazikach wątrobowych (rys. 1), choć komórki w centrum zrazika zawierają mniej witaminy A aniżeli położne w części okołoperiportalnej. Rozmieszczone są w przestrzeniach Disse'a, gdzie stanowią 97% występujących tam komórek, jednocześnie liczebność ich wynosi 10% wszystkich komórek nieparenchymalnych w wątrobie [4, 8, 29]. Liczba komórek gwiaździstych może jednak ulegać wahaniom i związana jest ze stopniem nasycenia organizmu witaminą A. Zmniejszeniu zawartości witaminy A towarzyszy obniżenie ilości komórek gwiaździstych w zrazikach wątrobowych, co obserwowano m.in. po diecie alkoholowej u zwierząt doświadczalnych (spadek do 48% stanu wyjściowego) lub intoksykacji czterochlorkiem węgla [44]. W przypadku jednoczesnego stosowania witaminy A i chronicznego podawania szczerom alkoholu zmniejsza się również liczba komórek gwiaździstych, ale nie występuje proces włóknienia wątroby [10].

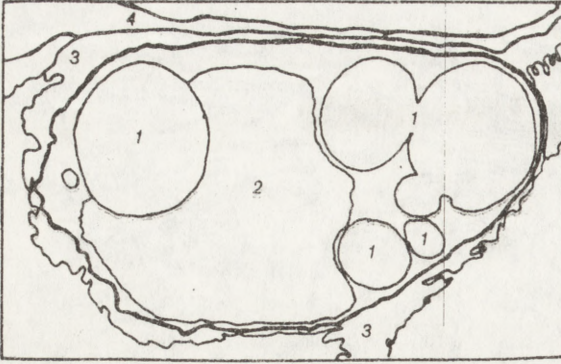


Rys. 1. Schemat zrazika wątroby (nieco zmieniony wg Junqueira Carneiro [21]): BC – kanalik żółciowy, P – beleczka wątrobowa, S – naczynie zatokowe, K – komórka Kupfera, En – komórka śródbłonka, F – komórka gwiaździsta

W mikroskopie świetlnym można wyróżnić komórki gwiaździste przy użyciu metody impregnacji chlorkiem złota, który jest redukowany przez witaminę A, oraz wykorzystując specyficzną dla witaminy A autofluorescencję [29], a także przy pomocy reakcji immunohistochemicznej przeciw mikrofilamentom desminy [53]. Ponadto stosowana jest metoda wysrebrzenia aparatu Golgiego dobrze rozwiniętego w komórkach gwiaździstych, co pozwala je wyróżnić od innych komórek przestrzeni Disse'a [8]. Komórki gwiaździste mają liczne wypustki (stąd nazwa tych komórek), które tworzą połączenia typu płytek przylegania (*adherens*) z hepatocytami [26].

W mikroskopie elektronowym widoczne są charakterystyczne dla komórek gwiaździstych krople lipidów w cytoplazmie, które magazynują witaminę A w postaci estrów retinyli. Stwierdzono występowanie dwu rodzajów kropli: związanych z błoną i niezwiązanych. Średnica tych kropli waha się od 1 do 3 μm . Siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego są rozbudowane, matriks cytoplazmy zawiera filanty (10 nm) – głównie desminę, ale także wimentynę, aktynę i tubulinę [26, 47]. Schemat komórki gwiaździstej wg elektronogramu przedstawia rysunek 2.

Komórki gwiaździste pochodzą z mezenchymy i można je wyróżnić od 7 tygodnia życia płodowego w wątrobie ludzkiej. W piątym miesiącu pojawiają się w tych komórkach krople tłuszczu [8]. Według aktualnych danych komórki gwiaździste lub do nich analogiczne występują w narządach poza wątrobą: w płucach, dwunastnicy, korze nadnerczy [47], a także w trzustce [20].



Rys. 2. Schemat komórki gwiazdzistej (według elektronogramu Mac et al. [26]): 1 – krople tłuszczu, 2 – jądro komórkowe, 3 – przestrzeń Disse'a, 4 – śródbłonek

stopniu występują estry cholesterolu i niezestryfikowanego retinolu [28].

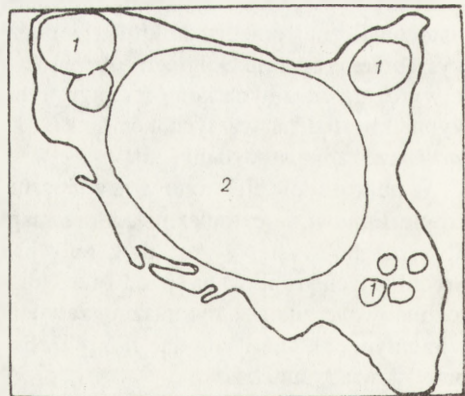
Porównanie struktury komórek gwiazdzistych w wątrobie ssaków do odpowiednich komórek u przedstawiciela niższych kręgowców – minoga (*Lampetra japonica*) z gromady kręgowców dostarcza danych, z których można przypuszczać o kierunku ewolucji komórek gwiazdzistych u kręgowców. Według badaczy japońskich w odróżnieniu od komórek u ssaków [48] komórki gwiazdziste tego minoga nie zawierają kropli tłuszczu związanych z błoną (tzw. typu I), natomiast mają ciała "gęste" (*dense bodies*). Komórki te wykazują również obecność dużej liczby mikrotubul i mikrofilamentów, co wskazuje na ich zdolność do kurczenia się.

Ponadto położenie komórek gwiazdzistych u minoga różni się od rozmieszczenia tych komórek w wątrobie ssaków, gdzie przylegają one do ścian naczyń włosowatych, a ich wypustki są umieszczone często wzdłuż tych ścian, a także pomiędzy hepatocytami. U minoga natomiast komórki gwiazdziste oddzielone są od komórek śródbłonka wiązkami mikrofilamentów, a od hepatocytów oddzielają je pęczki włókien kolagenowych. Autorzy tych badań sądzą, że podczas filogenezy komórki gwiazdziste gromadzące witaminę A wykształciły bardziej ścisły kontakt z śródbłonkiem naczyń włosowatych i hepatocytami, tak jak to ma miejsce w wątrobie ssaków. Bezpośredni kontakt komórek gwiazdzistych tak z naczyniami włosowatymi, jak i z komórkami parenchymy ułatwia w znacznym stopniu transport witaminy A.

Z badań Tanaka i wsp. [44] wynika, że komórki gwiazdziste mogą się dzielić. Przy pomocy metody podwójnego barwienia: immunochemicznego dla desminy (identyfika-

komórki gwiazdziste w wątrobie są jednak głównym "magazynem" witaminy A w organizmie. W komórkach parenchymy wątroby (hepatocytach) znajduje się 0,5–0,8 nmol całkowitego retinolu w przeliczeniu na 10^6 komórek, a w komórkach gwiazdzistych – 30 nmol na 10^6 komórek – czyli ok. 50-krotnie więcej. Z odniesienia tych wartości do całej wątroby wynika, że 80–90% witaminy A w tym narządzie gromadzi się w komórkach gwiazdzistych [8].

Przeważającym składnikiem kropli lipidowych w komórkach gwiazdzistych są estry retinolu, w mniejszym



Rys. 3. Schemat komórki gwiazdzistej po transformacji, tzw. komórki przejściowej (według elektronogramu Mac et al. [26]): 1 – krople tłuszczu, 2 – jądro komórkowe

cja komórek gwiaździstych) i Brd Urd (analogu tymidyny włączonego do replikującego się DNA w fazie syntezy DNA cyklu komórkowego) wykazano, że proliferacja komórek gwiaździstych w regenerującej wątrobie szczura osiąga maksimum w 2 dni po częściowej hepato-tektomii. Jest znamienne, że występuje ono w 24 godziny po osiągnięciu maksimum proliferacji hepatocytów.

Według badań Rossa i wsp. [38] komórki parenchymalne wątroby mogą zwiększać proliferację komórek gwiaździstych, ale tylko w warunkach regeneracji np. po hepato-tektomii. Indukcji takiej nie wywołują hepatocyty w "stanie spoczynku".

Interesujący może być również zaobserwowany wpływ komórek Kupfera (makrofagów wątroby) na proliferację komórek gwiaździstych. Komórki Kupfera prawdopodobnie poprzez indukcję receptorów czynników wzrostu pochodzących z płytek (PGDF – *platelet derived activating factor*) mogą nasilać proliferację komórek gwiaździstych *in vitro* [17].

UWALNIANIE WITAMINY A Z KOMÓREK GWIAZDZISTYCH

W niektórych pracach spotkać można sugestie, że retinol powraca z komórek gwiaździstych do hepatocytów i dopiero potem przechodzi do osocza [7]. Zostało jednak stwierdzone, że retinol może przechodzić z komórek gwiaździstych bezpośrednio do osocza, wykryto bowiem w komórkach gwiaździstych wątroby szczura pewne ilości białek RBP, oczywiście mniejsze niż w komórkach parenchymalnych, które zawierają ponad 90% RBP zawartych w wątrobie. Te niewielkie ilości RBP w komórkach gwiaździstych mogą pochodzić z wchłonięcia drogą endocytozy wraz z retinolem transportowanym z komórek parenchymy lub mogą być syntetyzowane *in situ*, jak to wynika z badań Blomhof i wsp. [5, 8], którzy stwierdzili w komórkach gwiaździstych m-RNA dla RBP.

Zatem uwalnianie retinolu z komórek gwiaździstych może następować poprzez komórki parenchymalne wątroby bądź też bezpośrednio do puli retinol-RBP w osoczu krwi. W tym procesie ważna jest rola jonów cynku, przy niedoborze występuje upośledzenie uwalniania retinolu z wątroby [40]. Komórki gwiaździste prawdopodobnie mogą kontrolować proces magazynowania i uwalniania witaminy A. Ta zdolność może zabezpieczać właściwy poziom retinolu w surowicy określaną jako 2 μM , pomimo normalnych wahań ilości pobieranej witaminy A w pożywieniu. Jest prawdopodobne, że stopień nasycenia CRBPI i RBP retinolem kontroluje pobieranie, magazynowanie i mobilizację retinolu przez komórki gwiaździste. Zawartość retinolu z kolei może również regulować transkrypcję i syntezę m-RNA dla białek transportujących retinol [34].

Należy dodać, że w osoczu kompleks retinol-RBP jest dodatkowo związany z białkiem: transthyretiną (TTR), co pozwala ochronić ten kompleks przed utratą podczas filtracji w nerkach [2].

