

p2435
PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

TOM 21 NR-4'94
(349–488)

Postępy Biologii Komórki

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

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,
Olgiert NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,
Lech WOJTCZAK

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

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- W regulacji procesu spermatogenezy u ssaków biorą udział peptydowe czynniki parakrynowe wydzielane przez jądro. Modułują one odpowiedź na hormony przysadkowe (str. 351)
- W tylakoidach występują trzy białkowe transbłonowe suprakompleksy zaangażowane w transport elektronów. Są to: fotosystem I (PS I), II (PS II) i kompleks cytochrom b₆f. O tym ostatnim można przeczytać na stronach 375–390
- Redagowanie jest procesem zmieniającym strukturę transkryptu. Proces znany z organellowych mRNA występuje także w tRNA, o czym można przeczytać na stronach 391–394.
- O peptydach regulacyjnych wydzielanych przez komórki parafolikularne (C) tarczycy można przeczytać na stronach 395–408.
- Nowe strategie terapii nowotworów oparte na wprowadzaniu genów do komórek nowotworowych lub prawidłowych przedstawiono na stronach 409–429.
- O porynie (kanale VDAC) czytaj na stronach 431–459.
- Komórki krwiotwórcze krwi pępowinowej mogą być wygodną alternatywą dla przeszczepień szpiku, gdyż nie narażają dawcy na jakiegokolwiek niebezpieczeństwo. Z mrożonych w ciekłym azocie komórek krwiotwórczych można tworzyć banki komórek gotowych do przeszczepień (str. 461).
- O odkryciu białek G (nagroda Nobla w 1994 r) można przeczytać na str. 479.



KOMUNIKATY

Komunikat Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce

Pozwalamy sobie poinformować, że zostało powołane do życia Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce.

Kolegium powstało z inicjatywy Krajowego Zespołu Specjalistów ds. Diagnostyki Laboratoryjnej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej oraz kilkudziesięciu specjalistów medycyny laboratoryjnej z ośrodków akademickich i pozaakademickich z całej Polski.

Kolegium będzie kolegialną i samorządną, ale jednocześnie niezależną reprezentacją specjalistów różnych dziedzin medycyny laboratoryjnej (diagnostyki laboratoryjnej), takich jak: hematologia, serologia i transfuzjologia, immunologia, toksykologia, patomorfologia i cytologia kliniczna, genetyka kliniczna i cytogenetyka, medycyna nuklearna i endokrynologia, bakteriologia i wirusologia, parazytologia, biochemia i analityka kliniczna. Wspólnym i jednoczącym wszystkie dziedziny medycyny momentem jest diagnostyczny wymiar badania laboratoryjnego.

Kolegium będzie instytucją opiniotwórczą dbającą o prawidłowe pod względem merytorycznym, organizacyjnym i technicznym rozwiązanie wszystkich problemów medycyny laboratoryjnej.

Cele, jakie sobie stawia Kolegium, obejmują wszystkie istotne problemy medycyny laboratoryjnej. Kolegium będzie wspomagać poczynania prowadzące do wprowadzenia usług diagnostycznych we wszystkich dziedzinach medycyny laboratoryjnej.

Kolegium będzie pełnić rolę integrującą środowisko i reprezentować je wobec administracji państwowej i samorządowej. Kolegium zamierza współdziałać z towarzystwami nauowymi i korporacjami zawodowymi.

Mamy nadzieję, że idea Kolegium Medycyny Laboratoryjnej wpisuje się w perspektywę zmian, reformy organizacji i działania ochrony zdrowia w Polsce i że zyska ona aprobatę i poparcie środowiska.

dr Gerard Nowacki
Przewodniczący Komisji Promocji
i Organizacji Kolegium

prof. Jerzy Rogulski
Prezes Kolegium Medycyny
Laboratoryjnej w Polsce

KOLEGIUM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ W POLSCE

– KOMISJA PROMOCJI

Fundacja Rozwoju Diagnostyki Laboratoryjnej

31-501 Kraków, ul. Św. Agnieszki 1

tel. 22 08 39, fax 22 83 05

ROLA CZYNNIKÓW PARAKRYNOWYCH W MĘSKIM UKŁADZIE ROZRODCZYM*

THE ROLE OF PARACRINE FACTORS IN MALE REPRODUCTIVE SYSTEM

Michał JANITZ, Maciej KURPISZ

Zakład Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk

Streszczenie. Obecny model kontroli procesu spermatogenezy u ssaków uwzględnia nie tylko sprzężenie zwrotne pomiędzy androgenami i gonadotropinami przysadki, ale także regulację opartą na peptydowych czynnikach parakrynowych wydzielanych przez jądro. Białka te mają zróżnicowany charakter obejmując czynniki wzrostu, cytokiny oraz proto-onkogeny. Ich oddziaływanie wiąże się zarówno z proliferacją i różnicowaniem nabłonka plemnikotwórczego, jak i syntezą androgenów. Pośrednicząc we wzajemnym komunikowaniu się komórek somatycznych i germinalnych czynniki parakrynowe modulują ich odpowiedź na hormony przysadkowe.

Słowa kluczowe: spermatogeneza, sterydogeneza, czynniki wzrostu, cytokiny, proto-onkogeny.

Summary. Beside the feedback between androgens and pituitary gonadotropins, the current regulation model of mammalian spermatogenesis includes the action of peptide paracrine factors secreted by testis. These proteins are different in nature comprising growth factors, cytokines and proto-oncogenes. They influence both proliferation and differentiation of seminiferous epithelium together with androgen synthesis. As mediators of communication between somatic and germinal cells the paracrine factors modulate the cell response to pituitary hormones.

Key words: spermatogenesis, steroidogenesis, growth factors, cytokines, proto-oncogenes.

*Dofinansowanie pracy: Fundusze na działalność statutową Zakładu Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk.

1. WPROWADZENIE

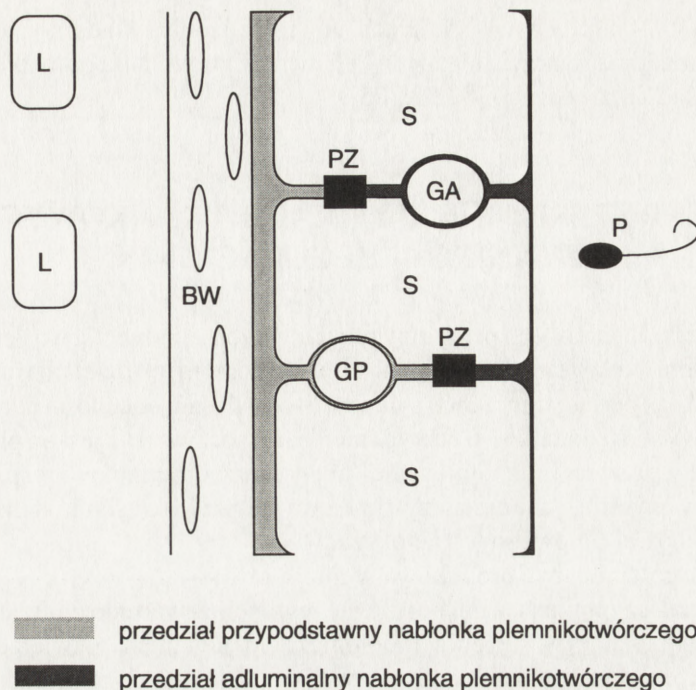
Prawidłowe funkcjonowanie męskiego układu rozrodczego ssaków wymaga stałej aktywności mejotycznej nabłonka plemnikotwórczego w ciągu całego okresu dojrzałości płciowej osobnika. Komórki prekursorowe gamet oraz plemniki różnią się od komórek somatycznych nie tylko zredukowaną liczbą chromosomów, ale także odmiennym składem antygenowym i wymaganiami metabolicznymi.

Specyficzne warunki, jakich wymagają proliferujące komórki gametogeniczne, zapewniają i stabilizują komórki podporowe (Sertoliego). Komórki podporowe pozostają w ścisłym kontakcie z komórkami germinalnymi przez istnienie szeregu połączeń desmosomalnych i typu *nexus*, które ułatwiają międzykomórkową wymianę czynników regulacyjnych i odżywczych. Ponadto komórki Sertoliego łączą się ze sobą poprzez połączenia typu zamykającego (*occludens*), na całej długości nabłonka plemnikotwórczego. Oddzielają one w ten sposób spermatogonia i leptotenowe spermatocyty I rzędu od bezpośrednich prekursorów komórek plemnikowych, tj. spermatocytów I rzędu w zygotenie, spermatocytów II rzędu i spermatyd. Warstwa komórek Sertoliego tworzy barierę krew-jądro dzieląc nabłonek plemnikotwórczy na przedział przypodstawny (peribazalny) i adluminalny (rys. 1). Komórki podporowe nie tylko wybiórczo transportują czynniki regulatorowe i odżywcze do przedziału adluminalnego, ale także przez własną aktywność wydzielniczą stwarzają specyficzne warunki środowiska we wnętrzu kanalika plemnikotwórczego. Między innymi świadczy o tym skład płynu wewnątrzkanalikowego odmienny od składu osocza [19].

Komórki gruczołowe tkanki śródmiąższowej jądra (Leydiga) stanowią także populację komórek niezbędnych dla spermatogenezy. Przez swoją zdolność do produkcji testosteronu utrzymują prawidłową czynność komórek Sertoliego, które mają receptor cytoplazmatyczny dla testosteronu oraz wytwarzają białko wiążące androgeny (ang. ABP – *androgen binding protein*). Jednocześnie komórki Leydiga, po podjęciu swojej funkcji endokrynowej w różnicującym się jądrze, odpowiedzialne są za rozwój, a następnie utrzymanie w okresie dojrzałości, II- i III-rzędowych męskich cech płciowych [68].

Stosunkowo dobrze poznanym elementem regulacji spermatogenezy jest kontrola czynności jądra przez hormony przysadkowe [7]. Synteza testosteronu przez komórki Leydiga pozostaje w ujemnym sprzężeniu zwrotnym z wydzielanym przez przedni płat przysadki mózgowej hormonem luteotropowym (LH). LH oddziałuje na komórki Leydiga dzięki obecności na ich powierzchni receptora dla luteotropiny. Kompleks LH z receptorem aktywuje układ cyklicznej adenylozylowej i przez wzrost stężenia cAMP stymuluje proces sterydogenezy [71].

Ośrodkowa regulacja czynności komórek Sertoliego ma bardziej pośredni charakter. Komórki podporowe, w przeciwieństwie do komórek Leydiga, mają na swojej powierzchni receptor dla folikulotropiny (FSH). Połączenie FSH z receptorem zwiększa poprzez cAMP aktywność aromatazy, czego efektem jest podwyższona synteza



Rys. 1. Schemat budowy nabłonka plemnikotwórczego: BW – błona własna kanała krętego z komórkami peritubularnymi, GP – komórka gametogeniczna przedziału przypodstawnego, GA – komórka gametogeniczna przedziału adluminalnego, L – komórka śródmiąższowa (Leydiga), P – plemnik, S – komórka podporowa (Sertoliego), PZ – połączenie zamykające (*occludens*),

estradiolu z testosteronu w komórkach Sertoliego. Badania na modelu szczurzym wykazały, że wydzielanie FSH przez przysadkę i w konsekwencji wzrost aktywności aromatazy w komórkach Sertoliego osiąga maksimum we wczesnym okresie postnatalnym. W miarę osiągnięcia wieku dojrzałości płciowej zarówno wydzielanie FSH, jak i wrażliwość komórek podporowych na stymulację folikulotropiną ulega znacznemu spadkowi. Spadek aktywności aromatazy związany jest prawdopodobnie ze stopniowym dojrzewaniem komórek Sertoliego, co wyraża się formowaniem połączeń ścisłych i podjęciem aktywności wydzielniczej do światła kanała. Warto zaznaczyć, że u szczura w okresie dojrzałości płciowej prawidłowa spermatogeneza zależna jest od obecności LH, a nawet samego testosteronu. W przypadku innych gatunków (także człowieka) do utrzymania właściwej aktywności nabłonka plemnikotwórczego niezbędny jest obok LH także FSH. Prawdopodobnie FSH jest u tych gatunków niezbędny do prawidłowego funkcjonowania komórek Sertoliego, a pośrednio komórek gametogenicznych [80,83].

O ile regulacja spermatogenezy na osi przysadka-jądro jest stosunkowo dobrze poznana, tak wiedza na temat lokalnych mechanizmów regulacji funkcji jądra zaczęła

się rozszerzać dopiero w ostatnich latach. Już teraz jednak wiadomo, że miejscowe czynniki regulacyjne stanowią niezbędny element w utrzymaniu prawidłowej funkcji męskiego układu rozrodczego [82,92,105].

2. KRYTERIA IDENTYFIKACJI TKANKOWYCH CZYNNIKÓW REGULACYJNYCH

Identyfikacja tkankowych peptydów regulacyjnych stanowi dla eksperymentatora trudny problem badawczy ze względu na niski poziom wydzielania miejscowych regulatorów oraz periodyczność ich syntezy. Stwierdzenie obecności danego czynnika w tkance wymaga dodatkowo udowodnienia, iż rzeczywiście jest on produkowany lokalnie i ma wpływ na funkcjonowanie danego narządu. Findlay i wsp. [26] zaproponowali trzy kryteria, jakimi należy się kierować przy określaniu danego peptydu jako czynnika parakrynowego lub autokrynowego:

I. Czynn timer powinien być produkowany miejscowo.

II. Produkcja czynn timer powinna podlegać regulacji w warunkach fizjologicznych.

III. Czynn timer będąc w stężeniu fizjologicznym powinien wywierać wpływ na sąsiadujące komórki (działanie parakrynowe) lub na komórkę go produkującą (działanie autokrynowe).

Czynn timer spełniające wyżej wymienione kryteria można następnie podzielić na trzy typy pod względem spełnianej funkcji [87]:

I. Regulacyjne – działające jako sygnały międzykomórkowe i wewnątrzkomórkowe [37],

II. Środowiskowe – biorące udział w tworzeniu specyficznych substancji międzykomórkowych,

III. Odżywcze – dostarczające komórkom substancji energetycznych i jonów.

Przedmiotem dalszych rozważań będą peptydowe czynn timer regulacyjne wydzielane w obrębie gonady męskiej ze szczególnym uwzględnieniem czynników wzrostu, cytokin i produktów białkowych, tzw. onkogenów.

3. CZYNNIKI WZROSTU

Jądrem jest miejscem syntezy szeregu tkankowo specyficznych czynników wzrostowych, do których zaliczamy substancję hamującą rozwój przewodu Müllera, plemnikotwórczy czynnik wzrostu oraz czynnik wydzielany przez komórki peritubularne, modulujący funkcje komórek Sertoliego (czynnik P-Mod-S). Oprócz nich w męskim układzie rozrodczym stwierdza się obecność czynników wzrostu wcześniej scharakteryzowanych w innych tkankach organizmu ssaków (TGF, IGF, FGF, EGF)

[44]. Jednak niezależnie od stopnia specyficzności tkankowej czynniki wzrostu obecne w jądrze wykazują stymulujący wpływ na aktywność podziałową, wzrost i różnicowanie komórek oraz angiogenezę.

3.1. TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU TYPU β (TGF β)

Struktura. Transformujący czynnik wzrostu typu β (ang. TGF β – *transforming growth factor* β) jest peptydem występującym w pięciu odmianach (TGF β 1– β 5) o wysokim stopniu homologii sekwencji aminokwasowej i podobnej aktywności biologicznej [12]. Wszystkie formy TGF β są peptydami o masie cząsteczkowej 25 kDa, złożonymi z dwóch identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 12,5 kDa (112 aminokwasów). Każdy z monomerów zawiera dziewięć reszt cysteinowych tworzących mostki dwusiarczkowe między oboma podjednostkami TGF β [21]. Rodzina TGF β jest z kolei członkiem tzw. superrodziny TGF β , do której należy między innymi rodzina genów DVR (ang. DVR – *decapentaplegic-Vg-related*) [52], gen dla substancji hamującej rozwój przewodu Müllera (ang. MIS – *Müllerian inhibiting substance*) oraz geny dla inhibiny i aktywiny, które produkowane w jądrze, modułują wydzielanie FSH przez przysadkę [56].

Lokalizacja. Obecność mRNA dla TGF β 1 i TGF β 3 została stwierdzona zarówno w embrionalnym, jak i dojrzałym jądrze u myszy, również w przypadku wrodzonego braku komórek gametogenicznych [109]. Stanowi to przesłankę, iż TGF β produkowany jest w komórkach somatycznych myszy. Potwierdzają to inne doniesienia, w których wykazano obecność mRNA dla TGF β 1 w komórkach Sertoliego, a także w komórkach peritubularnych wchodzących w skład błony własnej kanalika plemnikotwórczego [59,87].

Funkcja. Badania *in vitro* uwidoczniły wpływ TGF β na wzrost kurczliwości komórek peritubularnych i zmianę ich kształtu [1]. Obecność TGF β wywołuje spadek ekspresji mRNA dla tkankowego aktywatora plazminogenu i wzrost syntezy mRNA dla inhibitora aktywatora plazminogenu w szczurzych komórkach Sertoliego hodowanych *in vitro*. Takie działanie TGF β sugeruje jego regulacyjny wpływ na poziom proteaz w kanaliku plemnikotwórczym oraz na kurczliwość kanalika, co może mieć istotne znaczenie dla procesu przemieszczania różnicujących się komórek w kierunku światła kanalika [63]. Dodatkowo TGF β oddziałuje na produkcję mleczanu i aktywność aromatazy w niedojrzałych komórkach Sertoliego, co wskazuje na rolę TGF β w oddziaływaniach pomiędzy komórkami Sertoliego a komórkami germinalnymi [59].

TGF β reguluje także funkcjonowanie komórek Leydiga. TGF β może łączyć się ze strukturami powierzchniowymi komórek Leydiga i hamować ich sterydogenezę po stymulacji gonadotropiną kosmówkową (hCG) w hodowli *in vitro* [2,3,47]. Morera i wsp. [61] wykazali, że TGF β wykazuje zależne od dawki oddziaływanie na produkcję androgenów przez komórki Leydiga. Przy niskich stężeniach TGF β wykazuje działanie aktywujące, natomiast przy wysokiej koncentracji staje się inhibitorem

sterydogenezy. TGF β obniża także wiązanie LH i hCG z komórkami Leydiga oraz hamuje syntezę cAMP po stymulacji hCG [2,3,47].

Podsumowując, TGF β może modulować odpowiedź komórek Leydiga na gonadotropiny, pośredniczyć w komunikacji pomiędzy komórkami Sertoliego i komórkami gametogenicznymi oraz uczestniczyć w zmianach strukturalnych proliferującego nabłonka plemnikotwórczego.

3.2. HORMON ANTYMÜLLEROWSKI (MIS)

Struktura. Hormon antymüllerowski lub inaczej czynnik lityczny dla przewodów okołosródniczych (Müllera) (ang. MIS – *Müllerian-inhibiting substance*) jest glikoproteiną o masie cząsteczkowej ok. 140 kDa, składającej się z dwóch identycznych podjednostek (m.cz. 70 kDa) powiązanych parą mostków dwusiarczkowych [39]. Analiza sekwencji cDNA i DNA genomowego wykazała, iż odcinek karboksylowy cząsteczki MIS wykazuje homologię z TGF β [16]. Potwierdza to doniesienie Pepinsky i wsp. [72], którzy trawiąc białko MIS plazminą, uzyskali fragment podobny do TGF β .