Badania kinetyki retinoidów wykazały, że większość retinolu zawartego w surowicy krwi opuszcza obieg pozostając w wątrobie i powraca do surowicy 7–9 razy, zanim zostanie zużyta nieodwracalnie w komórkach docelowych. Recyrkulacja przyczynia się do stanu homeostazy poziomu witaminy A w surowicy [2] przy niejednakowej dziennej porcji witaminy dostarczanej z pokarmem.

Mechanizm pobierania retinolu z surowicy przez komórki docelowe nie jest dotąd w pełni poznany. Prawdopodobnie małe ilości retinolu mogą wnikać do komórki bez zaangażowania

powierzchniowego receptora lub drogą endocytozy fazy płynnej. Jednakże inne badania wykazują, że istnieje powierzchniowy receptor komórkowy dla retinolu związanego z RBP [7].

Prawdopodobnie jest możliwe występowanie kilku mechanizmów pobierania witaminy A przez komórki docelowe. W docelowych komórkach, a ściślej w cytosolu, retinol jest utleniany do kwasu retinowego [30], który wg najnowszych danych może regulować transkrypcję genetyczną [27]. Połączony z wewnątrzkomórkowym białkiem transportującym kwas retinowy dyfunduje do jąder komórkowych i wiąże się do receptorów jądrowych [45]. W wielu komórkach wykryto receptory jądrowe dla kwasu retinowego (tzw. RAR – *retinoic acid receptors*) kilku rodzajów [27] i stwierdzono, że wykazują homologię do receptorów hormonów sterydowych i tyroidowych [1, 15, 46]. Wszystkie poznane receptory jądrowe RAR są czynnikami transkrypcji zależnej od ligandu, co oznacza, że kompleks kwas retinowy-receptor kwasu retinowego reguluje ekspresję genów przez jego reakcję z RAR w sąsiedztwie genu docelowego [7].

Ta właściwość kwasu retinowego wiąże się z dawno poznanym znaczeniem witaminy A jako substancji regulującej procesy morfogenezy w rozwoju zarodkowym.

Kwas retinowy do niedawna był uważany za "morfogen" rozwoju kręgowców poprzez tworzenie gradientu koncentracji [36]. Wyniki badań z 1991 roku sugerują, że kwas retinowy może indukować tkanki do powstawania tzw. strefy aktywności polaryzującej, która z kolei kontroluje powstawanie narządów [31, 49].

UWAGI KOŃCOWE

Komórki gwiazdziste mogą pełnić jeszcze inną rolę poza magazynowaniem witaminy A. Stwierdzono, że w regenerującej wątrobie komórki gwiazdziste mogą ulegać transformacji w tzw. komórki przejściowe. Komórki przejściowe charakteryzują się zmniejszeniem liczby kropeł tłuszczu z witaminą A do poziomu 20% pierwotnej objętości oraz obecnością aktywnej związanej z desminą, co upodabnia je do miofibroblastów bądź fibroblastów (rys. 3). Szorstka siateczka śródplazmatyczna komórek przejściowych jest bardzo rozbudowana, co wskazuje na aktywność syntetyczną tych komórek. Jak wykazali m.in. Tanaka i wsp. [44], komórki gwiazdziste mają swój udział w fibrogeniezie w wątrobie, a po częściowej hepatohektomii u szczura liczba tych komórek może wzrosnąć 6-krotnie.

Podsumowując można stwierdzić, że regulująca rola komórek gwiazdzistych w gromadzeniu i uwalnianiu witaminy A, a zwłaszcza poznanie mechanizmów działania kwasu retinowego na transkrypcję genów w komórkach docelowych sugeruje pytanie, czy witamina A nie powinna być uważana za odpowiednik hormonu, a komórki gwiazdziste wątroby – jej magazyn – za rodzaj gruczołu wydzielania wewnętrznego? Sugestię taką przedstawia Wolf [51] w swej pracy dotyczącej działania witaminy A w różnych tkankach i wydaje się, że rozpatrzenie retinoidów jako hormonów byłoby szczególnie interesujące.

PIŚMIENICTWO

- [1] BEDO G, SANTISTEBAN P, ARANDA A. Retinoic acid regulates growth hormone expression. *Nature* 1989; **339**: 231–234.
- [2] BIESAŁSKI HK. Comparative assessment of the toxicology of vitamin A and retinoids in man. *Toxicology* 1989; **57**: 117–161.
- [3] BLANER WS, DIXON JL, MORIWAKI H, MARTINO RA, STEIN O, STEIN Y, GOODMAN DWS. Studies on the in vivo transfer of retinoids from parenchymal to stellate cells in rat liver. *Eur J Biochem* 1987; **164**: 301–307.
- [4] BLOMHOFF R, HOLTE K, NÆSS L, BERG T. Newly administrated (³H) retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp Cell Res* 1984; **150**: 186–193.
- [5] BLOMHOFF R, BERG T, NORUM KR. Transfer of retinol from parenchymal to stellate cells in liver is mediated by retinol - binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 3455–3458.
- [6] BLOMHOFF R, SKREDE B, NORUM KR. Uptake of chylomicron remnant retinyl ester via the low density lipoprotein receptor: implications for the role of vitamin A as a possible preventive for some forms of cancer. *J Int Med* 1990; **228**: 207–210.
- [7] BLOMHOFF R, GREERZ MH, BERG T, NORUM KR. Transport and storage of vitamin A. *Science* 1990; **250**: 399–404.
- [8] BLOMHOFF R, WAKE E. Persinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J* 1991; **5**: 271–277.
- [9] BODWEY JA, HORN W, HEYWORTH PG, ROBINSON JM, KARNOVSKY ML. Paradoxical effects of retinol in neutrophil stimulation. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14947–14953.
- [10] BOSMA A, SEIFERT WF, WILSON JHP, ROHOLL PJM, BROUVER A, KNOOK DL. Chronic administration of ethanol with high vitamin A supplementation in a liquid diet to rats does not cause liver fibrosis. *J Hepatol* 1991; **13**: 240–248.
- [11] BOUWENS L, MERINELLI A, KUPPEN P, EGGERMONT A, VAN DE VALDE C, WISSE E. Electron microscopic observations on the accumulation large granular lymphocytes (pit cells) and Kupffer cells in the liver of rats treated continuous infusion of interleukin-2. *Hepatology* 1990; **12**: 1365–1370.
- [12] BROCKES J. Reading the retinoid signals. *Nature* 1990; **345**: 766–768.
- [13] CHYTIL F, ONG DE. Intracellular vitamin A-binding proteins. *Ann Rev Nutr* 1987; **7**: 321–335.
- [14] DEGOS L, CASTAIGNE S, FENAUX P, DANIEL MT, DOMBRET H. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Nouv Rev Franc Dermatol* 1991; **33**: 183–185.
- [15] EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; **24**: 889–895.
- [16] FEX G, JOHANESSON G. Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes. *Bioph Bioch Acta* 1988; **944**: 249–255.
- [17] FRIEDMAN SL, ARTHUR MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1780–1785.
- [18] GEUBEL A, DE GALOCSY Ch, ALVER N. Liver damage caused by therapeutic vitamin A administration. *Gastroenterology* 1991; **100**: 1707–1709.
- [19] GJÓEN T, BJERKELUND T, BLOMHOFF HK, NORUM KR, BERG T, BLOMHOFF R. Liver takes up retinol-binding protein from plasma. *J Biol Chem* 1987; **262**: 10926–10930.
- [20] IKEJIRI N. The vitamin A - storing cells in the human and rat pancreas. *Kurume Med J* 1990; **37**: 67–81.
- [21] JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Basic Histology. 1983, Lange Medical Publications, Los Altos, 349.
- [22] KAKKAD BP, ONG DE. Reduction of retinaldehyd bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes intestine. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12916–12919.
- [23] KISTLER A, TSUCHIYA T, TSUCHIYA M, KLAUS M. Teratogenicity of arotinoids (retinoids) in vivo and in vitro. *Arch Toxicol* 1990; **64**: 616–622.
- [24] KRINSKY NI. Effects of carotenoids in cellular and animal system. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**: 238S–246S.
- [25] MACDONALD PN, ONG DE. Evidence for a lecithin-retinol acyltransferase activity in the rat small intestine. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12478–12482.
- [26] MAC KM, LEO MA, LIEBER CS. Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. *Gastroenterology* 1984; **87**: 188–200.
- [27] MANGELSDORF DJ, ONG ES, DYCH JA, EWANS RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; **345**: 224–229.
- [28] MORIWAKI H, BLANER WS, PIANTEDOSI R, GOODMAN DWS. Effects of dietary retinoid and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate lipid droplets. *J Lipid Res* 1988; **29**: 1523–1534.