Lokalizacja. Miejscem syntezy MIS zarówno w okresie pre-, jak i postnatalnym są komórki Sertoliego [81].

Funkcja. MIS odpowiedzialny jest za regresję przewodu Müllera w zarodku płci męskiej [39]. Gen dla MIS aktywowany jest prawdopodobnie przez produkt genu SRY (ang. SRY – *sex-determining region of Y*), odpowiedzialnego za różnicowanie się pierwotnej gonady płodowej w kierunku jądra [81]. W okresie poprzedzającym dojrzałość płciową, MIS jest częściowo odpowiedzialny za hamowanie aktywności mejotycznej spermatogonii [98]. Niezbędność FSH (u niektórych gatunków) dla prawidłowej spermatogenezy w okresie dojrzałości płciowej można wiązać z faktem, iż hormon folikulotropowy hamuje syntezę MIS w komórkach Sertoliego pozwalając na prawidłowy przebieg podziałów mejotycznych komórek germinalnych [81].

3.3. NASKÓRKOWY CZYNNIK WZROSTU (EGF)

I TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU TYPU α (TGF α)

Struktura. Naskórkowy czynnik wzrostu (ang. EGF – *epidermal growth factor*) został po raz pierwszy wyizolowany z mysiej ślinianki podżuchwowej i scharakteryzowany jako stymulator proliferacji komórek pochodzenia nabłonkowego. EGF jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym złożonym z 53 aminokwasów, między którymi występują trzy mostki dwusiarczkowe [11].

Transformujący czynnik wzrostu typu α (ang. TGF α – *transforming growth factor α*) jest także pojedynczym, 50-aminokwasowym polipeptydem wykazującym wysoką homologię z EGF. Podobieństwo pomiędzy EGF i TGF α wyraża się zarówno obecnością identycznej, 21-aminokwasowej sekwencji w łańcuchu polipeptydowym, jak i powinowactwem tych cząsteczek do tego samego receptora [22].

Lokalizacja. Czynniki o aktywności podobnej do EGF i TGF α zostały wyizolowane z medium hodowlanego szczurzych komórek Sertoliego [36]. Ponadto stwierdzono obecność mRNA dla TGF α w hodowanych *in vitro* komórkach peritubularnych i Sertoliego [87]. Teerds i wsp. [99] potwierdzili obecność TGF α w jądrze szczura przy wykorzystaniu technik immunocytochemii, z zastosowaniem przeciwciała monoklonalnego anty-TGF α nie wykazującego reakcji krzyżowej z EGF. TGF α został zlokalizowany w obrębie komórek Leydiga pochodzących zarówno od osobników 21-dniowych, jak i dojrzałych płciowo. Pozytywny sygnał uzyskano także z hodowli komórek peritubularnych, z jąder 21-dniowych szczurów. Brak immunoreaktywności stwierdzono natomiast ze strony komórek Sertoliego i komórek gametogenicznych.

Funkcja. EGF stymuluje wzrost linii komórkowych wywodzących się z komórek Sertoliego (TM4) [10] i komórek Leydiga (TM3) [54]. Wykazano także, że hodowane *in vitro*, niedojrzałe komórki Leydiga świni, po uprzedniej stymulacji PGF2a i hCG, reagują na EGF przez wzrost syntezy testosteronu [55]. Pozytywny efekt EGF na produkcję testosteronu przez komórki Leydiga został także potwierdzony u myszy [62] oraz u człowieka [95]. Aktywację sterydogenezy przez EGF tłumaczy się wzrostem liczby receptorów dla LH na powierzchni komórek Leydiga [62]. EGF oddziałuje także na komórki Sertoliego i germinalne. W warunkach *in vitro* szczurze komórki Sertoliego reagują na EGF przez wzrost produkcji transferyny [73]. W przypadku hodowli fragmentów kanalików krętych, EGF hamuje różnicowanie spermatogonii zaindukowane przez obecność FSH w medium. Brak stymulacji przez FSH wywołuje efekt odwrotny – EGF inicjuje proces różnicowania spermatogonii [34].

Receptory. Obecność receptorów dla EGF potwierdzono w tkance interstycjalnej jądra ludzkiego [93], a także w małpich i szczurzych komórkach Leydiga i Sertoliego [79,94].

Dotychczasowe doniesienia świadczą o znaczącym udziale EGF i TGF α w regulacji funkcji komórek Leydiga. Dane dotyczące komórek Sertoliego są bardziej kontrowersyjne. Wydaje się jednak, że komórki Sertoliego są miejscem produkcji TGF α mając jednocześnie receptory dla EGF/TGF α . Nadal brak jednoznacznego potwierdzenia, że jądro jest miejscem syntezy EGF. W związku z tym sugeruje się, że lokalnie produkowany TGF α współdziała z EGF pochodzącym z krążenia obwodowego. O znaczeniu EGF produkowanego na obwodzie świadczy obserwacja, iż u myszy po usunięciu ślinianek podżuchwowych następuje odwracalne zakłócenie przebiegu spermatogenezy pod postacią spadku liczby spermatyd w nabłonku plemnikotwórczym i ilości dojrzałych plemników w najądrzu [101].

3.4. INSULINO-PODOBNE CZYNNIKI WZROSTU (IGFs)

Struktura. Insulino-podobny czynnik wzrostu I (ang. IGF I – *insulin-like growth factor I*) oraz insulino-podobny czynnik wzrostu II (IGF II) są pojedynczymi polipeptydami składającymi się odpowiednio z 70 i 67 aminokwasów. Sekwencja amino-

kwasowa IGFs wykazuje 43% (IGF I) i 41% (IGF II) homologii z cząsteczką proinsuliny. Czynniki insulinopodobne mają, podobnie jak proinsulina domeny A,B,C oraz dodatkową domenę D. W przeciwieństwie jednak do insuliny (dimer złożony z łańcuchów A i B), IGFs zachowują w procesie dojrzewania domenę C i D, przez co w stanie natywnym pozostają pojedynczą cząsteczką. IGF I i IGF II cechuje 62% wzajemnej homologii, z jednoczesną międzygatunkową niezmiennością sekwencji aminokwasowej. Ewolucyjna konserwatywność sekwencji IGFs i ich podobieństwo do insuliny sugeruje pochodzenie genów dla tych białek od wspólnego prągu [20].

Lokalizacja. Badania *in vitro* dowodzą, że w jądrze świni głównym miejscem syntezy IGF I są komórki Sertoliego, a w mniejszym stopniu komórki Leydiga [64]. Jednocześnie w przypadku wspólnych hodowli komórek Sertoliego i Leydiga obserwuje się wzmożoną syntezę IGF I, znacznie przekraczającą poziom notowany w monokulturach tych komórek [13,64]. Sugeruje to istotną rolę IGF I w interakcjach pomiędzy komórkami Leydiga i Sertoliego. Obecność IGF I stwierdzono także w szczurzych pachytenowych spermatocytach, co może wskazywać na regulacyjny udział IGF I w procesie mejozy komórek gametogenicznych [100].

Podobnie jak w przypadku regulacji poziomu IGF I w surowicy przez hormon wzrostu (ang. GH – *growth hormone*), zaobserwowano stymulujący efekt somatotropiny na produkcję IGF I w jądrze. Komórki Leydiga reagują na obecność GH zwiększeniem ekspresji mRNA dla IGF I [49], natomiast poziom syntezy IGF I w jądrach szczurów, niezdolnych do produkcji hormonu wzrostu, jest wyraźnie obniżony [91]. Wydzielanie IGF I przez komórki Sertoliego i Leydiga jest także modulowane przez FSH (k. Sertoliego) i LH (k. Leydiga) [13,64] oraz retinol [4] i prolaktynę [18].

Odrębnego omówienia wymagają dane dotyczące ekspresji IGFs w jądrze ludzkim. Zhou i wsp. [111] stosując metodę hybrydyzacji *in situ* stwierdzili brak ekspresji mRNA dla IGF I, natomiast mRNA dla IGF II został zlokalizowany w śródbłonku i przydanie naczyń jądrowych. Autorzy sugerują, iż IGF I, którego obecność została wcześniej wykazana immunohistochemicznie w komórkach Sertoliego, Leydiga i spermatocytach I rzędu [103], pochodzi z krążenia obwodowego i jest następnie kumulowany we wnętrzu kanalika dzięki obecności receptorów dla IGF I na komórkach nabłonka plemnikotwórczego. Powyższe dane wyraźnie dowodzą, iż profil ekspresji IGFs w jądrze człowieka ma odrębny charakter niż u pozostałych ssaków.

Receptory. Borland i wsp. [9] badając błony komórkowe oraz całe komórki Sertoliego wykazali na ich powierzchni obecność specyficznych receptorów dla IGF I. Receptory takie stwierdzono także na komórkach Leydiga i w homogenatach jądrowych [33]. W okresie dojrzewania płciowego w jądrze szczura ilość receptorów dla IGF I wzrasta sześciokrotnie [66]. Ekspresja receptorów na powierzchni komórek Leydiga ulega wyraźnemu zwiększeniu pod wpływem hCG (ang. hCG – *human chorionic gonadotropin*) zarówno w warunkach *in vitro* [74], jak i *in vivo* [46]. Jednocześnie obecność IGF I w hodowli komórek Leydiga wywołuje wzrost ekspresji

receptora dla hCG. Wydaje się więc, że IGF jest istotnym elementem pośredniczącym w regulacji sterydogenezy przez gonadotropiny.

Ludzkie komórki Sertoliego oraz spermatocyty I rzędu wykazują wysoką ekspresję mRNA zarówno dla receptora IGF I, jak i IGF II [111]. Obecność receptora dla IGF II jest szczególnie interesująca ze względu na jego specyficzne cechy. W przeciwieństwie do receptora dla IGF I i insuliny jest on pojedynczym polipeptydem nie wykazującym aktywności kinazowej i nie wiążącym insuliny. Natomiast wykazuje wysoką homologię do receptora mannozo-6-fosforanu (R-Man-6-P), który bierze udział w transporcie powstałych *de novo* białek, do lizosomów [106]. Stąd też sugeruje się podwójną rolę receptora dla IGF II w spermatogenezie człowieka:

(i) Pozostając w koekspresji z receptorem IGF I bierze udział w wiązaniu IGFs produkowanych poza kanalikiem plemnikotwórczym (obwodowo – IGF I lub lokalnie – IGF II).

(ii) Uczestniczy w prawidłowej dystrybucji enzymów lizosomalnych w obrębie różnicujących się komórek gametogenicznych [111].

Funkcja. Komórki Sertoliego hodowane *in vitro* reagują na obecność IGF I wzrostem transportu glukozy do wnętrza komórki i zwiększoną produkcją kwasu mlekowego [67]. IGF I stymuluje także proliferację i syntezę DNA w komórkach Sertoliego, jednak nie powoduje zwiększenia ilości receptorów dla FSH ani FSH-zależnego wzrostu cAMP [38].

W przypadku komórek Leydiga, IGF I w warunkach *in vitro*, intensyfikuje proces syntezy cAMP i testosteronu zarówno na poziomie podstawowym, jak i po stymulacji hCG [17,40]. Stymulacja sterydogenezy pod wpływem samego cAMP zostaje dodatkowo podwyższona po dodaniu do hodowli komórek Leydiga IGF I [48]. Tak więc IGF I może wzmacniać działanie hCG/LH zarówno na poziomie interakcji gonadotropina-receptor (np. poprzez wzrost ilości receptorów dla LH na powierzchni komórek Leydiga [6,60,74]), jak i na dalszych etapach cAMP-zależnej kaskady reakcji.

3.5. FIBROBLASTYCZNE CZYNNIKI WZROSTU

Struktura. Rodzinę fibroblastycznych czynników wzrostu (ang. FGFs – *fibroblast growth factors*) tworzą dwie grupy polipeptydów, które łączy homologia sekwencji aminokwasowej. Pierwsza grupa (INT2 – *integration region*, HST – *human stomach cancer*, FGF5, FGF6, KGF – *keratinocyte growth factor*), mając charakter białek onkogenowych, bierze udział w procesie embriogenezy, a warunkach patologicznych we wzroście nowotworowym. Drugą grupę stanowią kwaśny fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. aFGF – *acidic FGF*) i zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. bFGF – *basic FGF*). Charakteryzuje je wysoki stopień homologii sekwencji aminokwasowej (55%) oraz zdolność do wiązania się z heparyną [43]. Dodatkowym elementem charakterystycznym jest brak sekwencji sygnałowej w genach dla aFGF i bFGF. Ponadto bFGF wykazuje znaczne podobieństwo struktury

przestrzennej do cząsteczki interleukiny 1 β (IL-1 β), mimo niewielkiej homologii sekwencji (10%) [23].

Lokalizacja. Obecność bFGF stwierdzono zarówno w jądrze bydłęcym [102], jak i u gryzoni [57]. Badania na modelu szczurzym świadczą o zmienności wydzielania bFGF w jądrze w zależności od fazy rozwojowej osobnika. W czasie embriogenezy miejscem syntezy bFGF są komórki Leydiga, komórki peritubularne oraz komórki błony podstawnej sznurów płciowych [28]. Profil syntezy ulega zmianie we wczesnym okresie pourodzeniowym, w którym bFGF stwierdza się w obrębie gonocytów. U dorosłych osobników bFGF produkowany jest głównie przez pachytenowe spermatocyty i spermatogonie typu A [57]. Dotychczas brak dowodów doświadczalnych na obecność aFGF w jądrze ssaków.

Funkcja. Szereg doniesień wskazuje na regulacyjną rolę bFGF w procesie sterydogenezy w komórkach Leydiga oraz jego wpływ na proliferację i różnicowanie komórek Sertoliego. Dane dotyczące funkcji bFGF jako modulatora syntezy testosteronu są kontrowersyjne. Komórki Leydiga pochodzące z niedojrzałych jąder szczura reagują na obecność bFGF spadkiem stymulowanej przez LH i cAMP produkcji testosteronu [24]. Z drugiej strony Sordoillet i wsp. [90] stwierdzili stymulujący efekt bFGF na podstawową i hCG-zależną sterydogenezę w świńskich komórkach Leydiga hodowanych *in vitro*.

W przypadku komórek Sertoliego charakterystyczna jest wielostronność oddziaływań bFGF. Indukuje on syntezę DNA, proliferację oraz wzrost wydzielania aktywatora plazminogenu przez komórki Sertoliego izolowane z niedojrzałych jąder szczura. Co więcej efektywność oddziaływania bFGF zwiększa się w obecności insuliny i IGF I [38]. Jednocześnie, dodanie do hodowli folikulotropiny znosi stymulujący efekt bFGF. Wynika stąd, że wpływ bFGF na funkcje komórek Sertoliego jest wypadkową jego interakcji z pozostałymi czynnikami wzrostu i FSH.

3.6. PLEMNIKOTWÓRCZY CZYNNIK WZROSTU (SGF)

Plemnikiotwórczy czynnik wzrostu (ang. SGF – *seminiferous growth factor*) jest kwaśnym białkiem o masie 15–16,5 kDa, które ma zdolność do wiązania się z heparyną [5]. SGF wykazuje więc chemiczne podobieństwo do kwaśnego i zasadowego fibroblastycznego czynnika wzrostu. Jednocześnie jednak różni się od FGFs pod względem immunoreaktywności i wpływu na wzrost i aktywność wydzielniczą komórek linii TM4 (pochodząca z komórek Sertoliego) oraz linii TM3 wyprowadzonej z komórek Leydiga [110].

SGF jest produkowany we wnętrzu kanalika plemnikiotwórczego, prawdopodobnie przez komórki Sertoliego. Czynniki ten stymuluje proliferację zarówno komórek Sertoliego izolowanych z niedojrzałych jąder różnych gatunków ssaków, jak i komórek linii TM4. Efekt mitogenny obserwowano także w przypadku komórek śród-błonka naczyniowego i komórek Leydiga pochodzących z linii TM3.

Mimo ograniczonej liczby danych o plemnikotwórczym czynniku wzrostu można przypuszczać, że ze względu na swoje właściwości mitogenne i naczyniotwórcze jest on ważnym elementem parakrynowym w okresie rozwoju jądra.

3.7. BIAŁKO PRODUKOWANE PRZEZ KOMÓRKI PERITUBULARNE, KTÓRE MODULUJE FUNKCJE KOMÓREK SERTOLIEGO

Od wielu lat przypuszczano, że błona własna kanalika krętego jest nie tylko fizyczną barierą oddzielającą nabłonek plemnikotwórczy od tkanki śródmiąższowej jądra, ale także spełnia funkcje pośredniczące w wymianie sygnałów pomiędzy komórkami Leydiga i Sertoliego. W 1985 r. Skinner i Fritz [86] donieśli, iż główny komponent komórkowy błony własnej, komórki peritubularne (patrz rys. 1), wydzielają substancję, która *in vitro* stymuluje komórki Sertoliego do produkcji transferyny i białka wiążącego androgeny (ang. ABP – *androgen-binding protein*)¹. Odkrytą substancję autorzy określili skrótem P-Mod-S oznaczającym białko produkowane przez komórki peritubularne, które moduluje funkcje komórek Sertoliego (ang. P-Mod-S – *protein produced by peritubular cells (P), that modulates (Mod) the functions of Sertoli cells (S)*). Wykazano, że wydzielanie P-Mod-S przez komórki peritubularne wzrasta pod wpływem testosteronu, natomiast nie zmienia się w obecności 17 β -estradiolu.

Dalsza analiza wykazała, że P-Mod-S tworzą dwa białka o masie 56 kDa (P-Mod-S(A)) i 59 kDa (P-Mod-S(B)), o podobnych właściwościach biologicznych. Komórki Sertoliego poddane działaniu oczyszczonego białka P-Mod-S reagowały niespotykanym w przypadku innych czynników (włączając FSH) wzrostem produkcji transferyny i ABP [85]. Porównywalny poziom stymulacji komórek Sertoliego udało osiągnąć dopiero po łącznym zastosowaniu FSH, insuliny, retinolu i testosteronu [65]. Dodanie do tej kombinacji czynników białka P-Mod-S powodowało dalszy wzrost syntezy protein markerowych. Poszukując mechanizmu działania P-Mod-S ustalono, że czynnik ten wywołuje wzrost cyklicznego GMP w komórce. Wydaje się więc, że synergistyczne działanie FSH/insuliny oraz P-Mod-S odbywa się dzięki jednoczesnemu wzrostowi poziomu cAMP i cGMP w komórce [65].

Biorąc pod uwagę zależność syntezy P-Mod-S od testosteronu i znaczący wpływ tego czynnika na komórki podporowe można przypuszczać, że komórki peritubularne pełnią kluczową rolę w modulowaniu interakcji pomiędzy komórkami Leydiga i Sertoliego.

¹Poziom syntezy transferyny i białka wiążącego androgeny (ABP) jest markerem stanu czynnościowego komórek Sertoliego.