- [29] MORAWSKI S. Wątroba i pęcherzyk żółciowy. [w] Ostrowski K. (red.) *Histologia*. Warszawa PZWL 1988; 514.
- [30] NAPOLI JL, RACE KR. Biogenesis of retinoic acid from β -caroten. *J Biol Chem* 1988; **263**: 17372–17377.
- [31] NOJI S, NOHNO T, KOYAMA E. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. *Nature* 1991; **350**: 83–86.
- [32] OGAWA A, SUZUKI J, MUKAI H, MORI H. Sequential changes of extracellular matrix and proliferation of Ito cells with enhanced expression of desmin and actin in focal hepatic injury. *Am J Pathol* 1986; **125**: 611–619.
- [33] ONG DE, MACDONALD PN, GUBITOSI AM. Esterification of retinol in rat liver. *J Biol Chem* 1988; **263**: 5789–5796.
- [34] PEROZZI G, MENGHERI E, COLANTUONI V, GAETANI S. Vitamin A intake and in vivo expression of the genes involved retinol transport. *Eur J Biochem* 1991; **196**: 211–217.
- [35] QUICK TC, ONG DE. Vitamin A metabolism in the human intestinal CaCo-2 cell line. *Biochemistry* 1990; **29**: 11116–11123.
- [36] RAGSDALE CW, PETKOWICH M, GATES PB, CHAMBON P, BROCKES JP. Identification of a novel retinoic acid receptor in regenerative tissues of the newt. *Nature* 1989; **341**: 654–657.
- [37] RAJAN N, BLANER WS, SOPRANO DR, SUHARA A, GOODMAN DWS. Cellular retinol binding protein m-RNA levels in normal nad retinoid deficient rats. *J Lipid Res* 1990; **31**: 821–829.
- [38] ROSS RS, LOTFI S, GRESNER AM. Effects of hepatocytes on proliferation and proteoglycan synthesis of cultured rat fat storing cells. *Europ J Cell Biol* 1991; **54**, suppl. 32: 715.
- [39] SCHMIDT K. Antioxidant vitamins and β -caroten: effects a immunocompetence. *Am J Clin Nutr* 1991; **53**: 383S–385S.
- [40] SCHÖLMEIRICH I, FABIAN M, TAKBER R, LÖHLE E. Portacaval shunt as and experimental model of impaired hepatic release of vitamin A in liver disease. *Gastroenterology* 1991; **100**: 1379–1384.
- [41] SIDEL N, TAGA T, HIRANO T, KISHIMOTO T, SAXON A. Retinoic acid-induced growth inhibition of a human myeloma cell line via down-regulation of IL-6 receptors. *J Immunol* 1991; **146**: 3809–3814.
- [42] SUHARA A, KATO M, KANOI M. Ultrastructural localization of plasma retinol-binding protein in rat liver. *J Lipid Res* 1990; **31**: 1669–1674.
- [43] TANAKA Y, MAK KIM, LIEBER CS. Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver. *J Pathol* 1990; **160**: 129–134.
- [44] TANAKA Y, FUNAKI N, MAK KM, KIM C, LIEBER CS. Effects of ethanol and hepatic vitamin A on the proliferation of lipocytes in regenerating rat liver. *J Hepat* 1991; **12**: 344–350.
- [45] DE THE H, VIVANCO-RUIZ MM, TIOLLAIS P, STUNNEBERG H, DEJCAN A. Identification of a retinoic responsive element in the retinoic acid receptor B gene. *Nature* 1990; **343**: 177–180.
- [46] UMESONO K, GIGUERE V, GLASS CK, ROSENFELD MG, EVANS RM. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 1988; **336**: 226–266.
- [47] WAKE K. Perisinusoidal stellate cells (fat storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A - storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 1980; **66**: 303–353.
- [48] WAKE K, MATOMATSU K, SENOO H. Stellate cells storing retinol in the liver of adult lamprey, *Lampetra japonica*. *Cell Tissue Res* 1987; **249**: 289–299.
- [49] WANEK N, GARDINER DM, MUNEOKA K, BRYANT SV. Conversion by retinoic acid of anterior cells into TPA cells in the chick wing bud. *Nature* 1991; **350**: 81–83.
- [50] WOJCIECHOWSKI Z. Słownictwo retinoidów. *Post Bioch* 1989; **35**: 172–181.
- [51] WOLF G. The intracellular vitamin A-binding proteins: an overview of their functions. *Nutr Rev* 1991; **49**: 1–12.
- [52] YAMAMOTO M. Retinoids in the host defense system. *World Rev Nutr Diet* 1991; **64**: 58–84.
- [53] YOKOI Y, NAMIHISA T, KURODA H, KOMATSU I, MIYAZAKI A, WATANABE S, USUI K. Immunohistochemical detection of desmin in fat storing cells (Ito cells). *Hepatology* 1984; **4**: 709–714.

Otrzymano: 27.12.1991.

Przyjęto: 06. 01. 1992.

Adres autorki: ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa.

KOMÓRKI LINII PŁCIOWEJ – NOŚNIKI NIEŚMIERTELNOŚCI*

GERM LINE CELLS – CARRIERS OF IMMORTALITY

Jerzy KLAG

Zakład Zoologii Systematycznej i Zoogeografii Instytutu Zoologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie. Historia nauki ukazuje wiele sporów, w których część racji była po jednej stronie, część po drugiej, a równocześnie obie strony myliły się w istotnych kwestiach. Przykładem takiego sporu może być zagadnienie przekazywania cech rodziców na potomstwo i następnie zagadnienie ciągłości linii płciowej. Weismann twierdził, że istnieje linia komórek płciowych niezależna od linii komórek somatycznych, zaś Waldeyer, że komórki płciowe powstają z komórek somatycznych w organizmie dorosłym. Współczesne badania wykazały, że obydwaj badacze mieli po części rację. Są organizmy (nicieńce, owady, kręgowce), u których komórki linii płciowej są oddzielane wcześniej w rozwoju zarodkowym od linii somatycznej, ale są i takie (gąbki, jamochłony, robaki płaskie), u których gamety pochodzą z komórek somatycznych.

Słowa kluczowe: linia płciowa, linia somatyczna, historia nauki.

Summary. History of science gives us many examples of disputes, where both sides were right in some points but wrong in some others. As an example of such a polemic may serve the question of heredity of acquired characters and subsequently the question of continuity of the germ cell line. Weismann claimed that the germ cell line existed independent from somatic cells in the animal kingdom; whereas Waldeyer maintained that the germ cells differentiated from the somatic cells even in a fully mature organism. Modern studies have shown that both researchers were partly right and partly wrong. It has been shown that there are organisms (e.g. nematodes, insects, vertebrates) in which the germ line cells are separated early from the somatic cells during the embryonic development. However, there are also other organisms (e.g. sponges, hydroids, flat worms) where the germ cells differentiate from the somatic cells.

Key words: germ line, somatic line, history of science.

W historii nauki znamy wiele sporów, w których obydwie strony starały się dowieść, że racja jest tylko po ich stronie, natomiast ich przeciwnicy są w błędzie. Bardzo rzadko zdarzało się jednak, żeby tak było w istocie. Zwykle część racji była po jednej stronie, część po drugiej, a równocześnie obydwie strony myliły się w różnych innych kwestiach. Dopiero połączenie

*Praca została wykonana w ramach grantu KBN: "Cytoplazmatyczne podłoże gradientów rozwoju w oocytach owadów".

obu punktów widzenia doprowadzało do sformułowania teorii opisującej rzeczywistość prawidłowo [10, 12]. Dobrym przykładem takiego sporu jest zagadnienie linii płciowej i drogi przekazywania cech rodziców na ich potomstwo.

Sprawy rozrodu, dziedziczenia cech rodziców przez potomstwo interesowały ludzi od najstarszych dziejów. Mieli swoje wytłumaczenie tych zagadnień myśliciele starożytności, tacy jak Arystoteles czy Hipokrates, mieli też swoje wytłumaczenie preformacjoniści i epigenetycy XVII i XVIII wieku.

Starożytni Grecy wierzyli na przykład, że okaleczeni rodzice przekazują te okaleczenia, choćby tylko w postaci śladów, na swoje dzieci. W XVIII wieku epigenetyk Buffon pisał, że potomstwo psów, którym przytnie się ogony i uszy, będzie pozbawione tych części ciała. Jednakże Bonnet, który był zagorzałym zwolennikiem preformacjonizmu, protestował bardzo gwałtownie przeciwko takiej interpretacji przytaczając jednocześnie szereg przykładów braku dziedziczenia cech nabytych. Pisał na przykład, że chociaż Anglicy od wieków przycinają ogony swoim koniom, młode konie ciągle rodzą się z ogonami takiej samej długości. Potomstwo niewidomego, który stracił oczy, rodzi się z oczami zdrowymi, potomstwo jednorękiego ma obie ręce [12].

Podane przykłady odzwierciedlają przeciwstawne opinie dotyczące reprodukcji. Epigenetyk Buffon przyjmował, że nowy byt powstaje z nasienia, amorficznej substancji, która zawiera tzw. "molekuły" reprezentujące wszystkie elementy ciała, takie jak: kości, mięśnie, nerwy, płyny ustrojowe, poszczególne narządy. Nasienie jest formowane we wszystkich narządach każdorazowo w trakcie reprodukcji, a w nasieniu "molekuły" wysyłane są do narządów rozrodczych. Jeśli ciało ulega modyfikacji, to odpowiedniej modyfikacji musi ulec także nasienie. W takim przypadku dziedziczenie cech nabytych staje się rzeczą zrozumiałą. Przeciwnie zakładali preformacjoniści, tacy jak np. Bonnet, którzy przyjmowali, że nowy osobnik w miniaturowych rozmiarach jest zawarty w całości w jaju już w momencie urodzenia się matki. Matka ta nie ma więc możliwości przekazania temu zarodkowi jakichkolwiek cech nabytych w trakcie swego życia osobniczego.

Po sformułowaniu przez Lamarcka jego teorii ewolucyjnej sposób dziedziczenia cech nabytych stał się zagadnieniem fundamentalnym. Darwinizm początkowo przyznawał jeszcze pewną rolę przekazywaniu na potomstwo cech nabytych. Darwin zakładał bowiem istnienie tak zwanych gemmul albo jednostek dziedzicznych produkowanych stale przez wszystkie komórki ciała (odpowiedniki "molekuł" Buffona). Modyfikacja komórek ciała powodować miała produkcję zmodyfikowanych gemmul i przekazanie za ich pośrednictwem zmodyfikowanych cech.

W XIX wieku mnożyły się doniesienia o faktach przekazywania cech nabytych na potomstwo. W publikacjach z tamtego okresu można na przykład przeczytać: "Kotka, której ogon uległ zmiążdżeniu, urodziła młode bez ogonów; suka z uszkodzonym kręgosłupem urodziła szczenięta ze zniekształconą tylną częścią ciała; człowiekowi na skutek wypadku opadały powieki i tę anomalię przekazał dwójce ze swych trojga dzieci; żrebaki tresowanych rodziców dają się łatwiej tresować" itp. Żaden z powyższych faktów nie był oparty na eksperymencie i nie przedstawiał wartości naukowej, jednak wiadomości tego rodzaju były rozgłaszane jako dowody na poparcie tezy o istnieniu dziedziczenia cech nabytych, co z kolei stanowiło poparcie dla teorii Lamarcka.

Pierwszy eksperyment sprawdzający to zagadnienie został wykonany w 1847 roku. Holenderski weterynarz Flourens nie dopuszczał do wzrostu rogów u sześciu cieląt różnych płci. Gdy te bezrogie zwierzęta dojrzały, wydały potomstwo z rogami normalnymi. Flourens

wykonał też serię systematycznych badań nad psami ucinając ogony przez kilka pokoleń, ale potomstwo każdorazowo miało ogony normalnej długości.

W 1887 roku problemem tym zajął się Weismann. Uznał, że trzeba zrealizować proste, a przekonujące doświadczenie. Obcinał ogony samcom i samicom myszy przez pięć pokoleń. Wszystkie młode rodziły się z ogonami absolutnie tej samej długości, co myszy dziko żyjące. Konkluzja była oczywista: okaleczenia nie są dziedziczne. Później wykazano też, że nie są dziedziczne okaleczenia inne, takie jak: usuwanie siekaczy, dziurawienie nosów, warg czy uszu przeprowadzane w różnych grupach etnicznych przez wiele pokoleń, przez setki lat. W ten sposób przedstawiony problem właściwie kończył spór. Obecnie już wiadomo na pewno, że cechy nabyte w okresie życia osobniczego nie są przekazywane na potomstwo.

Wspomniane doświadczenia, przeprowadzone przez Weismanna, potwierdzały jego wcześniejsze poglądy. Według niego komórki rozrodcze mają specyficzną strukturę molekularną zupełnie inną niż pozostałe komórki ciała. Uszkodzenie ciała nie może więc wpłynąć na ustaloną wcześniej strukturę komórki rozrodczej. Weismann przyjmował niezależność dwóch części organizmu: somy i germen (plazma płciowa). Germen w kolejnych pokoleniach pozostaje nieśmiertelna, podczas gdy soma obumiera. Komórki germen tworzące szlak płciowy są jedynymi komórkami w organizmie, które zachowują komplet determinantów. Natomiast komórki somy tracą stopniowo determinanty w miarę różnicowania się tkanki. W tym świetle Weismann uważał, że żadne zmiany w ciele nie mogą być przenoszone na komórki linii płciowej. Tłumaczył on, że zmiany pod wpływem środowiska mogą dotyczyć tylko somy. Tylko ciało może się modyfikować pod wpływem środowiska (zmiany somatogenne), a z powodu oddzielenia somy od germen zmiany te nie mogą być jednak przekazywane na potomstwo. Na potomstwo mogą być jednak przekazywane zmiany zachodzące w germen, czyli w komórkach linii płciowej albo w komórkach rozrodczych: jajach i plemnikach (zmiany blastogenne).

Po doświadczeniach wykonanych przez Weismanna większość przyrodników zaakceptowała pogląd, że cechy nabyte w czasie życia osobniczego nie są przekazywane na potomstwo. Bardzo wielu jednak nie zaakceptowało podstawowej idei – ciągłości szlaku płciowego.

Spór dotyczący dziedziczenia cech nie zakończył się więc całkowicie, lecz toczył się i toczy nadal na innym poziomie. Toczy się on na poziomie komórek linii płciowej, chodzi o to, czy komórki rozrodcze mnożą się przez wieki i w każdym pokoleniu budują ciało zwierzęcia jako swoją ochronę, czy też ciało osobnika w odpowiednim momencie rozwoju produkuje gamety w drodze odróżnicowywania się komórek somatycznych [1, 2, 3, 4, 13, 14].

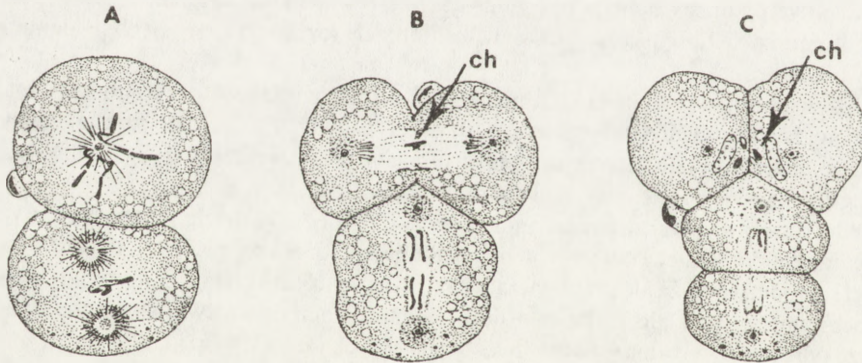
Pierwszym badaczem, który wystąpił z koncepcją negującą istnienie linii płciowej, był Waldeyer [8, 9]. Zaproponował on teorię nabłonka płciowego, według której komórki płciowe wyróżnicowują się z komórek somatycznych tworzących nabłonek gonady nawet w organizmie dorosłym i dojrzałym płciowo. Według Waldeyera komórki nabłonka gonady dają początek zarówno oocytom, jak i komórkom folikularnym. Komórki płciowe pojawiają się więc późno w rozwoju ontogenetycznym i różnicują się na takiej samej zasadzie jak komórki skóry czy wątroby.

Również współcześnie ukazują się prace potwierdzające bądź teorię Weismanna, bądź teorię Waldeyera [1, 2]. Pomimo licznych doświadczeń ich wyniki nie pozwalają na jednoznaczne rozstrzygnięcie sporu. Jako dowód potwierdzający trudności w interpretacji eksperymentów świadczą poglądy znanych badaczy zagadnienia linii płciowej prof. Nieuwkoop a i dr Sutasurii. Badacze ci napisali dwie książki na temat determinacji i różnicowania się

komórek płciowych. Jedna książka dotyczy pochodzenia komórek prapłciowych u kręgowców, a druga u bezkręgowców. W pierwszej książce piszą, że linia płciowa istnieje, a w drugiej wycofują się z tego oświadczać wręcz, że się pomylili i że jednak nie wierzą w ciągłość linii płciowej [8, 9].

Zobaczmy jednak, w jaki sposób pojawiają się komórki płciowe w rozwoju różnych gatunków zwierząt zarówno kręgowców, jak i bezkręgowców. Zaczniemy od przykładu, który najlepiej "potwierdza" teorię plazmy płciowej Weismanna.

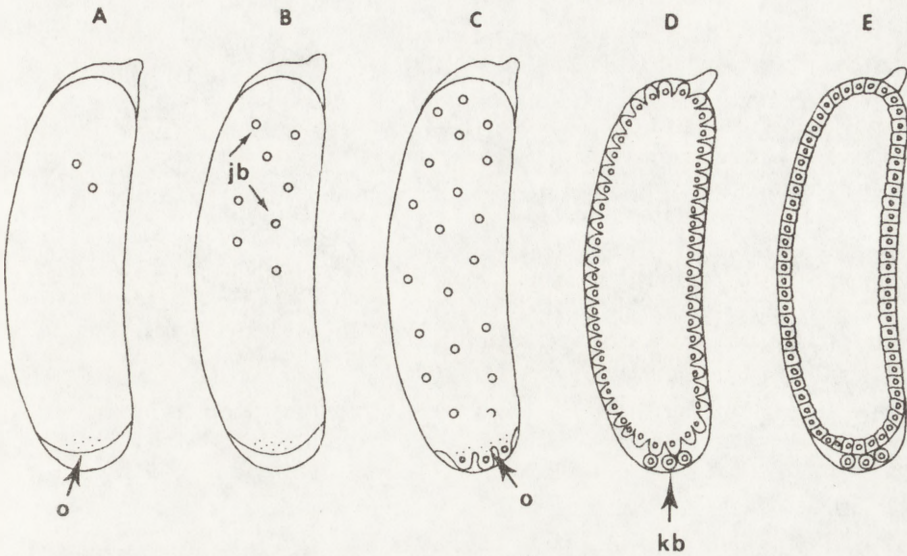
U robaków obłych jaja są kuliste, ale spolaryzowane dzięki nierównomiernemu rozłożeniu substancji (rys. 1). Na jednym biegunie jest substancja jaśniejsza, a na drugim barwiąca się nieco ciemniej (większe czarne kropki na dolnym biegunie) [11, 14]. Pierwszy podział brudzkowania przebiega w ten sposób, że rozdziela dwie części wypełnione różnymi substancjami (rys. 1A). Następny podział jest dziwny. Mianowicie komórka powstała na biegunie ciemniejszym dzieli się rozdzielając równomiernie chromosomy do komórek potomnych, a druga powstała na biegunie jaśniejszym gubi w trakcie podziału fragmenty chromosomów tak, że komórki potomne otrzymują mniej chromatyny, niż miała zygota (rys. 1B, C, -ch). Proces gubienia fragmentów chromosomów w trakcie podziału nazywamy dyminucją chromatyny. W następnym podziale jedna z dwu komórek na biegunie ciemniejszym dzieli się znów normalnie, a jej siostra przechodzi dyminucję chromatyny. Komórki bieguna jaśniejszego, które już przeszły ten proces, dzielą się bez komplikacji. Po pięciu rundach takich podziałów pozostają dwie komórki dysponujące pełnym kompletem chromatyny (są to komórki linii



Rys. 1. Schemat pierwszych podziałów brudzkowania zarodka glisty końskiej: ciemne kropki reprezentują substancję odpowiedzialną za determinację komórek prapłciowych, obecność tej substancji w komórce zabezpiecza ją przed dyminucją chromatyny; ch – odrzucone do cytoplazmy fragmenty chromosomów

płciowej – germen). Pozostałe zaś komórki ze zredukowaną, niepełną ilością chromatyny to komórki somatyczne robaka (soma).

Na tylnym biegunie świeżo złożonego jaja niektórych owadów można zauważyć skupienie zasadochłonnego materiału nazwanego oosomem (rys. 2). Po zapłodnieniu jądro zygotyczne zaczyna się dzielić (rys. 2A), a jądra potomne rozprzestrzeniają się w ooplazmie zbliżając się stopniowo do powierzchni jaja (rys. 2B). Jako pierwsze do warstwy powierzchniowej wchodzi jądra na tylnym biegunie (rys. 2C). Wchodzi one oczywiście w obręb oosomu.