4. CZYNNIKI IMMUNOREGULATOROWE

Coraz więcej doniesień wskazuje, że interleukiny mają modulujący wpływ na aktywność komórek układu rozrodczego. Dotyczy to między innymi procesu steroidogenezy komórek Leydiga i syntezy DNA w różnicujących się komórkach gametogenicznych.

Źródłem cytokin w jądrze mogą być zarówno limfocyty pochodzące z krążenia obwodowego, jak i rezydualna populacja makrofagów, które stanowią ok. 20% komórek tkanki śródmiąższowej jądra. Jednocześnie wiele danych wskazuje, że przynajmniej jedna z cytokin, interleukina 1, może być produkowana przez komórki nabłonka plemnikotwórczego i Leydiga.

4.1. JĄDROWA INTERLEUKINA 1 (tIL-1)

Struktura. Ekstrakty jądrowe szczura i człowieka stymulują mysie tymocyty do proliferacji w sposób zbliżony do interleukiny 1 produkowanej przez makrofagi obwodowe [89]. Chociaż dokładna struktura jądrowej interleukiny 1 (ang. tIL-1 – *testicular interleukin 1*) jest nieznana, masa cząsteczkowa (17 kDa) i kwasowy punkt izoelektryczny (pI=5,7) wskazują na jej podobieństwo do IL-1 typu α [29].

Lokalizacja. Eksperymenty *in vitro* sugerują, że tIL-1 produkowana jest we wnętrzu kanalik plemnikotwórczego [96]. Utrzymująca się aktywność tIL-1 w jądrach sztucznie pozbawionych komórek germinalnych wskazuje komórki Sertoliego jako miejsce syntezy tej cytokiny. Potwierdza to także fakt, iż makrofagi jądrowe nie uczestniczą, u szczura, w wydzielaniu tIL-1 [76]. Ekstrakty pochodzące z komórek tkanki śródmiąższowej jądra oraz media z hodowli komórek peritubularnych i Leydiga nie wykazują aktywności charakterystycznej dla interleukiny 1. Wydaje się jednak, że komórki Leydiga są potencjalnie zdolne do produkcji IL-1. Wskazuje na to indukcja ekspresji mRNA dla IL-1 α i IL-1 β w komórkach Leydiga po dodaniu do medium hodowlanego wzrastających dawek IL-1 β [50,108].

Funkcja. Obserwacja stopniowego wzrostu poziomu jądrowej IL-1 w miarę dojrzewania płciowego szczura, aż do osiągnięcia maksymalnej ekspresji w okresie dojrzałości płciowej, sugeruje istotną rolę tej cytokiny w prawidłowym różnicowaniu i proliferacji nabłonka plemnikotwórczego [96]. Wprowadzenie ludzkiej, rekombinowanej interleukiny typu α (rhIL-1 α) bezpośrednio do jąder szczurów pozbawionych przysadki wywołuje wzrost syntezy DNA w spermatogoniach [75]. Zauważono także, że podwyższony poziom endogennej IL-1 w obrębie poszczególnych stadiów rozwojowych nabłonka plemnikotwórczego koreluje ze zwiększoną syntezą DNA w komórkach germinalnych [70,88]. Potwierdziły to także doświadczenia Hakovirty i wsp. [31], którzy obserwując regenerację nabłonka plemnikotwórczego szczura indukowaną ekspozycją jąder na promieniowanie Roentgena, zanotowali zwiększoną aktywność

ność interleukiny 1 w odcinkach kanalików nasiennych zawierających dzielące się spermatogonie.

W przypadku komórek Sertoliego, tIL-1 wywołuje spadek FSH-zależnej aktywności aromatazy i poziomu cAMP [42]. Efekt hamujący w tych doświadczeniach uzyskiwano z zastosowaniem ludzkiej rekombinowanej IL-1 β , natomiast przy użyciu IL-1 typu α notowano brak inhibicji. Co ciekawe, jednoczesne podanie obu typów interleukiny (IL-1 α i IL-1 β) zwielokrotniało efekt hamujący. Można więc przypuszczać, że zjawisko stopniowego spadku reaktywności komórek Sertoliego na FSH w okresie dojrzewania płciowego szczura (patrz rozdz. 1) wiąże się ze wzrostem ekspresji interleukiny 1 w nabłonku plemnikotwórczym.

Coraz więcej danych wskazuje, że IL-1 wywiera hamujący wpływ na syntezę testosteronu w komórkach Leydiga zarówno w niedojrzałym [15,25], jak i dojrzałym [58] jądrze szczura. Wśród proponowanych mechanizmów inhibicji wymienia się obniżenie wiązania luteotropiny z komórkami Leydiga, zmniejszenie hCG-zależnej produkcji cAMP [14], hamowanie stymulowanej przez hCG/LH syntezy C19 steroidów poprzez blokowanie aktywności 17 α hydroksylazy [104]. Lin i wsp. [51] sugerują, że IL-1 β może hamować nie tylko syntezę prekursorów testosteronu, ale także cały szlak biosyntezy steroidów. Świadczy o tym obserwowany spadek stymulowanej przez hCG ekspresji mRNA dla enzymu P450scc (ang. P450scc – *cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450*) po ekspozycji szczurzych komórek Leydiga na IL-1 β .

Dane dotyczące wpływu interleukiny 1 na komórki Leydiga sugerują specyficzną odpowiedź tych komórek na poszczególne typy IL-1. W przypadku szczura zahamowanie sterydogenezy uzyskuje się przy wykorzystaniu rhIL-1 β i IL-1 α gryzoni, natomiast brak efektu po zastosowaniu rhIL-1 α . W tkance śródmiąższowej jądra myszy stwierdza się obecność receptorów dla interleukiny 1 typu α nieobecnych w jądrze szczura i świnki morskiej [97]. Ta różnorodność odpowiedzi na poszczególne typy IL-1 może sugerować istnienie tkankowo specyficznych form interleukiny 1 w jądrach ssaków.

4.2. INTERLEUKINA 2 (IL-2) I INTERLEUKINA 6 (IL-6)

Jak dotychczas brak dowodów eksperymentalnych na lokalną produkcję, innych niż IL-1, cytokin w męskim układzie rozrodczym ssaków. Jednak szereg doświadczeń *in vitro* uwidacznia wpływ interleukiny 2 i interleukiny 6 na funkcje komórek Leydiga i Sertoliego. W warunkach *in vivo* miejscem syntezy tych cytokin wydają się być limfocyty obwodowe wnikające do jądra w przebiegu procesów zapalnych.

Komórki Leydiga stymulowane gonadotropiną łożyskową (hCG) reagują na obecność interleukiny 2 spadkiem produkcji cAMP i testosteronu. Mechanizm inhibicji sterydogenezy polega prawdopodobnie na hamowaniu aktywności 17 α hydroksylazy podobnie jak ma miejsce w przypadku interleukiny 1. W przeciwieństwie

jednak do IL-1, interleukina 2 nie obniża wiązania hCG z powierzchnią komórek Leydiga [30].

IL-2 oraz IL-6 modulują także aktywność komórek Sertoliego. Pod wpływem tych cytokin obserwuje się wzrost konstytutywnej produkcji transferyny (TF), a jednocześnie IL-6 wykazuje synergistyczny z folikulotropiną efekt stymulacji syntezy tego białka w komórkach podporowych [8].

5. PROTO-ONKOGENY

Proto-onkogeny stanowią grupę genów, których produkty białkowe stymulują proliferację i różnicowanie komórek podczas embriogenezy oraz w okresie pourodzeniowym w obrębie tkanek aktywnych podziałowo. Wykazano, że część proto-onkogenów stanowią geny dla czynników wzrostu lub ich receptorów. Wiadomo także, iż mutacje w obrębie DNA proto-onkogeny (nazywanego wtedy onkogenem) mogą spowodować jego niekontrolowaną aktywację prowadzącą do rozrostu nowotworowego.

Dokładna rola fizjologiczna większości proto-onkogenów pozostaje jednak nadal nieznana. Związek aktywności transkrypcyjnej proto-onkogenów z dzielącymi się komórkami wskazuje, że także nabłonek plemnikotwórczy jest miejscem syntezy białek onkogenowych.

Propst i Vande Woude [78] badając ekspresję proto-onkogeny c-mos w różnych tkankach myszy stwierdzili, że jego aktywność ogranicza się do jąder, jajników i tkanki embrionalnej. mRNA genu c-mos wykazuje tkankowo specyficzny polimorfizm długości wynikający z różnych miejsc inicjacji transkrypcji w poszczególnych typach komórek [77]. W przypadku jądra myszy mRNA dla c-mos obecny jest w postmeiotycznych spermatocytach i okrągłych spermatydach [27]. W obrębie mysich komórek germinalnych stwierdza się także białkowy produkt tego genu o masie cz. 45 kDa [35]. Z uwagi na ograniczoną do haploidalnych komórek gametogenicznych aktywność c-mos, jego rola jest prawdopodobnie związana z końcowymi fazami dojrzewania komórek plemnikowych.

Badania z ostatnich lat wskazują, że jądro jest miejscem syntezy wielu innych proto-onkogenów. Stosunkowo dobrze poznany jest proto-onkogen c-kit, którego aktywność wydaje się niezbędna dla prawidłowego rozwoju jąder w okresie pre- i postnatalnym. U myszy mających zmutowany gen c-kit stwierdza się zaburzenia rozwoju kanalików plemnikotwórczych z uwagi na zubożenie pierwotnych komórek płciowych w jądrze [45]. Jednocześnie u normalnych myszy, w pierwszych dniach po urodzeniu, białko c-kit można zlokalizować w częściach przypodstawnych komórek Sertoliego, które kontaktują się ze spermatogoniami typu A stanowiącymi komórki macierzyste nabłonka plemnikotwórczego [53]. Tak więc prawidłowa ekspresja genu c-kit jest jednym z elementów warunkujących inicjację procesu spermatogenezy.

Proto-onkogeny z rodziny raf prezentują specyficzny komórkowo model ekspresji w jądrze. Gen A-raf wykazuje aktywność w komórkach somatycznych jądra, ze szczególnie wysokim poziomem w komórkach Leydiga. Natomiast dwa różne pod względem długości transkrypty genu B-raf stwierdza się w pachytenowych spermatocytach (długość mRNA – 4,0 kz) oraz w spermatydach (2,6 kz). Z kolei proto-onkogen c-raf-1 pozostaje aktywny zarówno w komórkach somatycznych, jak i germinalnych z najwyższym poziomem ekspresji w spermatocytach pachytenowych [107]. Ten charakterystyczny wzór transkrypcyjny sugeruje udział genów raf w spermatogenezie i androgenezie.

Podobnie jak w przypadku genu c-mos także aktywność proto-onkogeny int-1 ogranicza się do postmeiotycznych stadiów różnicowania nabłonka plemnikotwórczego [84]. Jednocześnie ekspresji int-1 nie stwierdza się w innych tkankach organizmu z wyjątkiem komórek cewy nerwowej w okresie embrionalnym [69].

Przejęciowy charakter aktywności proto-onkogenów w obrębie określonych stadiów różnicowania nabłonka plemnikotwórczego kontrastuje z bardziej konstytutywnym modelem ekspresji, jaki w jądrze wykazują czynniki wzrostu. Drugim elementem różnicującym jest tkankowo-specyficzny profil transkrypcyjny proto-onkogenów pod względem struktury mRNA. W przypadku czynników wzrostu nie zdefiniowano jak dotychczas unikalnego dla jądra modelu transkrypcji. Jednak mimo istniejących odrębności genetycznych, podobieństwo proto-onkogenów i czynników wzrostu sugeruje ich wzajemne powiązanie w utrzymaniu prawidłowych funkcji jądra [32].

6. PODSUMOWANIE

Mimo sporej ilości danych dotyczących parakrynowych czynników regulacyjnych w męskim układzie rozrodczym (tab. 1) nadal brak jednolitego modelu ich wzajemnego współdziałania w procesie kontroli spermatogenezy. Odmiennie właściwości biologiczne poszczególnych czynników stwarzają problemy przy próbach jednoczesnej obserwacji ich działania, szczególnie w układach *in vivo*. Perspektywy kompleksowej oceny ekspresji tych peptydów na poziomie mRNA stwarza szybki rozwój techniki hybrydyzacji *in situ*. Obecnie metoda ta pozwala na jednoczesne wykorzystanie wielu sond hybrydyzacyjnych, co umożliwi obserwację ekspresji kilku czynników na pojedynczym skrawku histologicznym. Zmodyfikowane wersje tej techniki pozwalają także na ocenę ilościową badanego mRNA, co ułatwia analizę porównawczą w różnych typach komórek.

Większość informacji związanych z lokalną regulacją czynności jądra pochodzi z modeli szczurzych i mysich. Liczba doniesień dotyczących układu ludzkiego jest stosunkowo niewielka, co wiąże się z trudnościami technicznymi przy izolacji i hodowli komórek somatycznych i germinalnych jądra. Jednocześnie duży problem stanowi ekstrapolacja wyników uzyskanych z układów zwierzęcych, na człowieka z

TABELA 1. Czynniki parakrynowe w męskim układzie rozrodczym

Czynnik	Komórki		Działanie
	produkujące	docelowe	
TGF β	k. Sertoliego k. peritubularne	k. peritubularne k. Sertoliego k. Leydiga	wzrost kurczliwości spadek syntezy tkankowego aktywatora plazminogenu inhibitor sterydogenezy spadek wiązania hCG/LH
MIS	k. Sertoliego	spermatogonie	hamowanie mejozy
EGF/TGF α	k. Sertoliego k. peritubularne k. Leydiga	k. germinalne k. Sertoliego k. Leydiga	stymulacja różnicowania wzrost syntezy transferyny aktywacja sterydogenezy
IGF I	k. Sertoliego k. Leydiga spermatocyty I rz.	k. Sertoliego	wzrost transportu glukozy i syntezy kwasu mlekowego synteza DNA i proliferacja
IGF II	śródbłonek naczyń	k. Leydiga	wzrost syntezy cAMP i testosteronu
bFGF	spermatocyty I rz. spermatogonie	k. Leydiga k. Sertoliego	modulacja sterydogenezy synteza DNA i proliferacja, wzrost wydzielania tkankowego aktywatora plazminogenu
SGF	k. Sertoliego	k. Sertoliego k. Leydiga k. śródbłonka naczyń	efekt mitogenny
P-Mod-S	k. peritubularne	k. Sertoliego	wzrost syntezy transferyny i ABP
tIL-1	k. Sertoliego	k. germinalne k. Sertoliego k. Leydiga	synteza DNA spadek FSH-zależnej aktywności aromatazy spadek poziomu cAMP hamowanie sterydogenezy
IL-2	?	k. Leydiga k. Sertoliego	hamowanie sterydogenezy wzrost podstawowej syntezy transferyny
IL-6	?	k. Sertoliego	wzrost podstawowej i FSH-zależnej syntezy transferyny
c-mos i int-1	haploidalne k. germinalne		
c-kit	k. Sertoliego	działanie autokrynowe (?)	efekt mitogenny (?)
B-raf i c-raf-1	spermatocyty pachytenowe		
A-raf	k. Leydiga		

Objaśnienia do tabeli na stronie obok.

uwagi na istotne odrębności dotyczące struktury i fizjologii ludzkiego nabłonka plemnikotwórczego [41]. Rozwiązanie problemu lokalnej regulacji funkcji jądra u człowieka stanowi więc kolejne wyzwanie badawcze nie tylko ze względów poznawczych, ale także diagnostycznych i terapeutycznych.

LITERATURA

- [1] AILENBERG M, TUNG PS, FRITZ IB. Transforming growth factor-beta elicits shape changes and increases contractility of testicular peritubular cells. *Biol Reprod* 1990; **42**: 499–509.
- [2] AVALLET O, VIGIER M, CHATELAIN PG, SAEZ JM. Regulation by growth factors of Leydig cell differentiated functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; **40**: 453–464.
- [3] AVALLET O, VIGIER M, PERRARD-SAPORI MH, SAEZ JM. Transforming growth factor β inhibits Leydig cell functions. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 575–581.
- [4] BARTLETT JM, SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. Regulation of insulin-like growth factor I and stage-specific levels of epidermal growth factor in stage synchronized rat testes. *Endocrinology* 1990; **127**: 747–758.
- [5] BELLVE AR, ZHENG W. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil* 1989; **85**: 771–793.
- [6] BERNIER M, CHATELAIN P, MATHER JP, SAEZ JM. Regulation of gonadotropin receptors, gonadotropin responsiveness, and cell multiplication by somatomedin-C and insulin in cultured pig Leydig cells. *J Cell Physiol* 1986; **129**: 257–263.
- [7] BILIŃSKA B. Współczesne poglądy na interakcje międzykomórkowe w gonadzie męskiej ssaków. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 205–220.
- [8] BOECKFOR FR, SCHWARZ LK. Effects of interleukin-6, interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha on transferrin release from Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 1991; **129**: 256–262.
- [9] BORLAND K, MITA M, OPPENHEIMER CL, BLINDERMAN A, MASSAGUE J, HALL PF, CZECH MP. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1984; **114**: 240–246.
- [10] BOTTENSTEIN J, HAYASHI I, HUTCHINGS SH, MASUI H, MATHER J, MCCLURE DB, OKASA S, RIZZINO A, SATO G, SERRORO G, WOLFE R, WU R. The growth of cells in serum-free medium. [w] *Methods in Enzymology*. Jakoby WB, Pastan IH [red.] New York: Academic Press 1979; vol LVIII: 94–109.
- [11] BROWNE CA. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1991; **5**: 553–569.
- [12] BURT DW, PATON IR. Evolutionary origins of the transforming growth factor-beta family. *DNA Cell Biol* 1992; **11**: 497–510.

Objaśnienia do tabeli 1: TGF (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostu; MIS (*müllerian-inhibiting substance*) – hormon antymüllerowski; EGF (*epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu; IGF (*insulin-like growth factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu; bFGF (*basic fibroblast growth factor*) – zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu; SGF (*seminiferous growth factor*) – plemnikotwórczy czynnik wzrostu; P-Mod-S (*protein produced by peritubular cells (P), that modulate (Mod) the functions of Sertoli cells (S)*) – białko produkowane przez komórki peritubularne, które moduluje funkcje komórek Sertoliego; tIL-1 (*testicular interleukin 1*) – jądrowa interleukina 1; IL-2 (*interleukin 2*) – interleukina 2; IL-6 (*interleukin 6*) – interleukina 6

- [13] CAILLEAU J, VERMEIRE S, VERHOEVEN G. Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **69**: 79–89.
- [14] CALKINS JH, GUO H, SIGEL MM, LIN T. Differential effects of recombinant interleukin-1 alpha and beta on Leydig cell function. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; **167**: 548–553.
- [15] CALKINS JH, SIGEL MM, NANKIN HR, LIN T. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* 1988; **123**: 1605–1610.
- [16] CATER, MATTALIANO RJ, HESSION C, TIZARD R, FARBER NM, CHEUNG A, NINFA EG, FREY AZ, GASH DJ, CHOW EP, FISHER RA, BERTONIS JM, TORES G, WALLNER BP, RAMACHANDRAN KL, RAGIN RC, MANGANARO TF, MACLAUGHLIN DT, DONAHOE PK. Isolation of the bovine and human genes for mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animals cells. *Cell* 1986; **45**: 685–698.
- [17] CHATELAIN P, PENHOAT A, PERRARD-SAPORI MH, JAILLARD C. Maturation of steroidogenic cells: a target for IGF-I. *Acta Paediatr Scan* 1988; **347**: 104109.
- [18] CLOSSET J, GOTHOT A, SENTE B, SCIPPO ML, LGOUT A, VANDENBROECK M, DOMBROWICZ D, HENNEN G. Pituitary hormones dependent expression of insulin-like growth factors I and II in the immature hypophysectomized rat testis. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 1125–1131.
- [19] CZYBA JC, MONTELLA A. Spermatogeneza. [w] *Biologia rozrodu człowieka*. Czyba JC, Montella A [red] Warszawa:Upowszechnianie Nauki-Oświata "UN-O"Sp. z o.o. 1994: 72–87.
- [20] DAUGHADAY WH, ROTWEIN P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; **10**: 68–91.
- [21] DERYNCK R, JARRETT JA, CHENEY, EATON DH, BELL JR, ASSOIAN RK, ROBERTS AB, SPORN MB, GOEDDEL DV. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; **316**: 701–705.
- [22] DERYNCK R. Transforming growth factor- α structure and biological activities. *J Cell Biochem* 1986; **32**: 293–304.
- [23] ERIKSSON AE, COUSENS LS, WEAVER LH, MATTHEWS BW. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 3441–3445.
- [24] FAUSER BC, BAIRD A, HSUEH AJ. Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated androgen production by cultured rat testicular cells. *Endocrinology* 1988; **123**: 2935–2941.
- [25] FAUSER BC, GALWAY AB, HSUECH AJ. Inhibitory actions of interleukins-1 beta on steroidogenesis in primary cultures of neonatal rat testicular cells. *Acta Endocrinol Copenh* 1989; **120**: 401–408.
- [26] FINDLAY JK, HUTCHINSON LA, RISBRIDGER GP. Intergonadal regulation by inhibin-related peptides. [w] *Inhibin-Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone*. Burger HG, deKrester DM, Findlay JK, Igarashi M [red.] New York: Raven 1987; vol. **42**: 299–312.
- [27] GOLDMANS, KIESSLING AA, MILLETTE CF, COOPER GM. Expression of c-mos RNA in germ cells of male and female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4509–4513.
- [28] GONZALEZ AM, BUSCAGLIA M, ONG M, BAIRD A. Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J Cell Biol* 1990; **110**: 753–765.
- [29] GRANHOLM T, CREASY DM, POLLANEN P, SODER O. Di-n-pentyl phthalate-induced inflammatory changes in the rat testis are accompanied by local production of a novel lymphocyte activating factor. *J Reprod Immunol* 1992; **21**: 1–14.
- [30] GUO H, CALKINS JH, SIGEL MM, LIN T. Interleukin-2 is a potent inhibitor of Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1990; **127**: 1234–1239.

- [31] HAKOVIRTA H, PENTTILA TL, POLLANEN P, FROYSA B, SODER O, PARVINEN M. Interleukin-1 bioactivity and DNA synthesis in X-irradiated rat testes. *Int J Androl* 1993; **16**: 159–164.
- [32] HALL SH, BERTHELON MC, AVALLET O, SAEZ JM. Regulation of c-fos, c-jun, jun-B, and c-myc messenger ribonucleic acids by gonadotropin and growth factors in cultured pig Leydig cell. *Endocrinology* 1991; **129**: 1243–1249.
- [33] HANDELSMAN DJ, SPALIVIERO JA, SCOTT CD, BAXTER RC. Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis. *Acta Endocrinol* 1985; **109**: 543–549.
- [34] HANEJIT, KOIDE SS, TAJIMA Y, NISHIMUNE Y. Differential effects of epidermal growth factor on the differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes *in vitro*. *J Endocrinol* 1991; **128**: 383–388.
- [35] HERZOG NK, SINGH B, ELDER J, LIPKIN I, TRAUER RJ, MILLETTE CF, GOLDMAN DS, WOLFES H, COOPER GM, ARLINGHAUS RB. Identification of the protein product of the c-mos proto-oncogene in mouse testes. *Oncogene* 1988; **3**: 225–229.
- [36] HOLMES SD, SPOTTS G, SMITH RG. Rat sertoli cells secrete a growth factor that blocks epidermal growth factor (EGF) binding to its receptor. *J Biol Chem* 1986; **261**: 4076–4080.
- [37] JAGODZIŃSKI PP, TRZECIAK W. Akumulacja czynników wzrostu w jądrach komórek docelowych. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 447–456.
- [38] JAILLARD C, CHATELAIN PG, SAEZ JM. *In vitro* regulation of pig Sertoli cell growth and function effects of fibroblast growth factor and somatomedin C. *Biol Reprod* 1987; **37**: 665–674.
- [39] JOSSO N. Anti-müllerian hormone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1991; **5**: 635–654.
- [40] KASSON BG, HSUECH AJW. Insulin-like growth factor-I augments gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by cultured rat testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **52**: 27–34.
- [41] KERR JB. The Cytology of the Human Testis. [w] The Testis. Burger HG, deKretser DM [red.] New York: Raven 1989; 197–229.
- [42] KHAN SA, NIESCHLAG E. Interleukin-1 inhibits follitropin-induced aromatase activity in immature rat Sertoli cells *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 1991; **75**: 1–7.
- [43] KLAGSBRUN M. The affinity of fibroblast growth factors (FGFs) for heparin; FGF-heparan sulfate interactions in cells and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1990; **2**: 857–863.
- [44] KLEIN A. Peptydowe czynniki wzrostowe. *Post Biol Kom* 1993; **20(supl 1)**.
- [45] KOSHIMIZU U, WATANABE D, TAJIMA Y, NISHIMUNE Y. Effects of W(c-kit) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in Wf/Wf testes. *Development* 1992; **114**: 861–867.
- [46.] LIN T, BLAISDELL J, HASKELL JF. Hormonal regulation of type I insulin-like growth factor receptors on Leydig cells in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1988; **123**: 134–139.
- [47] LIN T, BLAISDELL J, HASKELL JF. Transforming growth factor- β inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; **146**: 387–394.
- [48] LIN T, HASKELL J, VINSON N, TERRACIO L. Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **137**: 950–956.
- [49] LIN T, WANG D, CALKINS JH, GUO H, CHI R, HOUSLEY PR. Regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **73**: 147–152.
- [50] LIN T, WANG D, NAGPAL ML. Human chorionic gonadotropin induces interleukin-1 gene expression in rat Leydig cells *in vivo*. *Mol Cell Endocrinol* 1993; **95**: 139–145.
- [51] LIN T, WANG TL, NAGPAL ML, CALKINS JH, CHANG WW, CHI R. Interleukin-1 inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 1305–1311.
- [52] LYONS KM, JONES CM, HOGAN BI. The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet* 1991; **7**: 408–412.

- [53] MANOVA K, HUANG EJ, ANGELES M, DE-LEON V, SANCHEZ S, PRONOVOST SM, BESMER P, BACHVAROVA RF. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993; **157**: 85–99.
- [54] MATHER J. The establishment and characterization of two distinct mouse testicular endothelial cell lines. *Biol Reprod* 1980; **23**: 243–250.
- [55.] MATHER JP, SAEZ JM, DRAY F, HAOUR F. Hormone-hormone and hormone-vitamin interactions in the control of growth nad function of Leydig cells in vitro. [w] Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Sato G, Ross R [red.] 1982: vol. **9**: 1117–1128.
- [56] MATHER JP, WOODRUFF TK, KRUMMEN LA. Paracrine regulation of reproductive function by inhibin and activin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; **201**: 1–15.
- [57] MAYERHOFER A, RUSSELL LD, GROTHE C, RUDOLF M, GRATZL M. Presence and localization of a 30-KDa basic fibroblast growth factor-like protein in rodent testis. *Endocrinology* 1991; **129**: 921–924.
- [58] MOORE C, MOGER WH. Interleukin-1 alpha-induced changes in androgen and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate release in adult rat Leydig cells in culture. *J Endocrinol* 1991; **129**: 381–390.
- [59] MORERA AM, CHAUVIN MA, FEIGE JJ, GUILLAUMOT P, KERAMIDES M, MAUDIT C, SORDOILLET C, BENAHMED M. Interactions between systemic hormones and local growth factors in the control of the testis function: the example of gonadotropins and transforming growth factor β . [w] Hormonal communicating events in the testis. Isidori A, Fabbri A, Dufau M [red.] New York: Raven Press 1990: 191–202.
- [60] MORERA AM, CHAUVIN MA, PERETTI E, BINOUX M, BENAHMED M. Somatomedin C/Insulin-like growth factor 1: an intratesticular differentiative factor of Leydig cells? *Horm Res* 1987; **28**: 50–57.
- [61] MORERA AM, COCHET C, KERAMIDAS M, CHAUVIN MA, DE PERETTI E, BENAHMED M. Direct regulating effects of transforming growth factor- β on the Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *J Steroid Biochem* 1988; **30**: 443–447.
- [62] MURPHY PR, MOGER WH. Short-term primary culture of mouse interstitial cells: effects of culture conditions on androgen production. *Biol Reprod* 1982; **27**: 38–47.
- [63] NARGOLWALLA C, MCCABE D, FRITZ IB. Modulation of levels of messenger RNA for tissue-type plasminogen activator in rat Sertoli cells, and levels of messenger RNA for plasminogen activator inhibitor in testis peritubular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **70**: 73–80.
- [64] NAVILLE D, CHATELAIN PG, AVALLET O, SAEZ JM. Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **70**: 217–224.
- [65] NORTON JN, SKINNER MK. Regulation of Sertoli cell function and differentiation through the actions of a testicular paracrine factor P-Mod-S. *Endocrinology* 1989; **124**: 2711–2719.
- [66] OONK RB, GROOTEGOED JA. Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rats and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **55**: 33–43.
- [67] OONK RB, JANSEN R, GROOTEGOED JA. Differential effects of follicle-stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *J Cell Physiol* 1989; **139**: 210–218.
- [68] OSTROWSKI K. Układ płciowy. [w] Embriologia człowieka. Ostrowski K [red.] Warszawa, PZWL 1985; 131–139
- [69] PAKOFF J. Inducible overexpression and secretion of int-1 protein. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3377–3384.
- [70] PARVINEN M, SODER O, MALI P, FROYSA B, RITZEN EM. *In vitro* stimulation of stage specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 alpha. *Endocrinology* 1991; **129**: 1614–1620.

- [71] PAYNE AH, QUINN PG, RANICSS. Regulation of microsomal cytochrome P-450 enzymes and testosterone production in Leydig cells. *Recent Prog Horm Res* 1985; **41**: 153–197.
- [72] PEPINSKY RB, SINCLAIR LK, CHOW EP, MATTALIANO RJ, MANGANARO TF, DONAHOE PK, CATE RL. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor- β -like fragment. *J Biol Chem* 1988; **263**: 18961–18964.
- [73] PEREZ-INFANTE V, BARDIN CW, GUNSALUS GL, MUSTO NA, RICH KA, MATHER JP. Differential regulation of testicular transferrin and androgen-binding protein secretion in primary cultures of rat Sertoli cells. *Endocrinology* 1986; **118**: 383–392.
- [74] PERRARD-SAPORI MH, CHATELAIN PG, JAILLARD C, SAEZ JM. Characterization and regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I (Sm-C/IGF I) receptors on cultured pig Leydig cells. Effects of Sm-C/IGF-I on luteotropin receptors and steroidogenesis. *Eur J Biochem* 1987; **165**: 209–214.
- [75] POLLANEN P, SODER O, PARVINEN M. Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation *in vivo*. *Reprod Fertil Dev* 1989; **1**: 85–87.
- [76] POLLANEN P, von EULER M, SODER O. Testicular immunoregulatory factors. *J Reprod Immunol* 1990; **18**: 51–76.
- [77] PROPST F, ROSENBERG MP, IYER A, KAUL K, VANDE-WOUNDE GF. c-mos proto-oncogene RNA transcripts in mouse tissues: structural features, developmental regulation, and localization in specific cell types. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 1629–1637.
- [78.] PROPST F, VANDE WOUNDE GF. Expression of c-mos proto-oncogene transcripts in mouse tissues. *Nature* 1985; **315**: 516–518.
- [79] RADHAKRISHNAN B, SUAREZ-QUIAN CA. Characterization of epidermal growth factor receptor in testis, epididymis and vas deferens of non-human primates. *J Reprod Fertil* 1992; **96**: 13–23.
- [80] RITZEN EM, HANSSON V, FRENCH FS. The Sertoli Cell. [w] Burger HG, deKretser DM [red.] *The Testis*. New York: Raven 1989; 269–302.
- [81] ROSSI P, DOLCI S, ALBANESI C, GRIMALDI P, GEREMIA R. Direct evidence that the mouse sex-determining gene *sry* is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev* 1993; **34**: 369–373.
- [82] SAEZ JM, AVALLET O, LEJEUNE H, CHATELAIN PG. Cell-cell communication in the testis. *Horm Res* 1991; **36**: 104–115.
- [83] SCHWARTZ NB, MILETTE JJ, COHEN IR. Animal models which demonstrate divergence in secretion or storage of FSH and LH. [w] Inhibin-Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone. Burger HG, deKretser DM, Findlay JK, Igarashi M [red.] New York: Raven 1987; vol. **42**: 239–252.
- [84] SHACKLEFORD GM, VARMUS HE. Expression of the proto-oncogene *int-1* is restricted to postmeiotic male germ cells and the neural tube of mid-gestational embryos. *Cell* 1987; **50**: 89–95.
- [85] SKINNER MK, FETTEROLF PM, ANTHONY CT. Purification of a paracrine factor, P-Mod-S, produced by testicular peritubular cells that modulates Sertoli cell function. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2884–2890.
- [86] SKINNER MK, FRITZ IB. Testicular peritubular cells secrete a protein under androgen control that modulates Sertoli cell functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 114–118.
- [87] SKINNER MK. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev* 1991; **12**: 45–77.
- [88] SODER O, SYED V, CALLARD GV, TOPPARIJ, POLLANEN P, PARVINEN M, FROYSA B, RITZEN EM. Production and secretion of an interleukin-1-like factor is stage-dependent and correlates with spermatogonial DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Int J Androl* 1991; **14**: 223–231.
- [89] SODER O, SYED V, POLLANEN P, GUFTASSON K, GRANHOLM K, KHAN S, ARVER S, HOLST M, von EULER M, RITZEN EM. Testicular interleukin-1 like factor. [w] *The molecular and cellular endocrinology of the testis*. Cooke BA, Sharpe RM [red.] New York: Raven Press 1988; vol. **50**: 325–332.

- [90] SORDOILLET C, CHAUVIN MA, REVOL A, MORERA AM, BENAHMED M. Fibroblast growth factor is a regulator of testosterone secretion in cultured immature Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **58**: 283–286.
- [91] SPITERI-GRECH J, BARTLETT MS, NIESCHLAG E. Regulation of testicular insulin-like growth factor-I in pubertal growth hormone-deficient male rats. *J Endocrinology* 1991; **131**: 279–285.
- [92] SPITERI-GRECH J, NIESCHLAG E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. *J Reprod Fertil* 1993; **98**: 1–14.
- [93] STUBBS SC, HARGREAVE TB, HABIB FK. Localization and characterization of epidermal growth factor receptors on human testicular tissue by biochemical and immunohistochemical techniques. *J Endocrinol* 1990; **125**: 485–492.
- [94] SUAREZ-QUIAN CA, DAI MZ, ONODA M, KRISSE RM, DYM M. Epidermal growth factor receptor localization in the rat and monkey testes. *Biol Reprod* 1989; **41**: 921–932.
- [95] SYED V, KHAN SA, NIESCHLAG E. Epidermal growth factor stimulates testosterone production on human Leydig cells in vitro. *J Endocrinol Invest* 1991; **14**: 93–97.
- [96] SYED V, SODER O, ARVER S, LINDH M, KHAN S, RITZEN EM. Ontogeny and cellular origin of an interleukin-1-like factor in the reproductive tract of the male rat. *Int J Androl* 1988; **11**: 437–447.
- [97] TAKAO T, MITCHELL WM, TRACEY DE, DE SOUZA EB. Identification of interleukin-1 receptors in mouse testis. *Endocrinology* 1990; **127**: 251–258.
- [98] TAKEDO T, SAEED J, NISHIOKO Y, DONAHOE PK. Delay of testicular differentiation in the B6.Y (DOM) ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for müllerian inhibiting substance. *Dev Biol* 1991; **146**: 386–395.
- [99] TEERDS KJ, ROMMERTS FF, DORRINGTON JH. Immunohistochemical detection of transforming growth factor-alpha in Leydig cell during the development of the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1990; **69**: R1–6.
- [100] TRES LL, SMITH EP, van WYK JJ, KIERSZENBAUM AL. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp Cell Res* 1986; **162**: 33–50.
- [101] TSUTSUMI O, KURACHI H, OKA T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 1986; **233**: 975–977.
- [102] UENON, BAIRD A, ESCHF, LINGF, GUILLEMIN R. Isolation and partial characterization of basic fibroblast growth factor from bovine testis. *Mol Cell Endocrinol* 1987; **49**: 189–194.
- [103] VANNELLI BG, BARNI T, ORLANDO C, NATALI A, SERIO M, BALBONI GC. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: an immunohistochemical study. *Fertil Steril* 1988; **49**: 666–669.
- [104] VERHOEVEN G, CAILLEAU J, van DAMME J, BILLIAU A. Interleukin-1 stimulates steroidogenesis in cultured rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 1988; **57**: 51–60.
- [105] VERHOEVEN G. Local control systems within the testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1992; **6**: 313–333.
- [106] VON FIGURA K, HASILIK A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem* 1986; **55**: 167–193.
- [107] WADEWITZ AG, WINER MA, WOLGEMUTH DJ. Developmental and cell lineage specificity of raf family gene expression in mouse testis. *Oncogene* 1993; **8**: 1055–1062.
- [108] WANG DL, NAGPAL ML, CALKINS JH, CHANG WW, SIGEL MM, LIN T. Interleukin-1 beta induces interleukin-1 alpha ribonucleic acid expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 2862–2866.
- [109] WATRIN F, SCOTTO L, ASSOIAN RK, WOLGEMUTH DJ. Cell lineage specificity of expression of the murine transforming growth factor beta 3 and transforming growth factor beta 1 genes. *Cell Growth Differ* 1991; **2**: 77–83.

- [110] ZHENG WX, BUTWELL TJ, HECKERT L, GRISWOLD MD, BELLVE AR. Pleiotypic actions of the seminiferous growth factor on two testicular cell lines: comparisons with acidic and basic fibroblast growth factors. *Growth Factors* 1990; **3**: 73–82.
- [111] ZHOU J, BONDY C. Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril* 1993; **60**: 897–904.

Otrzymano: 12.05.1994 r.