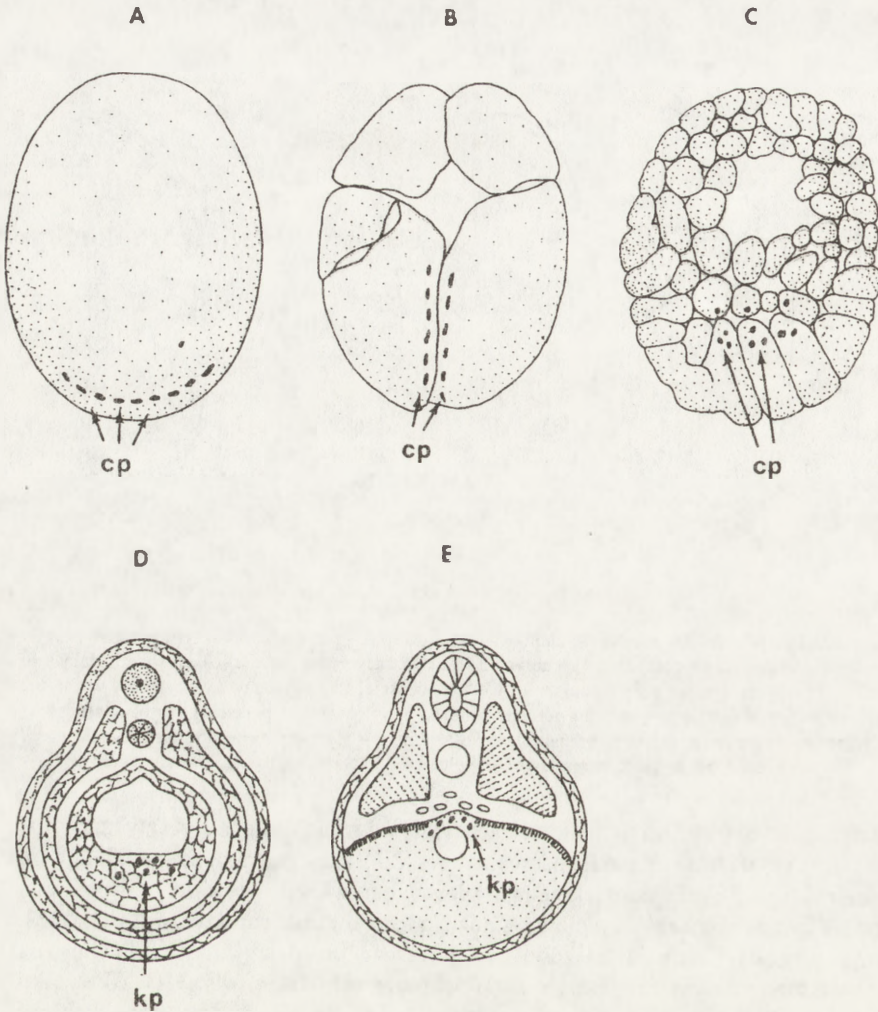
Rys. 2. Schemat początkowych stadiów rozwojowych muszki owocowej: A – pierwszy podział jądra zygocynicznego; na tylnym biegunie jaja widoczne nagromadzenie ciemnych ziaren tworzących tzw. oosom (o), B – namnażające się jądra blastomerów (jb) rozprzestrzeniają się w ooplazmie, C – najwcześniejsze jądra wnikają w obręb oosomu (o), D – na tylnym biegunie powstały już odrębne komórki biegunowe (kb), podczas gdy pozostałe jądra dopiero zaczynają się odgraniczać od siebie błonami komórkowymi, E – blastoderm komórkowa została utworzona, ale komórki biegunowe (linii płciowej) znalazły się poza nią

Natychmiast też otaczają się błonami komórkowymi, oddzielają się od reszty zarodka, zamykając w swej cytoplazmie materiał oosomalny (rys. 2D). Znacznie później oddzielają się pozostałe komórki (rys. 2E). Te oddzielone jako pierwsze to właśnie komórki linii płciowej (germen) albo tak zwane komórki prapłciowe, a pozostałe to komórki somatyczne (soma) [3].

Na biegunie wegetatywnym jaj płazów, nawet jeszcze przed ich zniesieniem można zauważyć wysepki cytoplazmy zawierające zasadochłonną substancję (rys. 3A). W wyniku bruzdkowania wysepki te przemieszczają się w głąb zarodka (rys. 3B), aby następnie znaleźć się w kilku blastomerach (rys. 3C), które zatrzymują się najpierw wśród komórek endodermy (rys. 3D), a następnie wędrują do zawiązków gonad (rys. 3E), gdzie rozwijają się w komórki rozrodcze (germen). Pozostałe komórki to komórki somatyczne (soma).

Możemy teraz łatwo zrozumieć Weismanna i jego teorię linii płciowej. Istnieją w każdym organizmie komórki traktowane w specjalny sposób, oddzielane od komórek budujących ciało bardzo wcześnie w rozwoju zarodkowym i szczególnie chronione. Komórki somatyczne zestarzeją się i zginą na pewno. Komórki linii płciowej mają szansę być nieśmiertelne i żyć tak długo, jak długo będzie istniało życie na Ziemi. Natomiast wszystko to, co obecnie żyje na Ziemi łącznie z nami, jest kontynuacją życia, które powstało na naszej planecie miliardy lat temu.

W każdym z opisanych powyżej pierwszych etapów rozwoju zarodkowego następuje wczesne oddzielenie linii płciowej od somatycznej. W podobny sposób przebiegają początkowe stadia rozwoju zarodkowego u wielkiej liczby dotychczas poznanych gatunków. Niestety nie u wszystkich, czas teraz podać przykłady przystające raczej do teorii Waldeyera.



Rys. 3. Schemat początkowych stadiów rozwoju zarodka płaza: A – jajo tuż po złożeniu, ciemne plamki na biegunie wegetatywnym reprezentują bazofilne wysepki tzw. "cytoplazmy płciowej" (cp), B – po pierwszym podziale "wysepki" wzdłuż błony komórkowej przesuwały się do wnętrza zarodka (cp), C – stadium blastuli, "wysepki" cytoplazmy płciowej znajdują się w nielicznych blastomerach półkuli wegetatywnej (cp), D – stadium neuruli; po odrzuceniu żółtka komórki zawierające cytoplazmę płciową stały się komórkami prapłciowymi (kp) i znajdują się teraz wśród dużych komórek spodniej części rozwijającego się jelita, E – komórki prapłciowe (kp) wędrują do grzbietowej części jelita, aby się zbliżyć do tworzących się zawiązków gonad, gdzie się ostatecznie osiedlą

Organizmy zwierząt niższych, takich jak: gąbki, jamochłony czy robaki płaskie, nie tylko mają ciało o nieskomplikowanej budowie, ale także komórki budujące ich ciało są często w stanie pozwalającym na odróżnicowanie do stanu embrionalnego. Wśród tych zwierząt, a także wśród osłonnic czy mszywiolów spotyka się też często rozmnażanie w drodze pączkowania czy innego typu rozmnażanie bezpłciowe.

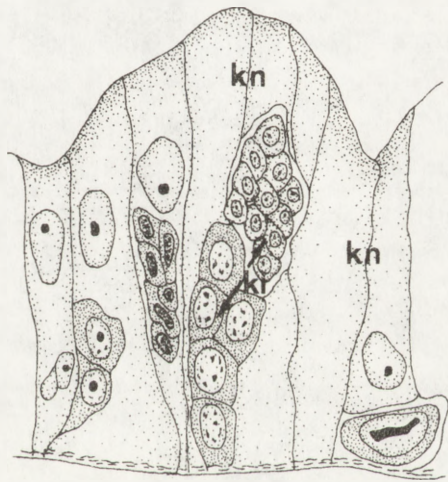
U wielu gąbek plemniki czy komórki jajowe powstają z tzw. choanocytów – komórek typowo somatycznych tworzących w dojrzałym organizmie ściany komór wewnętrznych odpowiedzialnych za pobieranie pokarmu. Wiele gąbek tworzy też rozmnożki, zwane gemulami, w których elementy rozrodcze powstają z archeocytów uważanych przez wielu badaczy za komórki somatyczne o charakterze embrionalnym [4].

Jamochłony należą do zwierząt rozmnażających się bardzo wydajnie przez pączkowanie. Zjawisko to jest u tych zwierząt ułatwione dzięki obecności licznych komórek o charakterze embrionalnym, zwanych interstycjalnymi. Komórki te mają wygląd niezróżnicowanych i leżą w grupach w obrębie ektodermy (rys. 4). Z komórek interstycjalnych tworzą się komórki rozrodcze, czyli plemniki i jaja, ale także dzięki nim regenerują wszystkie inne komórki ciała (czyli nabłonkowo-mięśniowe, nerwowe, przydełkowe, trawienne, gruczołowe itd.). W związku z tym nie można komórek tych uważać za komórki prapłciowe przeznaczone wyłącznie do produkcji gamet. Z takiej obserwacji wynika wniosek następujący: gamety powstają z komórek interstycjalnych taką samą drogą różnicowania komórkowego jak komórki somatyczne.

Podobnie przedstawia się sprawa u wypławków, u których komórki o charakterze embrionalnym są obecne w organizmach przez całe życie. Komórki te w wymienionej grupie zwierząt zostały nazwane neoblastami, ale ich charakter jest identyczny jak komórek interstycjalnych jamochłonów. Neoblasty służą jako źródło gamet, ale równocześnie (podobnie jak u jamochłonów) na ich koszt zachodzi regeneracja tkanek somatycznych robaka [4].

Zjawisko wyraźnego braku linii płciowej występuje także u mszywiolów. Zwierzęta te tworzą kolonie złożone z organizmów klonalnych, czyli pochodzących od jednego osobnika rozmnażającego się bezpłciowo drogą pączkowania. W tej grupie zwierząt występuje też inny typ rozmnażania bezpłciowego, a mianowicie rozmnażanie za pomocą rozmnożek, zwanych statoblastami (rys. 5). Zarówno pączki, jak i statoblasty tworzą się przez odróżnicowanie typowo somatycznych komórek stanowiących nabłonek ektodermalny i nabłonek mezodermalny (rys. 6). Pomimo to że pochodzą wyłącznie z komórek somatycznych, organizmy potomne mają zawsze zdolność produkowania komórek jajowych i plemników.