Przyjęto: 01.10.1994 r.

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

KOMPLEKS CYTOCHROM b_6f – STRUKTURA I FUNKCJA*

CYTOCHROME b_6f COMPLEX – STRUCTURE AND FUNCTION

Andrzej SZCZEPANIAK

Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Streszczenie. Wszystkie błony tylakoidowe zawierają kompleks b_6f , który zajmuje centralną pozycję w fotosyntetycznym transporcie elektronów i przenoszeniu protonów. W pracy przedstawiono dobrze udokumentowane topograficzne modele składników kompleksu: cytochromu f , cytochromu b_6 i podjednostki IV. Przedyskutowano również badania nad lokalizacją białka Rieskego w błonie. Znacznie słabiej poznana jest funkcja kompleksu. Proponowane mechanizmy funkcjonowania (cykl Q lub cykl b) nie są w pełni udokumentowane. Rola kompleksu w cyklicznym transporcie elektronów i jego stan w błonie (monomer czy dimer) nie są w pełni wyjaśnione.

Słowa kluczowe: kompleks cytochrom b_6f , cytochrom f , cytochrom b_6 , podjednostka IV, białko Rieskego, cykl Q, cykl b.

Summary: All thylakoid membranes contain cytochrome b_6f complex which occupies the central position in photosynthetic electron transport and proton translocation. The well documented topographies of cytochrome f , cytochrome b_6 and subunit IV are presented in this article. The location of the Rieske protein in membrane is discussed. The function of the complex is less known. Proposed mechanisms (cycle Q or cycle b) are not well documented. The role of the complex during cyclic electron transfer and its status (monomer or dimer) in the membrane are not completely resolved.

Key words: Cytochrome b_6f complex, cytochrome f , cytochrome b_6 , subunit IV, Rieske protein, cycle Q, cycle b.

1. WSTĘP

W tylakoidach występują trzy białkowe transbłonowe suprakompleksy biorące udział w transporcie elektronów. Są to: fotosystem I (PS I), fotosystem II (PS II) i kompleks cytochrom b_6f . W fotosyntetycznym liniowym transporcie elektronów z

*Praca dofinansowana przez KBN, projekt badawczy nr 6 6263 92 03.

wody do NADP^+ kompleks b_6f zajmuje centralną pozycję przenosząc elektrony z PS II na PS I [9]. Kompleks b_6f przenosi elektrony z zredukowanego przez PS II plastochinonu na plastocyjaninę, która następnie jest utleniana przez PS I.

Przeptyw elektronów pomiędzy transbłonowymi białkowymi kompleksami w tlenowej fotosyntezie wykazuje ogólne podobieństwo do transportu elektronów zachodzącego w mitochondrialnym oddychaniu. W obu przypadkach można wyróżnić trzy charakterystyczne typy kompleksów:

1. Fotosystem II dostarcza elektronów po stronie redukcyjnej fotosyntetycznego łańcucha transportującego elektrony, analogiczną rolę w łańcuchu oddechowym spełniają dehydrogenazy.

2. Kompleks b_6f zajmuje centralną pozycję w fotosyntetycznym transporcie elektronów, analogicznie do kompleksu cytochrom bc_1 w łańcuchu oddechowym.

3. Po stronie oksydacyjnej z fotosyntetycznego łańcucha elektrony są pobierane przez fotosystem I, a z łańcucha oddechowego przez oksydazę cytochromową.

Wyróżniającą cechą kompleksu b_6f w porównaniu do kompleksu bc_1 jest funkcjonowanie b_6f w cyklicznym transporcie elektronów, w którym biorą udział: kompleks b_6f , plastocyjanina, PS I i ferredoksyna [8].

Równomierne rozmieszczenie kompleksu b_6f wzdłuż błony tylakoidowej jest cechą wyróżniającą ten kompleks spośród pozostałych tylakoidowych transbłonowych kompleksów. Występuje on zarówno w tylakoidach stromy, w końcowych błonach gran, jak i w osłoniętych błonach gran [2].

Poniżej przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczącego struktury białek wchodzących w skład kompleksu cytochrom b_6f oraz funkcjonowania tego kompleksu.

2. SKŁAD POLIPEPTYDOWY

Wyizolowany kompleks cytochrom b_6f rozdzielony elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym wykazuje obecność tylko czterech polipeptydów: cytochromu f, cytochromu b_6 , białka Rieskego zawierającego centrum żelazowo-siarkowe (Fe-S) i podjednostki IV. Występują one w stosunku molarnym 1:1:1:1 [3,34,35], a skład ten jest uniwersalny zarówno dla kompleksów b_6f wyizolowanych z roślin wyższych [3,25,34,65], glonów [43,86] jak i sinic [42,53]. Są również doniesienia o małych polipeptydach (4–6 kDa) związanych z tym kompleksem [23,53,70], jednakże ich udział stechiometryczny w kompleksie oraz funkcja są nieznane.

Są prace wskazujące na związanie oksydoreduktazy ferredoksyna – NADP (FNR) z kompleksem b_6f [7]. Jednakże FNR nie jest integralnym białkiem błony tylakoidowej, a jego związanie z kompleksem może być przypadkowe. Intensywne odmywanie błon tylakoidowych 2M NaBr usuwa FNR [25], a brak jego nie wpływa na aktywność wyizolowanego kompleksu [25,26].

3. GRUPY PROSTETYCZNE

Zarówno kompleks b₆f, jak i bc₁ mają uniwersalny skład grup prostetycznych: dwa hemy typu b, jeden hem typu c i jedno wysokopotencjałowe centrum żelazowo-siarkowe (Fe₂S₂) [8,69,80]. Heterogenność hemów cytochromu b jest cechą charakterystyczną dla kompleksu bc₁, różnią się one zarówno potencjałem redoks, jak i widmem. W mitochondriach potencjały formalne (E_{m7}) hemów b_p i b_n wynoszą odpowiednio -50 i +50 mV, a maksima absorpcji w pasmie Soreta prążka α 566 i 561 nm [10], w chromatoforach wartości te wynoszą odpowiednio -90 i +50 mV oraz 566 i 562 nm [5,10]. Jednakże chloroplastowy cytochrom b₆ nie wykazuje różnic między dwoma hemami b. Zmierzony potencjał formalny *in situ* wykazuje tylko jedną wartość, której wielkości podawane w literaturze różnią się dość znacznie i wynoszą od -15 do +110 mV [18,66]. Różnice w potencjale pomiędzy hemami b są zbyt małe, aby mogły być zmierzone. Sugeruje się, że różnica ta jest < 50 mV [8]. Tylko w pomiarach *in vitro* na wyizolowanych kompleksach b₆f wykazano różnicę potencjałów formalnych pomiędzy hemami b cytochromu b₆ [35,36]. Różnica w położeniach maksimów prążka α w paśmie Soreta wyraźna jest w temperaturze 77^oK, a w temperaturze 25^oC wynosi tylko 0,5 nm [39]. Cytochrom f jest wysokopotencjałowym cytochromem typu c. Potencjał formalny jest niezależny od pH w zakresie fizjologicznym, a podawane w literaturze dane mieszczą się w zakresie od 330 do 390 mV [22,35,45]. Maksimum prążka α cytochromu f z roślin wyższych położone jest przy 554 nm, z glonów przy 553 nm, a z sinic przy 556 nm [27,29]. Wysokopotencjałowe białko żelazowo-siarkowe ma centrum redoks typu 2Fe-2S, które daje charakterystyczne widmo EPR [37,47], a jego potencjał formalny ma wartość 280–290 mV [26,37]. Wartość ta w zakresie pH od 6,5 do 8,0 jest stała. Polipeptyd ten od imienia jego odkrywcy nazywany jest białkiem Rieskego [68,69].

4. STRUKTURA

4.1. WSTĘP

W przypadku białek (powyżej 10 kDa) oraz kompleksów białkowych tylko analiza dyfrakcji promieni Roentgena przez kryształy tych białek umożliwiała poznanie struktury na poziomie atomowym. Za krystalizację fotosyntetycznego centrum reakcyjnego wyizolowanego z purpurowych bakterii fotosyntetycznych i określenie struktury powyższą metodą [13,52], trzech niemieccy naukowcy H. Michel, J. Deisenhofer i R. Huber w 1988 r. otrzymali nagrodę Nobla. Dotychczas jest to jedyny suprakompleks błonowy o znanej strukturze.

Pomimo wysiłków wielu naukowców do chwili obecnej nie udało się nikomu wykrystalizować kompleksu cytochrom b₆f, dlatego struktura tego kompleksu na

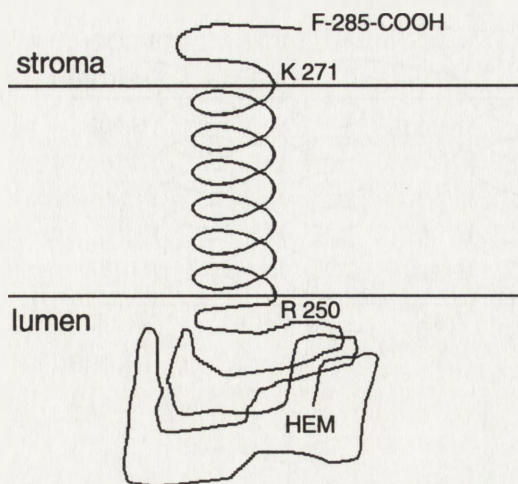
poziomie atomowym jest nieznana. Dostępne są tylko modele topograficzne białek składników tego kompleksu przewidziane na podstawie analizy sekwencji aminokwasów, hydrofobowości [73] i danych biochemicznych [63].

4.2. CYTOCHROM f

Cytochrom f jest białkiem składającym się z 285 aminokwasów. W znanych sekwencjach tego białka z roślin wyższych 80% aminokwasów (ponad 230) jest identycznych, a położenie hydrofobowego fragmentu składającego się z 20 reszt w pobliżu C-końca jest identyczne w rodzinie cytochromów f i cytochromów c₁ [22,28,81]. Nietypowe dla tylakoidowych białek błonowych kodowanych przez DNA chloroplastowe jest położenie N-końca po stronie lumenalnej błony. Wynika ono prawdopodobnie z posiadania przez to białko presekwencji składającej się z 35 aminokwasów, która "kieruje" wbudowywaniem cytochromu f w błonę tylakoidową. CO-OH-koniec cytochromu f jest trawiony przez karboksypeptydazę A dodaną od strony stromalnej błony tylakoidowej, a miejsca cięcia przez trypsynę i proteazę V8 znajdują się tylko po stronie lumenalnej [74,84]. Na tej podstawie i opierając się na wynikach analiz hydrofobowości wyróżniono w tym białku trzy domeny (rys. 1):

- i) stromalną, zawierającą 15 C-końcowych aminokwasów (reszty 270–285);
- ii) transbłonową, składającą się z 20 aminokwasów przechodzącą przez błonę tylakoidową helisę α ;
- iii) lumenalną, składającą się z 250 aminokwasów. W hydrofilnej części lumenalnej znajduje się kowalencyjnie związany wiązaniem tioestrowym hem (grupa winylowa z Cys-21 i Cys-24), a ligandami hemu są histydyna-25 i tyrozyna-1 (azot grupy α -aminowej) [48].

Ostatnio udało się wykrystalizować domenę lumenalną cytochromu f [49]. Kluczem okazał się wybór gatunku do preparacji cytochromu. Wyizolowany z liści rzepy (rodzina krzyżowe) cytochrom f okazał się fragmentem pozbawionym 33 C-końcowych aminokwasów [22,49], występującym w roztworze w formie monomeru. Ta ostatnia cecha charakterystyczna dla preparatów cytochromu f z roślin należących do rodziny krzyżowych [20,50,78], odróżnia ten cytochrom od wyizolowanego cytochromu f z innych gatunków roślin wyższych (np. szpinak) [29], który wprawdzie cały, ale w roztworze wodnym nawet w obecności detergentów, tworzy agregaty nie nadające się do krystalizacji [21,29]. Wyizolowany, pozbawiony C-końca cytochrom f z rzepy ma nie zmienione widmo spektralne, nie zmieniony potencjał redoksy i wykazuje normalne oddziaływanie z plastocyaniną [22,48]. Uzyskane kryształy dały dobry obraz dyfrakcyjny (dyfrakcja do 2,3 Å) i pozwoliły określić szczegółową strukturę części lumenalnej cytochromu f. Ta część białka jest wydłużona o wymiarach 7,5x3,5x2,4 nm i można w niej wyróżnić dużą i małą domenę. Duża domena znajdująca się bliżej błony tylakoidowej zawiera hem. Nieoczekiwanie okazało się, że szóstym ligandem żelaza jest N-końcowy aminokwas, tyrozyna [48].

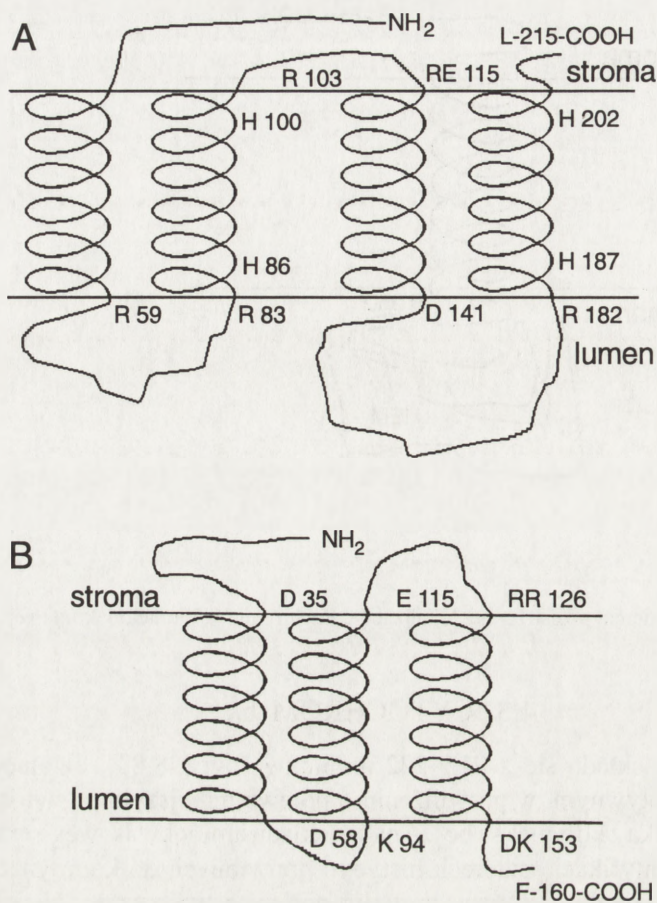


Rys. 1. Schemat przestrzennej lokalizacji cytochromu f w błonie tylakoidowej

4.3. CYTOCHROM b₆

Cytochrom b₆ składa się z 215–222 aminokwasów [28,81], ewolucyjnie jest białkiem konserwatywnym, w przybliżeniu o połowę mniejszym od cytochromu b, analogicznego białka z kompleksu bc₁. Analiza składu aminokwasowego cytochromu b₆ umożliwiła identyfikację czterech histydyn potrzebnych do koordynacji dwóch hemów, ponieważ ma on w domenach hydrofobowych tylko cztery histydyny, a w całej sekwencji pięć. Te cztery histydyny występują jako dwie pary w dwóch transbłonowych helisach α . Dwie pary ligandów są położone po przeciwnych stronach błony tylakoidowej, wiążą koordynacyjnie dwa hemy łącząc w ten sposób drugą i czwartą transbłonową helisę α (rys. 2A) [11,82].

Analiza hydrofobowości cytochromu b₆ wykazała istnienie pięciu konserwatywnych hydrofobowych fragmentów. Analogiczna analiza hydrofobowości domen wiążących hem cytochromów b z mitochondriów i fotosyntetycznych bakterii wykazała istnienie pięciu identycznej wielkości i identycznie położonych hydrofobowych fragmentów. Wyniki tej analizy sugerują istnienie pięciu transbłonowych fragmentów zarówno w cytochromie b₆, jak i w domenie wiążącej hem cytochromu b [8,82]. Jednakże analiza składu aminokwasowego czwartego fragmentu hydrofobowego (1 Asp, 1 Glu, 1 Ser, 1 Thr, 2 Gly i 3 Pro w chloroplastach szpinaku) cytochromu b₆ sugeruje, że ten fragment nie jest transbłonowy. Biochemiczne metody analizy topografii tego białka z zastosowaniem trypsynolizy i ukierunkowanych na peptyd prze-



Rys. 2. Modele przestrzennej lokalizacji cytochromu b_6 (A) i podjednostki IV (B) w błonie tylakoidowej uwzględniające liczbę transbłonowych fragmentów oraz lokalizację czterech histydyn wiążących koordynacyjnie dwa hemy; zaznaczono również naładowane aminokwasy graniczące z hydrofobowymi α -helisami; numeracja dla cytochromu b_6 i podjednostki IV ze szpinaku

ciwciał potwierdziły to przypuszczenie. Wykazały one, że cytochrom b_6 ma cztery transbłonowe helisy α i obydwie N- i C-końce są po stronie stromalnej błony tylakoidowej (rys. 2A) [76,77]. Topografia cytochromu b_6 okazała się analogiczna z topografią domeny wiążącej hem cytochromu b , dla którego taki model topograficzny został zaproponowany na podstawie analizy umiejscowienia odpornych na inhibitor mutacji [4,12,14,15,31]. Istotną różnicą jest obecność w tylakoidowym cytochromie b_6 dodatkowego aminokwasu (Thr-188, numeracja dla szpinaku) zaraz za histydyną wiążącą koordynacyjnie hem. Ta dodatkowa reszta przesuwająca o 100° wzajemne położenie węgli α dwóch histydyn w IV helisie [8,81], a więc otoczenie obu hemów

w cytochromie b₆ jest inne niż w cytochromie b. Może to być powodem braku dających się zmierzyć różnic potencjałów pomiędzy hemami cytochromu b₆.

4.4. PODJEDNOSTKA IV

Mitochondrialny cytochrom b mający 42 kDa jest ekwiwalentem dwóch oddzielnych polipeptydów chloroplastowych: cytochromu b₆ i podjednostki IV powstałych w wyniku podziału genu [82]. Podjednostka IV zbudowana z 160 reszt aminokwasowych o masie 17,5 kDa [81], wywodzi się z C-końcowego fragmentu cytochromu b. Topografia podjednostki IV została przewidziana na podstawie istnienia znaczącej identyczności pomiędzy podjednostką IV a odpowiadającą jej C-końcową częścią mitochondrialnego cytochromu b oraz znalezieniu trzech hydrofobowych fragmentów w podjednostce IV odpowiadających transbłonowym helisą α V, VI i VII cytochromu b [8]. Na podstawie tych faktów przewidziano model topograficzny z trzema transbłonowymi helisami α (rys. 2B). Aby być w zgodzie z danymi topograficznymi dla cytochromu b₆ i cytochromu b, N-koniec podjednostki IV musi znajdować się po stronie stromalnej błony tylakoidowej, a C-koniec po stronie lumenalnej [81].

4.5. BIAŁKO RIESKEGO

Nadal różne modele topograficzne białka Rieskego są dyskutowane. Funkcja tego białka, przenoszenie elektronu z chinolu na cytochrom f przemawia za występowaniem tego białka łącznie z centrum żelazowo-siarkowym (2Fe2S) w sąsiedztwie cytochromu f, a więc po stronie lumenalnej błony tylakoidowej. Jednakże liczba i położenie fragmentów transbłonowych nie może być jednoznacznie przewidziana na podstawie analizy hydrofobowości. Analiza białka Rieskego z tylakoidów wykazuje obecność hydrofobowego fragmentu, składającego się z 21 aminokwasów zaczynając od reszty 17. Następnie występuje lizyna lub seryna i 16 kolejnych hydrofobowych aminokwasów [81]. Ta analiza może sugerować występowanie jednej [74] lub dwóch [71] transbłonowych helis α . Jednakże, kiedy porównuje się sekwencje aminokwasów białek Rieskego z chloroplastów, mitochondriów i bakterii fotosyntetycznych, nie można znaleźć w nich konserwatywnych hydrofobowych fragmentów [81]. To z kolei sugeruje, że białko Rieskego jest białkiem peryferyjnym, bez transbłonowych fragmentów, zlokalizowane po stronie lumenalnej błony tylakoidowej. Za tym przemawia dość łatwe uwalnianie tego polipeptydu zarówno z tylakoidów, błon mitochondrialnych i chromatoforów stosunkowo niewielkim stężeniem (1–1,5 M) tiocyjanianu sodu [A. Szczepaniak, nie publikowane] oraz łatwe odwracalne oddysocjowanie tego białka z wyizolowanego kompleksu [1]. Taką lokalizację białka Rieskego wcześniej zaproponowano w mitochondriach [24].

Białka te zawierają od 179 (szpinak) do 215 (drożdże) reszt aminokwasowych [28,74,81]. W pobliżu C-końca wszystkie wykazują obecność dwóch konserwatyw-

nych regionów: C-T-H-L-G-C-V i C-P-C-H-G-S. Pogrubione aminokwasy są ligandami grupy 2Fe-2S. Występowanie dwóch atomów azotów jako ligandów grupy żelazowo-siarkowej został potwierdzony badaniami spektroskopowymi [5] i wyjaśnia nietypowo wysoki potencjał oksydoredukcyjny tego białka.

5. FUNKCJA

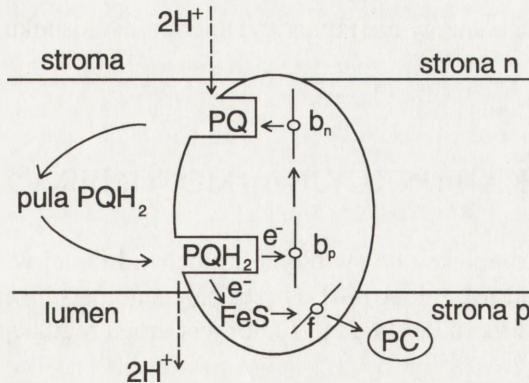
Kompleks cytochrom b_6f jest enzymem oksydoredukcyjnym, jego nazwa systematyczna to oksydoreduktaza plastochinol-plastocyanina. Występuje ona we wszystkich błonach fotosyntetycznych roślin wyższych i sinic [30,46]. W bakteriach fotosyntetycznych jej rolę pełni kompleks cytochrom bc_1 , który bierze udział w cyklicznym transporcie elektronów przenosząc elektrony z ubichinolu na cytochrom c_2 [4,17].

Kompleks b_6f funkcjonuje w liniowym transporcie elektronów pomiędzy PS II i PS I, który jest sprzężony z transportem protonów w poprzek błony tylakoidowej. Protony są pobierane po stronie stromalnej błony tylakoidowej, a uwalniane wewnątrz tylakoidu, po stronie lumenalnej błony tylakoidowej [9].

W warunkach niskiej intensywności światła lub w obecności jonoforów znoszących potencjał błony, transportowi elektronów towarzyszy przeniesienie protonów w stosunku $H^+/e = 2$ [8,33]. Aby wyjaśnić elektrogeniczny transport protonów przez kompleks b_6f oraz stosunek $H^+/e=2$, zaproponowano mechanizm tego przenoszenia zwany cyklem Q (rys. 3) [54,55]. Podstawowe założenia tego mechanizmu to występowanie w kompleksie dwóch miejsc wiążących chinon, znajdujących się po przeciwnej stronie błony. Jedno miejsce (Q_p) jest to miejsce utleniania chinolu, drugie (Q_n) jest miejscem redukcji chinonu. W chloroplastach miejsce Q_p znajduje się w pobliżu powierzchni lumenalnej błony tylakoidowej, a miejsce Q_n w pobliżu powierzchni stromalnej błony. Obecność dwóch miejsc wiążących chinon w kompleksie b_6f wykazano w badaniach z zastosowaniem inhibitorów [40]. Podstawowe etapy tego mechanizmu to:

1. **Chinol** (QH_2) jest utleniany do semichinonu (Q^+) przez kompleks b_6f w miejscu wiążącym chinol zwanym Q_p . W wyniku przeniesienia jednego elektronu na centrum żelazowo-siarkowe białka Rieskiego oraz uwolnienia dwóch protonów po stronie lumenalnej błony tylakoidowej powstaje Q^+ . Wymaga to, aby miejsce wiążące chinol (Q_p) znajdowało się w pobliżu centrum FeS białka Rieskiego i cytochromu b_6 . Takie położenie tego centrum reakcyjnego zostało udowodnione przez znakowanie kompleksu analogami inhibitorów hamujących utlenianie chinolu i pochodnych azydowych chinonu [61,62] oraz badanie oddziaływania dwubromomtymochinonu (inhibitora przyłączającego się do miejsca Q_p) z hemem b_p i białkiem Rieskiego [59].

2. Następnie **semichinon** redukuje hem b_p cytochromu b_6 i uwalnia się chinon. Elektron z hemu b_p przenoszony jest na hem b_n .



Rys. 3. Schemat cyklu Q pokazujący transport elektronów i przenoszenie protonów przez kompleks cytochrom b₆f, połączony z utlenianiem plastochinolu i redukcją plastocyjaniny; strona n – negatywna strona błony, z tej strony protony są pobierane; strona p – pozytywna strona błony, po tej stronie protony są uwalniane; PQ – plastochinon, PQH₂ – plastochinol, PC – plastocyjanina, b_n i b_p – hemy cytochromu b₆, f – hem cytochromu f

3. Elektron z hemu b_n jest przenoszony na chinon związany z kompleksem. To miejsce wiążące chinon oznaczane jest jako Q_n. Dwa kolejne elektrony powodują redukcję chinonu do chinolu i jego uwolnienie z miejsca wiążącego. Protony potrzebne w tej reakcji pobierane są po stronie stromalnej błony tylakoidowej. Dyfuzja QH₂ uwolnionego z miejsca wiążącego Q_n i związanie go w miejscu Q_p zamyka cykl.

Cykl Q jest stosunkowo dobrze udowodniony w przypadku kompleksu bc₁ z mitochondriów i fotosyntetycznych bakterii [41,79,80]. Znacznie mniej mamy dowodów jego występowania w chloroplastach. Odtworzenie stosunku H⁺/e=2 w warunkach *in vitro* po wbudowaniu wyizolowanego kompleksu b₆f w liposomy przemawia za tym mechanizmem [38,85]. Przeciwno, że nie można spektralnie ani w oparciu o potencjał redoksywny rozróżnić hemów b_p i b_n w tylakoidach oraz brak inhibitora hamującego redukcję chinonu w miejscu Q_n [8]. Takim inhibitorem dla kompleksu bc₁ jest antymycyna. Również to, że nie udało się udowodnić przenoszenia elektronu z hemu b_p do hemu b_n [16], przemawia przeciwko temu mechanizmowi.

Słabym punktem mechanizmu zwanego cyklem Q jest konieczność dyfuzji chinonu w poprzek błony tylakoidowej. Doprowadziło to do zaproponowania alternatywnego mechanizmu zwanego cyklem b [83], w którym ruch semichinonu jest ograniczony tylko do centralnego regionu dwuwarstwy lipidowej. Najpierw chinol jest utleniany do semichinonu, następnie redukuje on hem b_p jak w cyklu Q. Powstaje chinon, który wypierany jest z centrum reakcyjnego przez kolejny chinol. Ten z kolei w wyniku uwolnienia dwóch protonów i przekazania jednego elektronu do centrum FeS białka Rieskego przechodzi w anion semichinonowy (Q⁻). Ten semichinon w wyniku rotacji zbliża się do hemu b_n, od którego przyjmuje elektron, po przyłączeniu dwóch protonów przechodzi w chinol, który zamyka cykl reakcji.

Proponowane mechanizmy nie tłumaczą zmienności stosunku H^+/e w chloroplastach.

6. JEDNOSTKA FUNKCYJNA: MONOMER CZY DIMER?

Występowanie kompleksu b_c w błonie mitochondrialnej w formie dimeru jest stosunkowo dobrze udowodnione [44], a przejście monomer-dimer [57,58] lub przejście z jednej formy dimeru do drugiej [72,80] jest drogą regulacji aktywności kompleksu.

W przypadku kompleksu b_6f podobne badania nie przyniosły jednoznacznej odpowiedzi. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego kompleksu b_6f wbudowanego w liposomy wskazują na istnienie dimeru [56]. Masa kompleksu wyizolowanego w obecności Tritonu wynosi 370 kDa [34], a w obecności cholanu i oktyloglukozydu 250 kDa [35]. Te dane przemawiają za dimerem związanym z detergentem i lipidami, ponieważ masa monomeru wynosi 95 kDa [3]. Innym podejściem było oznaczenie stosunku ilości inhibitora związanego przez błonę tylakoidową do ilości kompleksu w błonie. Z tych badań jedni badacze wywnioskowali, że kompleks b_6f funkcjonuje w błonie tylakoidowej jako dimer [19], a inni, że jako monomer [67]. Zastosowanie metody inaktywacji kompleksu w błonie przez silne promieniowanie (*radiation inactivation*) do wyznaczania masy kompleksu również nie dało jednoznacznej odpowiedzi. W jednym przypadku wyciągnięto wniosek, że kompleks funkcjonuje w błonie jako dimer [64], a w drugim, że jako monomer [60]. Ostatnio wykazano, że wyizolowany kompleks jest mieszaniną monomeru i dimeru, udało się również rozdzielić je [6]. Ponadto wykazano, że *in vitro* dimer jest 5-krotnie aktywniejszy w transporcie elektronów w porównaniu do monomeru [32], sugerując, że dimer jest aktywną formą w błonie.

Interesująca jest propozycja, że przejście monomer - dimer może być mechanizmem kontrolującym i regulującym cykliczny i niecykliczny transport elektronów w chloroplastach [8]. Wyjaśniałaby ona także zmienny stosunek H^+/e (od 1 do 2) w zależności od stanu energetycznego błony tylakoidowej. W obecności dimeru QH_2 byłby utleniany do Q przez dwa centra FeS białka Rieskego. Zachodziłby tylko liniowy transport elektronów bez udziału cytochromu b_6 . Jeżeli warunki metaboliczne (wysoki stosunek $NADPH/NADP^+$) preferowałyby cykliczny transport elektronów, kompleks b_6f przechodziłby do formy monomerycznej. Plastochinol byłby utleniany przez białko Rieskego do semichinonu, ten z kolei redukowałby hem b_p cytochromu b_6 . Elektron z białka Rieskego przechodząc przez cytochrom f, plastocyaninę, PS I i ferredoksynę redukowałby hem b_n . Dwa elektrony, po jednym z hemu b_p i b_n , redukowałyby chinon do chinolu powiększając pulę QH_2 w błonie i zamykając cykl. Ta interesująca hipoteza wymaga jednak udowodnienia.

7. PODSUMOWANIE

Przedstawiony powyżej przegląd piśmiennictwa dotyczący cytochromu b₆f wskazuje na duży postęp w badaniu struktury poszczególnych składników kompleksu. Proponowane modele strukturalne cytochromu f, cytochromu b₆ i podjednostki IV są stosunkowo dobrze udokumentowane i powszechnie akceptowane, a struktura domeny lumenalnej cytochromu f została poznana na poziomie atomowym. Najmniej poznana jest struktura białka Rieskego.

Pomimo nagromadzenia dużej ilości danych dotyczących funkcjonowania kompleksu, ciągle nie ma jednoznacznego wyjaśnienia mechanizmu transportu elektronów i protonów przez ten kompleks. Nieznany jest również mechanizm regulujący zmienny stosunek transportowanych protonów do elektronów.

LITERATURA

- [1] ADAM Z, MALKIN R. Reconstitution of isolated Rieske Fe-S protein into a Rieske-depleted cytochrome b₆f complex. *FEBS Lett* 1987; **225**: 67–71.
- [2] ANDERSON JM. Cytochrome b₆f complex: Dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynth Res* 1992; **34**: 341–357.
- [3] BLACK MT, WIDGER WR, CRAMER WA. Large-scale purification of active cytochrome b₆f complex from spinach chloroplast. *Arch Biochem Biophys* 1987; **252**: 655–661.
- [4] BRASSEUR R. Calculation of the three-dimensional structure of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b inserted in a lipid matrix. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12571–12575.
- [5] BRITT RD, SAUER K, KLEIN MP, KNAFF DB, KRIAUCIUNAS A, YU C-A, YU L, MALKIN R. Electron spin echo envelope modulation spectroscopy supports the suggested coordination of two histidine ligands to the Rieske Fe-S centers of the cytochrome b₆f complex of spinach and the cytochrome bc₁ complex of *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter spheroides* R-26, and bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 1991; **30**: 1892–1901.
- [6] CHAIN RK, MALKIN R. The chloroplast cytochrome b₆f complex can exist in monomeric and dimeric states. *Photosynth Res* 1991; **28**: 59–68.
- [7] CLARK RD, HAWKESFORD MJ, COUGHLAN SJ, BENNET J, HIND G. Association of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase with the chloroplast cytochrome b-f complex. *FEBS Lett* 1984; **174**: 137–142.
- [8] CRAMER WA, BLACK MT, WIGER WR, GIRVIN ME. Structure and function of photosynthetic cytochrome b-c₁ and b₆-f complexes. [w] *The Light Reaction*. Barber J (red.) Amsterdam: Elsevier 1987: 447–493.
- [9] CRAMER WA, FURBACHER PN, SZCZEPANIAK A, TAE G-S. Electron transport between photosystem II and photosystem I. [w] *Current Topics in Bioenergetics* Lee CP (red.) t 16. Orlando: Academic Press 1991: 179–222.
- [10] CRAMER WA, KNAFF DB. Energy Transduction in Biological Membranes. A Text Book of Bioenergetics. New York: Springer-Verlag, 1991.
- [11] CRAMER WA, WIDGER WR, HERRMANN RG, TREBST A. Topography and function of thylakoid membrane proteins. *Trends in Biochem Sci* 1985; **10**: 125–129.
- [12] DALDAL F, TOKITO MK, DAVIDSON E, FAHAM M. Mutations conferring resistance to quinol oxidation (Qz) inhibitors of the cyt bc₁ complex of *Rhodobacter capsulatus*. *EMBO J* 1989; **8**: 3951–3961.

- [13] DEISENHOFER J, MICHEL H. The photosynthetic reaction center from purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Sciences* 1989; **254**: 1463–1473.
- [14] di RAGO JP, COLSON AM. Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase in *S. cerevisiae*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 12564–12570.
- [15] di RAGO JP, COPPEE JY, COLSON AM. Molecular basis for resistance to myxathiazol, mucidin (strobilurin A) and stigmatellin. *J Biol Chem* 1989; **264**: 14543–14548.
- [16] FURBACHER PN, GIRVIN ME, CRAMER WA. On the question of interheme electron transfer in the chloroplast cytochrome b₆ in situ. *Biochemistry* 1989; **28**: 8990–8998.
- [17] GENNIS RB, BARQUERA B, HACKER B, van DOREN SR, ARNAUD S, CROFTS AR, DAVIDSON E, GRAY KA, DALDAL F. The bc₁ complex of *Rhodobacter spheroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *J Biomembr Bioenerg* 1993; **25**: 195–209.
- [18] GIRVIN ME, CRAMER WA. A redox study of the electron transport pathway responsible for the slow electrochromic phase in chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 1984; **767**: 29–38.
- [19] GRAAN T, ORT DR. Quantitation of 2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone binding sites in chloroplast membranes: Evidence for a functional dimer of the cytochrome b₆f complex. *Arch Biochem Biophys* 1986; **248**: 445–451.
- [20] GRAY JC. Purification and properties of monomeric cytochrome f from charlock, *Sinapis arvensis* L. *Eur J Biochem* 1978; **82**: 133–141.
- [21] GRAY JC. Maternal inheritance of cytochrome f in interspecific *Nicotiana hybrids*. *Eur J Biochem* 1980; **112**: 39–46.
- [22] GRAY JC. Cytochrome f: Structure, function and biosynthesis. *Photosynth Res* 1992; **34**: 359–374.
- [23] HALEY J, BOGORAD L. A 4-kDa maize chloroplast polypeptide associated with the cytochrome b₆f complex: subunit 5, encoded by the chloroplast petE gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1534–1538.
- [24] HARTL F-U, PFANNER N, NICOLSON DW, NEUPERT W. Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1988; **988**: 1–45.
- [25] HAUSKA G. Preparations of electrogenic, proton-transporting cytochrome complexes of the b₆f-type (chloroplast and cyanobacteria) and bc₁-type (*Rhodospseudomonas spheroides*). [w] Methods in Enzymology Colowick SP, Kaplan NO (red). t 126, London: Academic Press, Inc 1986: 273–285
- [26] HAUSKA G. Composition and structure of cytochrome bc₁ and b₆f complexes. [w] Staehelin-LA, Arntzen CJ (red.) Encyklopedia of Plant Physiology t 19. Berlin, Springer Verlag 1986: 496-507.
- [27] HAUSKA G, HURT E, GABELLINI N, LOCKAU W. Comparative aspects fo quinol-cytochrome c / plastocyanin oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1983; **726**: 97–133.
- [28] HAUSKA G, NITSCHKE W, HERRMANN RG. Aminoacid identities in the three redox center-carring polypeptides of cytochrome bc₁/b₆f complexes. *J Biomembr Bioenerg* 1988; **20**: 211–228.
- [29] HO KK, KROGMAN DW. Cytochrome f from spinach and cyanobacteria. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1980; **255**: 3855–3861.
- [30] HOPE AB. The chloroplast cytochrome bf complex: a critical focus on function. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1143**: 1–22.
- [31] HOWELL N, GILBRET K. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. *J Mol Biol* 1988; **203**: 607–618.
- [32] HUANG D, EVERLY RM, CHENG RH, HEYMANN B, SCHAGGER H, SLED V, OHNISHI T, BAKER TS, CRAMER WA. Characterization of the chloroplast cytochrome b₆f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* 1994; **33**: 4401–4409.