Na podstawie powyższych faktów można wysnuć wniosek, że spór o to, czy linia płciowa istnieje w świecie zwierząt czy nie, można rozwiązać przyjmując, że w pewnych grupach, zwłaszcza u zwierząt wyższych komórki prapłciowe są oddzielane od somatycznych na wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego i są jedynym źródłem gamet dla tych organizmów. W takim przypadku można wyróżnić "somę" i "germen". Natomiast w grupach zwierząt stojących nisko w systematyce linia płciowa nie stanowi ciągłości, a gamety powstają z



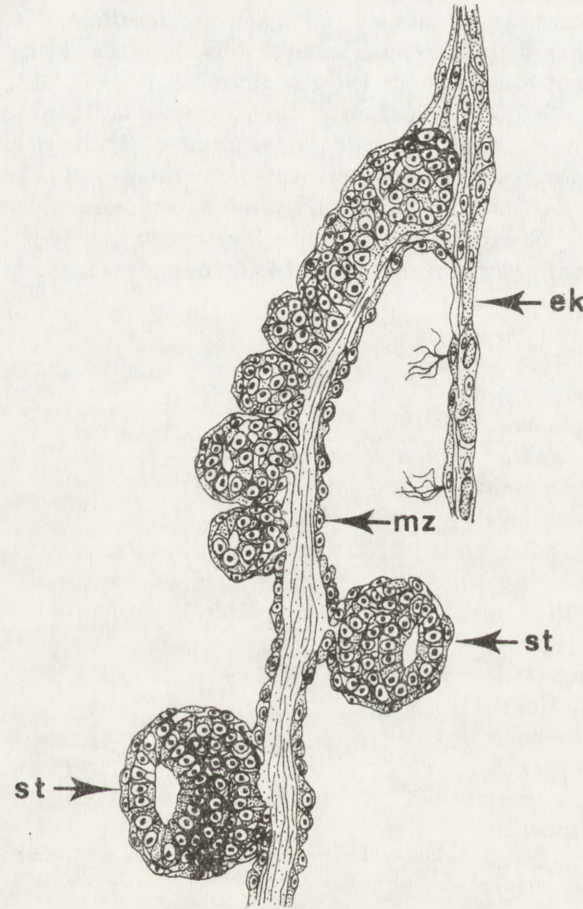
Rys. 4. Fragment ektodermy służy: wśród komórek nabłonkowo-mięśniowych (kn) leżą gniazda komórek interstycjalnych (ki)

komórek o charakterze embrionalnym na takiej zasadzie jak komórki somatyczne. W tym przypadku trudno jest wyróżnić te dwa elementy "some" i "germen".

Zagadnienie to uległo dalszej komplikacji wraz z odkryciem u jamochłonów różnych populacji komórek interstycjalnych. Najpierw odkryto, że stułbia pozbawiona pewnej populacji komórek interstycjalnych potrafi regenerować wszystkie tkanki somatyczne i nawet komórki jajowe, ale ani ten osobnik, ani jego potomstwo nie są w stanie wytworzyć męskich komórek rozrodczych, czyli plemników [5,7]. W kilka lat później odkryto w rodzaju *Hydra* inną populację komórek interstycjalnych, bez których zwierzę regeneruje wszystkie komórki organizmu z wyjątkiem komórek żeńskiej linii płciowej [6]. Te odkrycia zachwiały naszą wiarę w nieistnienie linii płciowej w niższych grupach zwierząt. Wyniki te jednak są izolowane i dotyczą tylko jednego rodzaju jamochłonów. Z ostatecznymi wnioskami trzeba więc poczekać na rezultaty dalszych badań.

Jak wobec tego mamy się u stosunkować do sporu rozpoczętego przez Weismanna i Waldeyera? Któremu z nich przyznać rację?

Jak już było powiedziane, w historii badań naukowych często dochodziło do sporów, czasami zajadłych, w których broniono prze ciwstawnych, zdawałoby się



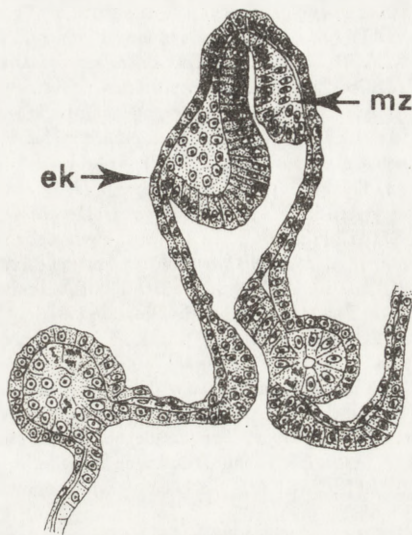
Rys. 5. Fragment funikulusa mszywiota: funiculus – twór mezodermalny (mz), do którego wędrują komórki ektodermalne (ek), aby razem tworzyć statoblasty (st), które są rozmnożkami rozwijającymi się w kompletne, wyposażone w komórki płciowe organizmy

nie do pogodzenia opinii. Bardzo spektakularnym przykładem takiego sporu może też być wieloletni spór pomiędzy preformacjonistami i epigenetykami. Epigenetycy, jak na przykład Harvey, wierzyli swoim obserwacjom, gdy ogłaszali, że rozwój zarodka przebiega stopniowo i tkanki powstają kolejno, w określonym porządku z niezorganizowanej materii zawartej w jajach. Preformacjoniści wierzyli zdrowemu rozsądkowi przyjmując, że żywy organizm nie może powstawać z grudki "nieożywionej materii organicznej". Tak nieożywionej, ponieważ

epigenetycy przyjmowali, że jajo jest grudką materii nieożywionej jak kromka chleba czy jajko na twardo, a życie wstępuje w nią w momencie rozpoczęcia rozwoju.

Po wielu latach sporów, po sformułowaniu komórkowej teorii budowy organizmów i odkryciu, że jajo i plemnik to żywe komórki, okazało się, że obydwie strony sporu mają rację w pewnym stopniu. Epigenetycy mieli rację opisując rozwój tkanek zarodka z niezorganizowanej struktury jaja, a z drugiej strony preformacjoniści uważając, że do prawidłowego rozwoju musi istnieć żywa matryca odziedziczona po poprzednim pokoleniu, według której budowany jest nowy osobnik. Dopiero połączenie prawdziwych, a odrzucenie fałszywych elementów obu tych teorii pozwala na prawidłowy opis rozwoju ontogenetycznego i filogenetycznego zwierząt. Podobnie rozwijała się dyskusja w przypadku bardzo wielu sporów toczonych przez uczonych w różnych innych dziedzinach nauk. Początkowo przeciwstawne opinie w miarę odkrywania faktów zdobywanych w drodze eksperymentalnej łączy się, aby utworzyć wreszcie teorię opisującą obiektywną rzeczywistość.

Podobnie jest w przypadku sporu o pochodzenie komórek linii płciowej. Punkty widzenia Weismanna i Waldeyera wydają się nie do pogodzenia. Tymczasem najprawdopodobniej obydwaj w pewnym sensie mieli rację i obydwaj w wielu punktach się mylili. Nie jest prawdą na przykład stwierdzenie Weismanna, że komórki somatyczne "gubią" w trakcie rozwoju "determinanty", w wyniku czego komórki somatyczne nie mają pełnego kompletu genów. Jak wykazały liczne doświadczenia, skład genów w chromosomach komórek somatycznych nie różni się od tego w komórkach linii płciowej (wyjątek stanowią gatunki, u których dochodzi do dyminucji chromatyny, ale i w tych przypadkach odrzucone zostają tylko powtarzalne odcinki DNA). Mylił się też Waldeyer twierdząc, że gamety mogą powstawać z komórek somatycznych u kręgowców. Obydwaj jednak mają rację, bo są gatunki, takie jak na przykład robaki obłe, stawonogi, kręgowce, u których mamy do czynienia z wyraźną ciągłością linii płciowej, ale są i takie, jak gąbki, jamochłony, robaki płaskie, u których nie możemy znaleźć dowodów na jej istnienie. Stwierdzenie tego faktu stawia oczywiście przed nami szereg nowych pytań, ale to już inna historia.



Rys. 6. Przekrój przez fragment ściany ciała mszywiola w okolicy strefy pączkowania, pączki powstają przez namnażanie się komórek ektodermi (ek) i mezodermi (mz) po ich wcześniejszym odróżnicowaniu do stanu embrjonalnego

LITERATURA

- [1] BEAMS HW, KESSEL RG. The problem of germ cell determinants. *Int Rev Cytol* 1974; **39**: 413–479.
- [2] EDDY EM. Germ plasm and the differentiation of the germ line. *Int Rev Cytol* 1975; **43**: 229–280.
- [3] KLAG J. Linia płciowa *Tetradontophora bielensis* (Insecta, Collembola). Analiza porównawcza powstawania i różnicowania się komórek prapłciowych w rozwoju zarodkowym owadów. *Post Biol Kom* 1983; **10**(4): 289–316.
- [4] KLAG J. Linia płciowa w ontogenezie bezkręgowców. *Przeł Zool* 1983; **27**(3): 261–278.
- [5] LITTLEFIELD CL. Sex determination in *Hydra*: control by a subpopulation of interstitial cells in *Hydra oligactis* males. *Devl Biol* 1986; **117**: 428–434.
- [6] LITTLEFIELD CL. Cell lineages in *Hydra*: isolation and characterization of an interstitial stem cell restricted to egg production in *Hydra oligactis*. *Devl Biol* 1991; **143**: 378–388.
- [7] LITTLEFIELD CL, BODE HR. Germ cells in *Hydra oligactis* males. II. Evidence for a subpopulation of interstitial stem cells whose differentiation is limited to sperm production. *Devl Biol* 1986; **116**: 381–386.
- [8] NIEUWKOOP PD, SUTASURYA LA. Primordial Germ Cells in the Chordates. Cambridge, London, New York: Cambridge University Press. 1979.
- [9] NIEUWKOOP PD, SUTASURYA LA. Primordial Germ Cells in the Invertebrates. Cambridge, London, New York: Cambridge University Press. 1981.
- [10] ROSTAND J. La Formation de l'Être. France. Librairie Hachette. 1950.
- [11] STROME S, WOOD WB. Immunofluorescence visualization of germ-line specific granules in embryos, larvae and adults of *Coenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 1558–1562.
- [12] TAYLOR GR. Histoire Illustre de la Biologie. Librairie Hachette. 1963.
- [13] TERPIŁOWSKA B. Tor płciowy widłonogów na tle tego zjawiska w świecie zwierząt. *Przeł Zool* 1976; **20**: 33–48.
- [14] TOBLER H. The differentiation of germ and somatic cell lines in Nematodes. [w:] Hennig W. (red.) Germ Line – Soma Differentiation. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1986: 1–69.

Otrzymano: 14.11.1991.

Przyjęto: 05.12.1991.

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

AUTORZY TECHNIKI *PATCH CLAMP* WYRÓŻNIENI NAGRODĄ NOBLA W MEDYCYNIE

AUTHORS OF *PATCH CLAMP* TECHNIQUE
REWARDED BY NOBEL PRIZE IN MEDICINE

Remigiusz TARNECKI, Tomasz WERKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Streszczenie. Tegoroczną Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny otrzymali dwaj niemieccy elektrofizjolodzy Erwin Neher i Bert Sakmann. W połowie lat 1970 opisali oni nową technikę – *patch clamp*, która zrewolucjonizowała badania fizjologii komórki. Technika ta poraz pierwszy umożliwiła zaobserwowanie efektu otwierania i zamykania pojedynczych kanałów jonowych oraz studiowanie własności białek tworzących kanały jonowe błon komórkowych na poziomie molekularnym.