- [33] HURT E, GABELLINI N, SHAHAK Y, LOCKAU W, HAUSKA G. Extra proton translocation and membrane potential generation - universal properties of cytochrome bc₁/b₆f complexes reconstituted into liposomes. *Arch Biochem Biophys* 1983; **225**: 879–885.
- [34] HURT E, HAUSKA G. A cytochrome b₆f complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplast. *Eur J Biochem* 1981; **117**: 591–599.
- [35] HURT E, HAUSKA G. Identification of the polypeptides in the cytochrome b₆f complex from spinach chloroplast with redox-center-carrying subunits. *J Bioenerg Biomembr* 1982; **14**: 405–424.
- [36] HURT E, HAUSKA G. Cytochrome b₆ from isolated cytochrome b₆f complexes. Evidence for two spectral forms with different midpoint potentials. *FEBS Lett* 1983; **153**: 413–419.
- [37] HURT E, HAUSKA G, MALKIN R. Isolation of the Rieske iron-sulfur protein from the cytochrome b₆f complex of spinach chloroplast. *FEBS Lett* 1981; **149**: 211–216.
- [38] HURT E, HAUSKA G, SHAHAK Y. Electrogenic proton translocation by the chloroplast cytochrome b₆f complex reconstituted into phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 1982; **149**: 211–216.
- [39] JOLIOT P, JOLIOT A. Proton pumping and electron transfer in the cytochrome b/f complex of algae. *Biochim Biophys Acta* 1986; **849**: 211–222.
- [40] JONES RW, WHITMARSH J. Inhibition of electron transfer and the electrogenic reaction in the cytochrome b/f complex by 2-n-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (NQNO) and 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone (DBMIB). *Biochim Biophys Acta* 1988; **933**: 258–268.
- [41] KNAFF DB. The cytochrome bc₁ complexes of photosynthetic purple bacteria. *Photosynth Res* 1993; **35**: 117–133.
- [42] KRINNER M, HAUSKA G, HURT E, LOCKAU W. A cytochrome b₆f complex with plastoquinol-cytochrome c oxidoreductase activity from *Anabena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* 1982; **681**: 110–117.
- [43] LEMAIRE C, GISCARD-BASCOU J, WOLLMAN F-A, BENNOUN P. Studies on the cytochrome b₆f complex. I. Characterization of the complex subunit in *C. reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1986; **851**: 229–238.
- [44] LEONARD K, WINGFIELD P, ARAD T, WEIS H. Three-dimensional structure of ubiquinol:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J Mol Biol* 1981; **149**: 259–274.
- [45] MALKIN R. Redox properties and functional aspect of electron carriers in chloroplast photosynthesis. [w] *Electron Transport and Photophosphorylation*. Barber J (red.) Amsterdam:Elsevier 1982: 49–79.
- [46] MALKIN R. Cytochrome bc₁ and b₆f complexes of photosynthetic membranes. *Photosynth Res* 1992; **33**: 121–136.
- [47] MALKIN R, APARICIO PJ. Identification of a g = 1.90 high potential iron sulfur protein in chloroplast. *Biochem Biophys Res Comm* 1975; **63**: 1157–1160.
- [48] MARTINEZ SE, HUANG D, SZCZEPANIAK A, CRAMER WA, SMITH JL. Crystal structure of chloroplast cytochrome f reveals a novel cytochrome fold and unexpected heme ligation. *Structure* 1994; **2**: 95–105.
- [49] MARTINEZ SE, SMITH JL, HUANG D, SZCZEPANIAK A, CRAMER WA. Crystallographic studies of the lumen-side of turnip cytochrome f. [w] *Research in Photosynthesis* Murata N (red.)t II. Amsterdam: Kluwer Academic Press 1992: 495–498.
- [50] MATSUZAKI E, KAMIMURA Y, YAMASAKI T, YAKUSHIJI E. Purification and properties of cytochrome f from *Brassica komatsuna* leaves. *Plant Cell Physiol* 1975; **16**: 237–246.
- [51] MEINHARD SW, CROFTS AR. The role of cytochrome b-566 in the electron transfer chain of RB. sphaeroides. *Biochim Biophys Acta* 1983; **723**: 219–230.

- [52] MICHEL H. Tree-dimensional crystals of a membrane protein complex. The photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J Mol Biol* 1982; **158**: 567–572.
- [53] MINAMI Y, WADA K, MATSUBARA H. The isolation and characterisation of a cytochrome b₆f complex from the cyanobacterium *Spirulina* sp. *Plant Cell Physiol* 1989; **30**: 91–98.
- [54] MITCHEL P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome bc₁ complex in the respiratory chain: proton motive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 1975; **56**: 1–6.
- [55] MITCHEL P. Possible molecular mechanisms of the proton motive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 1976; **62**: 327–367.
- [56] MORSCHEL E, STAEHELIN LA. Reconstitution of cytochrome f/b₆ and CFo-CF1 ATP synthetase complexes into phospholipid and galactolipid liposomes. *J Cell Biol* 1983; **97**: 301–310
- [57] NAŁĘCZ MJ, BOLLI R, AZZI A. Molecular conversion between monomeric and dimeric states of the mitochondrial bc₁ complex: isolation of active monomers. *Arch Biochem Biophys* 1985; **236**: 619–628.
- [58] NAŁĘCZ MJ, AZZI A. Functional characterization of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex: Steady-state kinetics of the monomeric and dimeric forms. *Arch Biochem Biophys* 1985; **240**: 921–931.
- [59] NITSCHKE W, HAUSKA G. On the nature of the g=6 EPR signal in isolated cytochrome b₆f complexes from spinach chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 1987; **892**: 314–319.
- [60] NUGENT JHA, BENDALL DS. Functional size measurements on the chloroplasts cytochrome b₆f complex. *Biochim Biophys Acta* 1987; **893**: 177–183.
- [61] OETTMEIER W, MASSON K, SOLL H-J, HURT E, HAUSKA G. Photoaffinity labelling of plastoquinone binding sites in chloroplast cytochrome b₆f-complex. *FEBS Lett* 1982; **144**: 313–317.
- [62] OETTMEIER W, MASSON K, OLSCHESKI E. Photoaffinity labelling of chloroplast cytochrome b₆f complex by an inhibitor azido-derivative. *FEBS Lett* 1983; **155**: 241–244.
- [63] OVCHINNIKOV YA. Probing the folding of membrane proteins. *Trends in Biochem Sci* 1987; **12**: 434–438
- [64] PAN RS, CHIEN LF, WANG MY, PAN RL, HSU BD. Functional size of photosynthetic electron transport chain determined by radiation inactivation. *Plant Physiol* 1987; **85**: 158–163.
- [65] PHILLIPS AL, GRAY JC. Isolation and characterization of a cytochrome b-f complex from pea chloroplasts. *Eur J Biochem* 1983; **137**: 553–560.
- [66] RICH PR, BENDAL DS. The redox potentials of the b-type cytochromes of higher plant chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1980; **591**: 153–161.
- [67] RICH PR, SALLY A, MADGWICK SA, MOSS DA. The interaction of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrom b₆f complex. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1058**: 312–328.
- [68] RIESKE JS, HANSEN RF, ZANNG WS. Studies on the electron transfer system. Properties of a new oxidation-reduction component of the respiratory chain as studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1964; **239**: 3017–3022.
- [69] RIESKE JS. Composition, structure and function of complex III of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1976; **456**: 195–247.
- [70] ROMANOWSKA E, ALBERTSSON PA. Cytochrome b₆f complex from grana and stroma lamellae from *Spinacia oleracea*. [w] Research in Photosynthesis, Murata N [red.] t. II, Printed in the Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1992: 507–510.
- [71] SCHAGGER H, BORCHART U, MACHELDT W, LINK TA, JAGOW G. Isolation and amino acid sequence of the Rieske iron sulfur protein of beef heart ubiquinol: cytochrome c reductase. *FEBS Lett* 1987; **219**: 161–168.
- [72] SCHMIDT EM, TRUMPOWER B. Subunit 6 regulates half-of-the-sites reactivity of the dimeric cytochrome bc₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17005–17011.

- [73] SHIVER J, PETERSON AA, FURBACHER PN, WIDGER WR, CRAMER WA. [w] *Methods in Enzymology*. Abelson JN, Simon M (red.) t 172, Orlando:Academic Press, Inc, 1988: 439–462
- [74] STEPPUHN J, ROTHER C, HERMANS J, JANSEN T, SALNIKOW J, HAUSKA G, HERRMANN RG. The complete amino acid sequence of the Rieske FeS-precursor protein from spinach chloroplast deduced from cDNA analysis. *Mol Gen Genet* 1987; **210**: 171–177.
- [75] SZCZEPANIAK A, BLACK MT, CRAMER WA. Topography of the chloroplast cytochrome b₆: Orientation of the cytochrome and accessibility of the lumen-side interhelix loops. *Z Naturforsch* 1989; **44C**: 453–461.
- [76] SZCZEPANIAK A, CRAMER W A. Topography of the chloroplast cytochrome b₆. [w] *Current Research in Photosynthesis* Baltscheffsky (red.) t III. Dordrecht, Amsterdam: Kluwer Academic Publishers 1990: 255–258.
- [77] SZCZEPANIAK A, CRAMER WA. Thylakoid membrane protein topography. Location of the termini of the chloroplast cytochrome b₆ on the stromal side of the membrane. *J Biol Chem* 1990; **265**: 17720–17726.
- [78] TANAKA K, TAKAHASHI M, ASADA K. Isolation of monomeric cytochrome f from Japanese radish and a mechanism of autoreduction. *J Biol Chem* 1978; **253**: 7397–7403.
- [79] TRUMPOWER B. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* 1990; **265**: 11409–11412.
- [80] TRUMPOWER B. Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* 1990; **54**: 101–129.
- [81] WIDGER WR, CRAMER WA. The cytochrome b₆f complex. [w] *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*. Bogorad L, Vasil IK (red.) t 7B. London: Academic Press, Inc 1991: 149–176.
- [82] WIDGER WR, CRAMER WA, HERRMANN RG, TREBST A. Sequence homology and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b₆f complex: position of the cytochrome b hemes in the membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 674–678.
- [83] WIKSTRÖM MKF, SARASTE M. The mitochondrial respiratory chain. [w] *Bioenergetics* Ernster L (red.). Amsterdam: Elsevier 1984: 49–94.
- [84] WILLEY DL, AUFFRET AO, GRAY JC. Structure and topology of cytochrome f in pea chloroplast membranes. *Cell* 1984; **36**: 555–562.
- [85] WILLMS I, MALKIN R, CHAIN RK. Quinone interaction with the chloroplast cytochrome b₆f complex. *Arch Biochem Biophys* 1988; **263**: 36–44.
- [86] WYNN RM, BERTSCH J, BRUCE DB, MALKIN R. Green algal cytochrome b₆f complexes: isolation and characterization from *Dunaliella saline*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus obliquus*. *Biochim Biophys Acta* 1988; **935**: 115–122.

Otrzymano: 20.07.1994 r.

Przyjęto: 01.11.1994 r.

Adres autora: 50-137 Wrocław, ul. Tamka 2

REDAGOWANIE TRANSFEROWYCH RNA ORGANELLI

EDITING OF ORGANELLAR TRANSFER RNAs

Michał RUREK*

Zakład Biologii Molekularnej Roślin, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie. Redagowanie jest procesem zmieniającym strukturę pierwszorzędową transkryptu. Dotychczas wykryto je głównie w organellowych mRNA i z mniejszą częstością w niektórych strukturalnych RNA. W niniejszej pracy przedstawiono dane wskazujące na zachodzenie tego procesu w cząsteczkach tRNA.

Słowa kluczowe: redagowanie RNA, transferowy RNA.

Summary. Editing is a process which changes the primary structure of transcript. Up to date it has been found in organellar messenger RNAs mainly and with the lower frequency in some of structural RNAs. In this paper the data showing the occurrence of this process in tRNA molecules are presented.

Key words: RNA editing, transfer RNA.

Zjawisko redagowania RNA (ang. *RNA editing*) zmienia nasz pogląd na jeden z podstawowych dogmatów biologii molekularnej dotyczący informacji genetycznej. Redagowanie może zmieniać w sposób znaczący informację genetyczną zawartą w niektórych pre-mRNA, rRNA i tRNA. W rezultacie, na przykład, sekwencja aminokwasów białka nie jest jednoznaczna w porównaniu z sekwencją nukleotydową genu, czy odpowiadającego mu pierwotnego transkryptu. Jest to zatem inny niż cięcie i składanie (ang. *splicing*) sposób zmiany struktury pierwszorzędowej pierwotnego transkryptu polegający na dodawaniu do RNA informacji nieobecnej w DNA.

*Student indywidualny V roku biologii molekularnej. Opiekun naukowy: prof. dr hab. Halina Augustyniak.

W mitochondriach *Trypanosoma brucei* redagowanie RNA obejmuje addycje albo delecję U, w *Physarum polycephalum* – insercje C, A i U, natomiast w roślinnych mitochondriach i chloroplastach redagowanie polega na zamianie zasad w obrębie RNA, np. C w U. W tych ostatnich istnieje też rzadka konwersja U w C. Chociaż nie wiadomo nic o mechanizmie, jak i sposobie selekcji C przeznaczonych do redagowania, niektórzy autorzy [6] uważają, że mechanizm powyższej tranzycji w obu organellach roślinnych jest podobny i wydaje się podlegać wpływowi czynników jądrowych. Redagowanie w organellach roślinnych ma posttranskrypcyjny charakter i jest bardziej rozpowszechnione w mitochondriach niż w chloroplastach. W procesie tym nie potwierdzono dotychczas udziału cząsteczek typu gRNA (tzw. *guide RNA*), chociaż w mitochondriach soi stwierdzono istnienie puli drobnocząsteczkowych RNA o dyskusyjnej funkcji [1].

Redagowanie dotyczy przede wszystkim otwartych ramek odczytu i tworzy w nich zarówno kodony start, jak i stop [6]. Sugeruje się, że proces ten generuje pulę aktywnych translacyjnie mRNA [7]. Redagowanie tworzy też czasami kodony aminokwasów, które zajmują stałe pozycje w danej grupie białek. Dotyczy to między innymi transkryptu genu odpowiadającemu podjednostce B chloroplastowej dehydrogenazy NADH u kukurydzy [4]. Efektem tego procesu jest zanik różnic pomiędzy genami organellowymi a genami innych organizmów na poziomie RNA i białka. Redagowanie nie dotyczy tylko eksonów, ale zachodzi również w intronach. Wykryto je między innymi w intronach podjednostki 2. i 5. mitochondrialnej dehydrogenazy NADH u *Oenothera* i *Arabidopsis* [6]. Wiadomo także, że usunięcie intronów nie jest konieczne do zajścia redagowania i że stopień zmian może być różny. Sądzi się, że taka zmiana ilości redagowanych transkryptów może mieć wpływ na funkcję mitochondriów. Uważa się również, że redagowanie jest bardzo stare filogenetycznie.

Dotychczas brak było danych o występowaniu redagowania w transkryptach rRNA i tRNA. W 1991 r. Schuster i wsp. [7] znaleźli mitochondrialny 26 S rRNA *Oenothera* z tranzycją C w U, co wskazywałoby na możliwość redagowania rRNA z organelli roślin. W tym samym roku doniesiono, że temu procesowi ulega tRNA selenocysteiny wołu. W dwa lata później w tRNA^{Asn} z wątroby szczura wykryto zamianę C w pozycji 32 w U i U w pozycji 33 w C [5].

Mitochondrialny tRNA^{Asp} małpatek był pierwszym znanym przykładem tRNA, który wydaje się całkowicie zależeć od redagowania, gdy chodzi o osiągnięcie pełnej funkcjonalności przy syntezie białek. Ma on antykodon GCC dla glicyny. W obróbce posttranskrypcyjnej cytozyna drugiej pozycji antykodonu jest prawdopodobnie zamieniona w urydynę, co łączy się z nabyciem specyficzności dla asparaginianu. Podobną sytuację stwierdzono dla mitochondrialnego tRNA^{Ileu} (L*AU, gdzie L* – pochodna lizydyny), która ma antykodon CAU specyficzny dla metioniny [5]. Redagowanie RNA pozwalałoby więc na włączenie odpowiednich aminokwasów bez konieczności modyfikacji uniwersalnego kodu genetycznego. Ponieważ wymianie ulegają pojedyncze nukleotydy, może zwiększać się plastyczność fenotypowa orga-

nizmu, tym bardziej, że sam proces jest nieprecyzyjny. Jest to również proces oszczędny, gdyż korzysta z już istniejących pierwotnych transkryptów.

Ciekawe redagowanie zachodzi w mitochondrialnych genach tRNA *Acanthamoeba castellanii* [3]. Dotyczy ono zespołu transkryptów 5 genów tRNA. Zmiany zostały zlokalizowane na 5' końcu ramienia akceptorowego tRNA i dotyczą trzech pierwszych par zasad. Redagowanie efektywnie poprawia błędy w ich parowaniu.

Spośród transkryptów 5 genów tRNA, redagowaniu podlegają transkrypty 4 genów: tRNA^{Lys}, tRNA^{Glu}, tRNA^{Ileu} i tRNA^{Leu}, natomiast transkrypt tRNA^{Gln} nie ulega redagowaniu. Ogółem, dla 10 scharakteryzowanych transkryptów genów tRNA ameby 8 ulega tym zmianom. Zmiany dotyczą w jednym przypadku konwersji C w A, w pięciu A w G, i w trzech – U w G [3]. Ten system redagowania zdolny jest zatem zamieniać pirymidyny w puryny lub puryny w inne puryny.

W 1993 r. L. Maréchal-Drouard i zespół z Instytutu Biologii Molekularnej Roślin w Strasburgu, udowodnili występowanie redagowania tRNA w mitochondriach roślin wyższych [5].

Zarówno w przypadku genu mitochondrialnego tRNA^{Phe} z antykodonem GAA fasoli, jak i ziemniaka C kodowana w pozycji 4. jest zamieniana w U w dojrzałym RNA. Pozwala to poprawić istniejący błąd parowania: C pozycja 4. – A pozycja 69. Taka zmiana C w U ma duże znaczenie w tworzeniu natywnej konformacji dojrzałej cząsteczki tRNA. Tranzycja ta jest najpospolitszą zmianą przy redagowaniu mitochondrialnych mRNA.

Ciekawe, że transkrypt genu tRNA^{Ser} z antykodonem GCU ziemniaka, pomimo istnienia błędnego parowania: U pozycja 6. – U pozycja 67. nie ulega redagowaniu. Jest to interesujące, gdyż potwierdza fakt, że system redagowania w mitochondriach roślin potrafi przekształcać zwykle C w U, a jedynie wyjątkowo U w C.

W mitochondrialnym DNA fasoli i ziemniaka gen tRNA^{Phe} z antykodonem GAA jest położony przed pojedynczą kopią genu tRNA^{Pro} z antykodonem UGG, lecz sekwencje tego ostatniego u obu gatunków są kolinearne z sekwencjami dojrzałych mitochondrialnych tRNA. Wskazuje to na brak redagowania tego tRNA oraz że korekta nieprawidłowego parowania w ramieniu aminoacylowym tRNA nie jest absolutną regułą w mitochondriach roślinnych.