Summary. This year's Nobel prize for medicine has gone to Erwin Neher and Bert Sakmann, two German electrophysiologists who in the mid-seventies described the technique that revolutionized cell physiology – the patch clamp recording. This technique made it possible for the first time to observe the effects of opening and closing single ion channels, and studying the activity of membrane proteins that regulates the behavior of individual ion channels.

W 1991 roku Nagroda Nobla w medycynie i fizjologii przypadła w udziale dwu niemieckim neurofizjologom: doktorowi Erwinowi Neherowi pracującemu w Instytucie Maxa Plancka w Getyndze oraz doktorowi Bertowi Sakmannowi z Instytutu Badań Medycznych w Heidelbergu. To najbardziej prestiżowe wyróżnienie jest dowodem powszechnego uznania ich twórczego wysiłku, który zaowocował opracowaniem oryginalnej metody rejestracji procesów elektrycznych błon komórkowych zwanej *patch clamp* oraz zastosowania tej metody w pionierskich badaniach nad kanałami jonowymi błon komórkowych. Metoda ta pozwala na nadzwyczaj precyzyjną rejestrację aktywności elektrycznej bardzo małych (0,5–1,0 μm średnicy) obszarów błony komórkowej, na których mogą być obserwowane i dokładnie mierzone efekty bramkowania – otwierania i zamykania pojedynczych kanałów jonowych. Wyniki tych badań opublikowali oni w czasopiśmie *Nature* [1] opisując jak kilkumikrometrowy fragment błony może być elektrycznie izolowany i przygotowany do rejestracji milion razy dokładniejszych niż w dotychczas stosowanej metodzie mikroelektrodowej rejestracji wewnątrzkomórkowej techniką *voltage clamp*. Potwierdzili oni równocześnie bezpośrednimi pomiarami istnienie kanałów jonowych w błonach komórkowych.

Opracowana przez Nehera i Sakmanna metoda *patch clamp* umożliwiająca dokładność rejestracji procesów bioelektrycznych komórek na poziomie pojedynczych pikoamperów ($pA = 10^{-12}A$) zrewolucjonizowała fizjologię komórkową [2]. To milionkrotne zwiększenie rozdzielczości pomiarowej w stosunku do "starych" technik rejestracji mikroelektrodowych pozwoliło tej parze uczonych wzbogacić naszą wiedzę o wędrówkach jonów przez błony komórkowe o szereg faktów istotnych dla zrozumienia mechanizmów dynamiki działania kanałów. Stwierdzili oni, że ruch jonów podczas generacji potencjału czynnościowego odbywa się kanałami jonowymi w ten sposób, że po otwarciu kanałów w jednostce czasu przez pojedynczy kanał przepływa tylko jeden jon. Ruch jonów jest więc "kwantowany". Jony nie płyną strumieniem, jak postulowali niektórzy fizjolodzy badający mechanizmy generacji potencjałów czynnościowych.

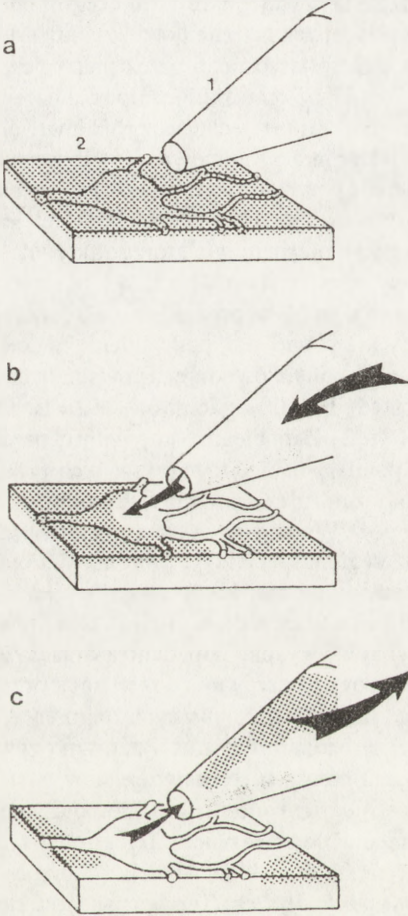
Przed wprowadzeniem do badań elektrofizjologicznych metody *patch clamp* penetracje wnętrza żywej komórki prowadzone metodą *voltage clamp* – manipulowanie jej wewnętrznym środowiskiem (poprzez wprowadzenie jonów lub innych ciał chemicznie czynnych jak np. cząsteczek przekaźnika drugorzędowego) i rejestracja wyników tych zabiegów była możliwa tylko z wnętrza bardzo dużych i tym samym nie typowych dla układu nerwowego komórek. Metoda *patch clamp* umożliwia ingerencję w wewnętrzne środowisko komórki niezależnie od jej rozmiarów, rodzaju i charakteru spełnianych przez nią funkcji w organizmie; pozwala również, jak to zaznaczono na wstępie, na badanie kilkumikrometrowych, izolowanych fragmentów błony komórkowej. Tak więc metoda ta jest w ręku fizjologa komórki bardzo precyzyjnym i potężnym narzędziem badawczym. Daje możliwości studiowania izolowanych, pojedynczych kanałów jonowych, ich własności, takich jak: przewodność, selektywność, charakterystyki napięciowe elementów bramkujących, kinetyka otwierania i zamykania kanałów oraz mechanizmy rządzące tymi procesami. Technika *patch clamp* otworzyła nowe perspektywy badań biofizycznych kanałów jonowych. Zapoczątkowała także bardzo ważne kierunki badań dla fizjologii i medycyny umożliwiając eksperymenty na bardzo małych, dotychczas całkowicie niedostępnych dla bezpośrednich pomiarów – komórkach tkanek zwierzęcych i roślinnych. Po raz pierwszy zbadano m.in. własności błon i mechanizmy wydzielania komórek wielu gruczołów, np.: komórek trzustki, komórek gruczołu łzowego, czerwone ciała krwi [3], ludzkie limfocyty T, własności kinetyczne błon komórek rakowych (fragmentów tkanki pobieranych w celach autopsji) i wyizolowanych pręcików siatkówki oka salamandry [4, 5]. Stwierdzono również istnienie kanałów jonowych w błonach komórek roślinnych o kinetyce i strukturze podobnych do kanałów jonowych komórek zwierzęcych. Warto więc może przybliżyć czytelnikowi procedurę stosowania tej najnowocześniejszej, ale trudnej technicznie i technologicznie metody rejestracji. Metoda rejestracji techniką *patch clamp* (niestety nie ma jak na razie dobrej, polskiej nazwy zarówno dla *patch-*, jak i *voltage-clamp*) po raz pierwszy została zastosowana przez jej wynalazców do rejestracji procesów komórkowych w hodowli tkankowej. Następnie została przystosowana do rejestracji procesów komórkowych małych skrawków mózgu o wymiarach $300 \times 300 \times 700 \mu m$. W takim skrawku (w terminologii anglosaskiej nazywanym *slice*) umieszczonym w kąpielii gwarantującej zachowanie homeostazy prawidłowa czynność komórek nerwowych utrzymuje się przez okres kilku do kilkunastu godzin, w tym czasie można wszechstronnie badać procesy komórkowe, takie jak np.: pobudzenia synaptycznego, procesy transmisji między morfologicznie zidentyfikowanymi neuronami (gdyż w takim preparacie struktura połączeń sieci neuronalnej kilkuset tysięcy neuronów pozostaje nie uszkodzona), bezpośredni wpływ na

procesy błonowe dowolnych substancji chemicznych: neurotransmiterów, neuromodulatorów itd.

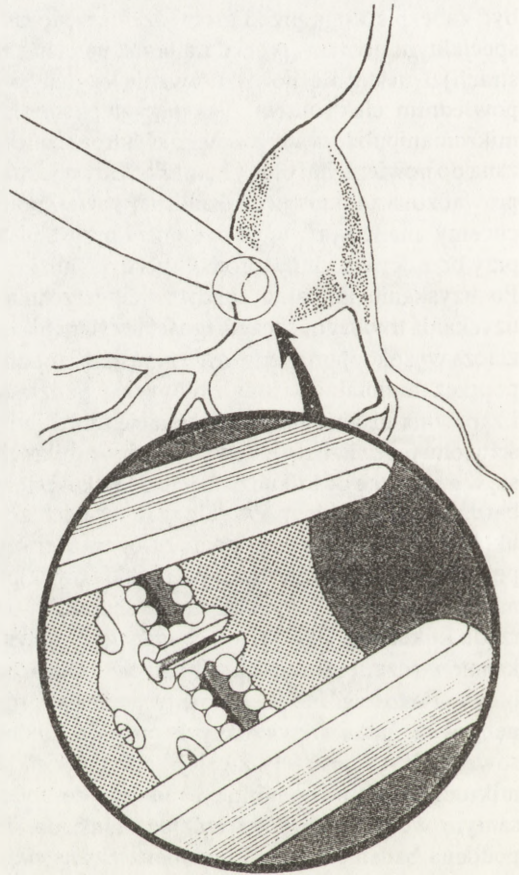
Jednym z najważniejszych i zarazem trudnych elementów tej metody rejestracji jest przygotowanie sondy pomiarowej. Rolę takiej sondy spełnia odpowiednio przygotowana mikroelektroda szklana, mikrokapilara, której powierzchnia czynnego, rejestrującego końca ma średnicę 0,3–0,5 μm . Po uformowaniu mikroelektrody jej zewnętrzna powierzchnia musi być zabezpieczona przed gromadzeniem się ładunku elektrostatycznego przez pokrycie jej specjalnym płynem (procedura ta ma na celu zmniejszenie poziomu zakłóceń podczas rejestracji) i następnie po oszlifowaniu czynnego końca napełniona techniką próżniową odpowiednim elektrolitem. Tak przygotowana mikroelektroda jest mocowana w uchwycie mikromanipulatora sterowanego elektronicznie i następnie pod kontrolą mikroskopową zbliżana do powierzchni błony komórki. Gdy rejestracja procesów bioelektrycznych komórek jest prowadzona na skrawkach tkanki nerwowej, powierzchnia błony neuronu, którego aktywność chcemy analizować, musi być przed przystąpieniem do rejestracji oczyszczona z neuropilu przy pomocy enzymów proteolitycznych lub mechanicznie techniką podciśnieniową (rys. 1). Po uzyskaniu kontaktu sondy z powierzchnią błony włączone jest podciśnienie w celu uzyskania trwałego i szczelnego jej przylegania do ścianek sondy. Powoduje to powstanie tzw. złącza wysokooporowego (*tight gigaseal*) o oporności rzędu 10–100 gigaohmów, $G\Omega = 10^9 \Omega$) poprzez minimalne wessanie błony do wnętrza sondy (rys. 2). Zapobiega to upływności prądu i zapewnia niskoszumową rejestrację umożliwiającą pomiary napięć towarzyszących przejściu jonu przez kanał błonowy. Oporność mikroelektrody zależnie od potrzeb rejestracji waha się w granicach od kilkudziesięciu do kilkuset megaohmów. Wymagane są więc wzmacniacze bardzo wysokiej klasy. Zwykle są to wzmacniacze z szeregiem specjalnych, automatycznych układów kontrolnych do pomiaru oporności sondy, automatycznej kompensacji napięcia i pojemności, szybkich układów próbujących pomiar i iniekcję prądu do przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Wzmacniacze te charakteryzują się bardzo wysoką impedancją wejściową rzędu kilkunastu $G\Omega$. Metoda *patch clamp* może być stosowana zarówno do rejestracji pracy kanałów rozmieszczonych w różnych obszarach błony, jak i w wyizolowanych fragmentach błony. Poszczególne jej warianty pozwalają również na badanie własności zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych powierzchni błon komórkowych. Najłatwiejszą w zastosowaniu jest rejestracja z całej komórki (*cell attached configuration*). Szybkie oderwanie mikroelektrody od komórki powoduje pozostanie fragmentu błony we wnętrzu elektrody i tym samym wewnętrzna powierzchnia błony ma kontakt ze środowiskiem kąpieli i może być poddana badaniom. Jest to odmiana zwana *inside out configuration*. Ten wariant jest stosowany z powodzeniem w badaniach roli Ca^{2+} w procesach długotrwałych zmian pobudliwości komórki związanych ze zmianami plastycznymi i procesami pamięci. Najtrudniejszym technicznie jest wariant pozwalający na rejestrację wpływu zmian środowiska zewnętrznego na zewnętrzną powierzchnię komórki – *outside-out configuration*, który jest stosowany w badaniach wpływu różnych neurotransmiterów lub innych substancji chemicznych oraz różnych jonów na zewnętrzną powierzchnię błony. Badania wykonywane na tym preparacie są w głównej mierze prowadzone na potrzeby medycyny przy badaniu zmian patologicznych błon komórkowych w różnych schorzeniach oraz wpływu różnych leków na funkcjonowanie błon.

Przedstawiony powyżej obszar zastosowań badawczych metody *patch clamp* dowodzi, jak silnym narzędziem badawczym może być ona w ręku doświadczonego eksperymentatora, szczególnie w połączeniu z technikami morfologicznymi oraz technikami stosowanymi w

biologii molekularnej [6, 7]. Połączenie tych technik w eksperymentach komórkowych pozwala na badania wpływu zmian konformacyjnych białek tworzących kanały jonowe na własności błon komórkowych, jak np. wybiórczą przepuszczalność. Cecha ta ma zasadnicze znaczenie dla procesów komórkowych, gdyż przenikanie różnych substancji do wnętrza



Rys. 1. Fragment skrawka tkanki nerwowej – enzymatyczno-mechaniczne czyszczenie powierzchni błony neuronu: a – sonda ssąca (1) zbliżająca się do powierzchni skrawka (2); b – wprowadzenie enzymu na powierzchnię skrawka; c – podciśnieniowe usuwanie neuropilu z powierzchni błony neuronu po wstępnym trawieniu enzymem



Rys. 2. Sonda umieszczona na powierzchni neuronu; w powiększeniu pokazano fragment błony wprowadzony techniką podciśnieniową na kilka nm do wnętrza sondy

Wśród społeczności naukowej panuje powszechne przekonanie, że Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii przyznano zespołowi, który w pełni na to zasłużył. Ludzie ci stworzyli wspaniałe narzędzie dające nadzwyczaj szerokie możliwości badania procesów życiowych komórki w obszarach dotychczas niedostępnych dla eksperymentów neurofizjologicznych – metodę *patch clamp*, techniki tak potrzebnej nowoczesnej medycynie w dobie wprowadzania przeszczepów tkankowych, ostatnio nawet tkanek wyhodowanych w laboratoryjnej hodowli tkankowej z komórek pobranych od pacjenta. Nie trzeba chyba nikogo przekonywać, że dalszy rozwój technik implantacji wymaga szerokiej wiedzy o mechanizmach funkcjonowania zarówno pojedynczych komórek, jak i procesów interakcji międzykomórkowych, na której wzbogacenie pozwala metoda *patch clamp*.

LITERATURA

- [1] NEHER E, SAKMANN B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; **260**: 799–802.
- [2] SAKMANN B, NEHER E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Ann Rev Physiol* 1984; **46**: 455–472.
- [3] GRYGORCZYK R, SCHWARZ W, PASSOW H. Ca^{2+} -activated channels in human red cells. *Biophys J* 1984; **45**: 693–698.
- [4] ATTWELL D, GRAY P. Patch clamp recording from isolated rods of the salamander retina. *J Physiol* 1984; **351**: 9P.
- [5] COLEMAN PA, MILLER RF. Measurement of passive membrane parameters with whole-cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J Neurophysiol* 1989; **1**: 218–230.
- [6] SIEGELBAUM SA, CAMARDO JS, KANDEL ER. Serotonin and c-AMP close single K channels in *Aplysia* sensory neurons. *Nature* 1982; **299**: 413–417.
- [7] VERDOORN TA, BURNASHEV N, MONYER H, SEEBURG PH, SAKMANN B. Structural determinations of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 1991.

■ Z Kroniki

Zarząd Główny *Polskiego Towarzystwa Anatomicznego* i *Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików* oraz *Redakcja Postępów Biologii Komórki* zorganizowali w dniu 16 listopada 1991 r. w Warszawie doroczną XXI Konferencję szkoleniową z zakresu biologii komórki na temat: WYBRANE ZAGADNIENIA OOGENEZY.

Program konferencji przedstawiał się następująco:

- (1) prof. dr hab. Zofia Bielańska-Osuchowska: Oogeneza – wprowadzenie ogólne.
- (2) prof. dr hab. Szczepan Biliński: Gromadzenie informacji rozwojowej w oogenezie u bezkręgowców.
- (3) dr Urszula Sępińska: Informacja rozwojowa w oocytach i wczesnych zarodkach ssaków.
- (4) dr hab. Maria Szołtys: Struktura i funkcja pęcherzyków jajnikowych.
- (5) prof. dr hab. Jadwiga Pszała: Regulacja hormonalna owulacji u ssaków.

Uczestnikom konferencji umożliwiono zakup zeszytów Postępów Biologii Komórki po niższej cenie.

W dniu 25 stycznia 1992 r. w Warszawie odbyła się konferencja pt.
CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA W DIAGNOSTYCE KLINICZNEJ
zorganizowana przez *Zakład Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia*
Podyplomowego i firmę *Becton-Dickinson*. Wygłoszono następujące referaty:

- (1) J. Skierski – Podstawy cytometrii przepływowej
- (2) A. Niezabitowski, B. Lackowska – I. Cytofluorometryczna ocena ekspresji powierzchniowych antygenów oraz zawartości DNA limfocytów w chłoniakach nieziarniczych; II. Wykorzystanie programu SIMULSET w badaniu limfocytów krwi obwodowej podczas przebiegu terapii przeciwnowotworowej
- (3) M. Kuchnio, A. Stojałowska – Próba oceny stopnia zróżnicowania i dojrzałości komórek linii granulocytarnej szpiku
- (4) H. Skurzak – Limfocyty krwi przechowywane w niskiej temperaturze wykorzystane w analizie cytometrią przepływową
- (5) M. Jakóbsiak, S. Bruno, J. S. Skierski, Z. Darżynkiewicz – Swoisty wpływ lovastatyny na cykl komórkowy
- (6) P. Kolecki, E. Baumgarten, H. Schmid, U. Radwańska, G. Henze – Terapia dzieci z ostrą białaczką limfatyczną (ALL) w remisji niskimi dawkami IL-2 oraz IFN γ
- (7) F. Vanlangendonck – Quality assurance in DNA-measurements on FACS-systems
- (8) J. Barth – Overview of the most important applications of flow cytometry and the corresponding instrument solution from Becton-Dickinson

Podczas konferencji demonstrowano sprzęt firmy Becton-Dickinson oraz możliwości wykorzystania komputerów IBM do analiz wyników cytometrii przepływowej. Po konferencji przeprowadzono dziewięć jednodniowych szkoleń praktycznych z analizy cytometrem przepływowym leukocytów krwi człowieka.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

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

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

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

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

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przesyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. W tekście nie należy robić podkreśleń.

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

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

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

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

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

TREŚĆ

W tym Zeszytcie Postępów Biologii Komórki . . .	1
HORST A. – Geny przeciwnowotworowe jako czynniki regulatorowe wzrostu i różnicowania komórek	3
BILIŃSKI S. – Powstawanie i depozycja matczynych czynników rozwojowych w oocytach bezkręgowców	23
KONONOWICZ H. – Somatyczna embriogeneza roślin in vitro. II. Charakterystyka cytologiczna i problem stabilności genetycznej	35
RUPNIEWSKA Z. M. i DMOSZYŃSKA A. – Antygen CD 5 i jego rola w stanie fizjologicznym i w patologii	45
RYDZYŃSKI K. – Heterogenność komórek tucznych: Fakt czy artefakt?	61
KOPEĆ-SZLĘZAK J. – Rola komórek gwiaździstych w metabolizmie witaminy A	77
KLAG J. – Komórki linii płciowej – nośniki nieśmiertelności	87
TARNECKI R. i WERKA T. – Autorzy techniki <i>patch clamp</i> wyróżnieni nagrodą Nobla w medycynie	97
Z kroniki	103

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1992

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1992 r. na 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 rocznika (4 zeszyty) dla instytucji (bibliotek) wynosi 180 000 zł, a dla odbiorców indywidualnych 40 000 zł.

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:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 5.01132-40006576-132-1110.

Price per year 20 dollars USA.

Indeks 369705