Opisany tRNA^{Phe} z antykodonem GAA jest obecny w mitochondriach roślin dwuliściennych, a u roślin jednoliściennych odpowiadający mu gen przekształcił się w pseudogen. U tych ostatnich transkrypcji w mitochondriach ulega chloroplastowy gen tRNA^{Phe}, który uległ integracji z genomem mitochondrialnym podczas ewolucji. Posiada on już klasyczną parę A pozycja 4. – U pozycja 69. i stąd redagowanie nie zachodzi.

Z przedstawionych powyżej przykładów wynika, że w mitochondriach *Acanthamoeba castellanii* redagowanie tRNA obejmuje jeden, dwa, lub wszystkie trzy nukleotydy na 5' końcu ramienia akceptorowego i zawsze występuje naprzeciw pirymidyn, podczas gdy zamiana C w U w mitochondrialnym tRNA^{Phe} fasoli i ziemniaka

ma miejsce w pozycji 4. naprzeciw puryny (A). W przeciwieństwie do mitochondrialnego tRNA^{Ser} z antykodonem GCU ziemniaka, wszystkie nieprawidłowe parowania wykrywane w mitochondrialnych genach tRNA ameby są poprawiane, łącznie z parowaniem U-U. Wskazuje to, że mechanizmy przekształcania pierwotnych transkryptów tRNA mogą być zróżnicowane. Postuluje się bowiem, że proces redagowania może zachodzić albo w wyniku deaminacji, podstawienia zasad bez rozzerwania szkieletu fosforanowocukrowego lub wymiany nukleotydu obejmującej przecięcie RNA, usunięcie starego i wprowadzenie nowego nukleotydu oraz następnie religację dwóch cząsteczek RNA. Wydaje się, że mimo iż proces redagowania tRNA mógłby przebiegać przy udziale różnych mechanizmów, jego rolą jest głównie zapewnienie powstania natywnej cząsteczki tRNA.

Generalnie sądzi się [8], że proces redagowania jest ewolucyjnie stary i wykształcił się prawdopodobnie wcześniej niż 200–300 milionów lat temu. Może on być pozostałością procesów replikacji i modyfikowania sekwencji RNA zachodzących w "świecie RNA" który, jak się obecnie przyjmuje, poprzedzał "świat DNA".

LITERATURA

- [1] BROWN GG, AUCHINCLOSS AH, COVELLO PS, GRAY MW, MENASSA R, SINGH M. Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif. *Mol Gen Genet* 1991; **228**: 345–355.
- [2] JANKE A, PÄÄBO S. Editing of a tRNA anticodon in marsupial mitochondria changes its codon recognition. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 1523–1525.
- [3] LONERGAN KM, GRAY MW. Predicted editing of additional transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 1993; **18**: 4402.
- [4] MAIER RM, NECKERMANN K, HOCH B, AKHMEDOV NB, KOSSEL H. Identification of editing positions in the ndh B transcript from maize chloroplasts reveals sequence similarities between editing sites of chloroplast and plant mitochondria. *Nucleic Acids Res* 1992; **23**: 6189–6194.
- [5] MARÉCHAL-DROUARD L, RAMAMONJISOA D, COSSET A, WEIL JH, DIETRICH A. Editing corrects mispairing in the acceptor stem of bean and potato mitochondrial phenylalanine transfer RNA. *Nucleic Acids Res* 1993; **21**: 4909–4914.
- [6] PRING D., BRENNICKE A., SCHUSTER W. RNA editing gives a new meaning to the genetic information in mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 1163–1170.
- [7] SCHUSTER W, TERNES R, KNOOP V, HIESEL R, WISSINGER B, BRENNICKE A. Distribution of RNA editing sites in *Oenothera* mitochondrial mRNAs and rRNAs. *Curr Genet* 1991; **20**: 397–404.
- [8] ŻEKANOWSKI C. Redagowanie RNA. *Post Bioch* 1992; **4**: 156–162.

Otrzymano: 21.07.1994 r.

Przyjęto: 01.11.1994 r.

Adres autora: 60-371 Poznań, ul. Międzychodzka 5

WYTWARZANIE PEPTYDÓW REGULACYJNYCH W KOMÓRKACH PARAFOLIKULARNYCH (C) TARCZYCY

REGULATORY PEPTIDES PRODUCTION IN THE THYROID PARAFOLLICULAR (C) CELLS

Bogusław SAWICKI

Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie. Przedstawiono przegląd najnowszych doniesień dotyczących wytwarzania peptydów regulacyjnych przez komórki parafolikularne (C) tarczycy. Omówiono również proces alternatywnego składania trzech odrębnych typów dojrzałego mRNA z genu CT/CGRP (*calcitonin/calcitonin gene-related peptide*) i powstające z nich trzy odrębne prekursory peptydowe, a następnie ostateczne peptydy otrzymane po proteolitycznym rozbięciu. Zestawione w pracy dane świadczą o istotnym udziale komórek C w procesach regulacji czynności tarczycy poprzez uwalnianie odpowiednich do potrzeb peptydów regulacyjnych.

Słowa kluczowe: komórki C, peptydy regulacyjne, ekspresja genu CT/CGRP, kalcytonina, CGRP, katakalcyna I i II, peptyd N-końcowy.

Summary. The author has reviewed the most current reports concerning production of regulatory peptides in the thyroid parafollicular (C) cells. Furthermore, the process of alternative splicing of three different mature mRNAs from the CT/CGRP gene has been discussed. The alternative splicing results in three different protein precursors from which, by proteolytic cleavage, final peptides are formed. The data presented indicate a fundamental role of C cells capable of releasing regulatory peptides which influence the regulatory processes of the thyroid function.

Key words: C cells, regulatory peptides, CT/CGRP gene expression, calcitonin, CGRP, katacalcin I and II, N-terminal peptide.

Od dawna wiadomo, że podstawową funkcją komórek parafolikularnych (C) tarczycy ssaków jest wydzielanie hormonu kalcytoniny (CT). Nie było jednak jasne, dlaczego komórki te nie wytwarzają odrębnego, samodzielnego gruczołu dokrewne-

go, lecz są rozrzucone wśród pęcherzyków tarczycy w ułożeniu parafolikularnym. Początkowo domyślano się jedynie, że musi istnieć między tymi komórkami a komórkami pęcherzykowymi (*follicular (F) cells*) trwała współpraca. Obserwacje z mikroskopu elektronowego umocniły to przypuszczenie, gdyż zaobserwowano, że komórki C wytwarzają liczne kompleksy z komórkami F. Kompleksy te wyodrębniają się z otoczenia dzięki wspólnej błonie podstawnej otaczającej poszczególne pęcherzyki wraz ze ściśle przylegającymi do nich komórkami C.

Komórki C mają też zdolność gromadzenia prekursorów amin i następnie wydzielania serotoniny [49] (podobnie jak i inne komórki dokrewne z serii APUD). Ta biogenna amina jest według najnowszych badań "międzykomórkowym sygnałem" przekazywanym z komórek C do komórek F drogą parakrynną, wykazuje także stymulujące działanie na komórki C [45,46].

Najwięcej nowych informacji o dodatkowej czynności komórek C przyniosły badania wewnątrztraczykowych włókien nerwowych. Stwierdzono po pierwsze, że nerwy współczulne, przywspółczulne i peptyderygiczne uczestniczą w regulacji procesów wzrostu i wydzielania na terenie tarczycy [31,32]. Po drugie poszukując peptydowych neurotransmiterów we włóknach nerwowych zaobserwowano te same peptydy również i w komórkach C. W dodatku komórki te mogą zawierać i inne bioaktywne peptydy nie występujące we włóknach nerwowych na terenie tarczycy.

WEWNĄTRZTARCZYCOWE PEPTYDY REGULACYJNE

Występujące na terenie tarczycy aktywne biologicznie peptydy mogą spełniać jedynie rolę neurotransmiterów, gdy są wydzielane do komórek efektorowych z zakończeń nerwowych peptyderygicznych. Te same peptydy mogą też działać jak typowe hormony, gdy są wydzielane do krwi z komórek dokrewnych; jednak często są one przekazywane bezpośrednio drogą parakrynną do sąsiednich komórek lub mogą też uczestniczyć w mechanizmach autokrynnowej regulacji [4, 12, 20, 51]. Drogi ich rozprzestrzeniania się nie zawsze więc odpowiadają kryteriom wymaganym przy wyróżnianiu klasycznych hormonów, toteż w naszym opracowaniu peptydy te będziemy określać ogólnym mianem peptydów regulacyjnych (PR).

Z wielu powodów trudno sporządzić dokładną listę PR, które są wydzielane w komórkach C. Między innymi i dlatego, że część badań wykonano na hodowanych komórkach C tzw. linii TT, wyizolowanych z raka rdzeniastego tarczycy. Ponadto zaobserwowano u różnych gatunków ssaków wyraźne różnice w występowaniu i rozmieszczeniu poszczególnych PR w tarczycy [15, 34, 51, 52]. Jeżeli nawet u badanego gatunku komórki C wytwarzają dany PR, to często ilość zaangażowanych w ten proces komórek bywa niewielka. Na przykład Domin i wsp. [15] stwierdzili neuromedinę U tylko w c. 5% komórek tarczycy szczura wytwarzających CT. Dodatkowo zaobserwowano także znaczne różnice związane z wiekiem. Na przykład Zabel

i wsp. [53] stwierdzili, że u płodów i noworodków szczura większość komórek parafolikularnych wytwarza somatostatynę (ST), a tylko w niektórych z nich dochodzi do ekspresji genu CT. Obraz ten zmienia się stopniowo wraz z wiekiem i u zwierząt dorosłych wszystkie komórki produkują CT, a tylko niektóre również i ST. Problemem jest także bezbłędne określenie, które z wytwarzanych w komórkach C peptydów są rzeczywiście PR; np. pewne wątpliwości budzą powstające z genu CT/GRP dodatkowe dwa peptydy: katakalcyna i peptyd N-końcowy [2, 4, 14, 18].

W bardzo ogólnym zestawieniu PR wytwarzanych przez komórki C tarczycy ssaków odnajdujemy zaskakująco dużą ich ilość, są to:

a) opisane jak dotąd tylko w komórkach C: kalcytonina (CT), somatostatyna (ST), katakalcyna I (CCP-I), CCP-II (patrz rys. 1), peptyd uwalniający gastrynę (GRP), tyreoliberyna (TRH) i helodermina [4, 18, 19, 23, 44, 52];

b) opisane w kom. C i wewnątrztrzczycowych włóknach nerwowych: peptyd zależny od genu kalcytoniny (CGRP), peptyd N-końcowy pochodny genu CT/GRP, neuromedina U, cholecystokinina (CCK) i SP-I (*secretory peptide I*) [4, 15, 18, 29, 52].

Oprócz wymienionych występują także na terenie tarczycy PR obserwowane tylko we włóknach nerwowych: substancja P (SP), wazoaktywny peptyd naczyniowy (VIP), neuropeptyd Y (NPY), peptyd histydyno izoleucynowy (PHI) oraz galanina [4, 21, 22, 23]; a także w komórkach F: przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) i endotelina-1 (ET-1) [11, 41].

OGÓLNE DANE GENETYCZNE

Ustalono, że w komórkach dokrewnych wiele PR powstaje z genów złożonych, niosących często informację genetyczną dla kilku peptydów [10, 14, 18, 50, 54]; przy tym rodzaj ostatecznie wytwarzanych PR zależy od kierunku zróżnicowania tych komórek, od ich specjalizacji.

Oznacza to, że pomimo wstępnej ekspresji tych samych genów to ostatecznie wytwarzane PR mogą być różne. Jednocześnie dla komórek dokrewnych tzw. układu APUD (do którego należą również komórki C), charakterystyczna jest przeciwstawna możliwość wytwarzania takich samych PR w zupełnie odmiennych typach komórkowych.

Udowodniono, że komórki układu dokrewnego APUD pochodzą z ektodermy grzebieni nerwowych; to wspólne z układem nerwowym pochodzenie ma tłumaczyć, dlaczego niektóre geny niosące informację o budowie PR ulegają podobnej ekspresji wśród komórek nerwowych układu peptyderygicznego i układu APUD [4, 16, 32].

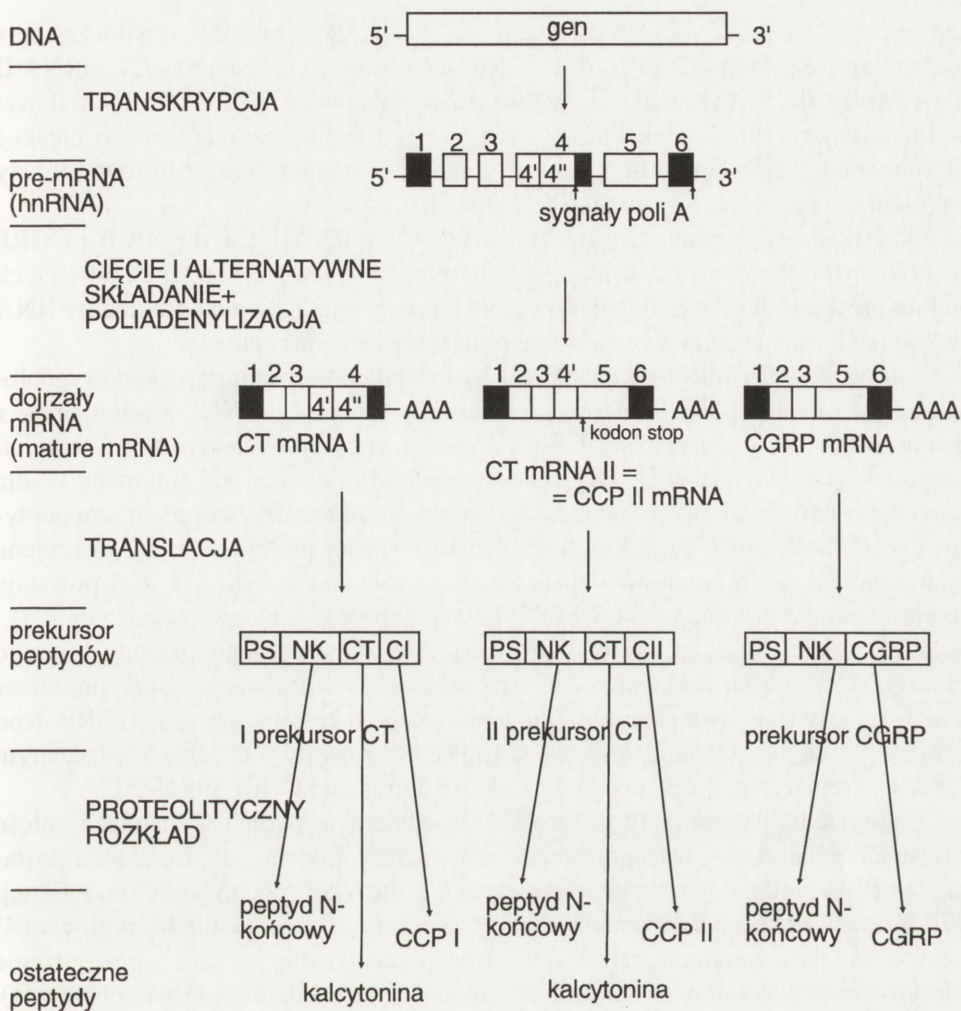
Przedstawiona wcześniej tak duża ilość PR wytwarzanych przez komórki C nie mogłaby powstać, gdyby na ich terenie nie zachodziła ekspresja złożonych genów, przenoszących informację o sekwencji aminokwasów w wielu PR. Do genów tych

zalicza się gen CT/CGRP, gen SP-I (peptyd sekrecyjny I = chromogranina A = Cg A) i gen PHM/VIP [1, 10, 18, 54]. Jednak w komórkach C procesy związane z ekspresją dwóch ostatnich wymienionych genów są mało poznane. Wiadomo jedynie, że z genu PHM/VIP (prepro-VIP) zawierającego 7 eksonów powstaje duża cząsteczka pierwotnego mRNA (hnRNA), z której w wyniku alternatywnego *splicing* powstaje w komórkach C VIP z eksonu 5, a w innych komórkach dokrewnych może być także wytwarzany peptyd histydynowo-metioninowy (PHM) z eksonu 4 [10].

Z kolei z genu SP-I jest wytwarzana duża cząsteczka SP-I złożona aż z 450 aminokwasów. Ten PR jest opisywany przez wielu badaczy jako hormon, o podobnym działaniu do PTH (*parathormonu*). Jednak nowsze badania wskazują, że opisywany w wielu typach komórek dokrewnych SP-I jest rozbijany enzymatycznie na mniejsze PR. W ten sposób powstają z różnych fragmentów pierwotnego peptydowego łańcucha z kolejno ułożonych aminokwasów w pozycji: 240–288 – "pancreastatin", 124–143 – "chromostatin", 1–114 – " β granin", 1–76 – "vasostatin", 347–419 – "parastatin" i "peptyd pochodny Cg A" złożony z aminokwasów leżących w SP-I w pozycji 1–40. Ten ostatni PR hamuje wydzielanie CT [13]. Przyjmuje się przy tym, że powstające PR z propeptydu SP-I modulują sekrecję endokrynowych komórek na drodze autokrynowej, parakrynowej lub poprzez tzw. *endocrine feedback mechanisms* [17, 48, 54].

EKSPRESJA GENU CT/CGRP

Najlepiej poznano w komórkach C ekspresję genu CT/CGRP. Przy tym do niedawna opisywano tylko dwie drogi alternatywnego tworzenia dojrzałego mRNA z eksonów pochodzących z genu CT/CGRP; dla CT był to CT mRNA, a dla CGRP – CGRP mRNA [14, 50]. Ustalono, że po transkrypcji powstaje z tego genu wielka cząsteczka pre-mRNA (hnRNA) wspólna dla obu dróg (rys. 1), złożona z 6 eksonów połączonych intronami. Dalsze przemiany w procesie dojrzewania tego RNA toczą się już odrębnymi drogami, gdyż w wyniku specyficznego enzymatycznego pocięcia pre-mRNA, a następnie alternatywnego składania z różnych eksonów – 1, 2, 3 i ulegającego poliadenylizacji eksonu 4 dla dojrzałego CT mRNA oraz z eksonów 1, 2, 3, 5 i poliadenylowanego eksonu 6 dla dojrzałego CGRP mRNA powstają te dwa rodzaje ostatecznego mRNA dla CT i CGRP (na rys. 1 oznaczone jako CT mRNA I i CGRP mRNA). Tak więc w tarczycy mogą powstawać równolegle oba rodzaje dojrzałego mRNA, natomiast w niektórych komórkach nerwowych wytwarzających PR i w części komórek należących do rozproszonego układu dokrewnego obserwuje się tylko jeden mechanizm dojrzewania RNA wiodący do wytworzenia CGRP mRNA. Komórki te są więc zdolne jedynie do syntezy CGRP. Jednak i tu są wyjątki, gdyż opisano wytwarzanie CT w komórkach głównych kłębka tętnicy szyjnej (*carotid body*) u człowieka i małpy oraz w "neuroendokrynowych" komórkach płuc szczura [42, 47].



Rys. 1. Trzy alternatywne drogi wytwarzania dojrzałego mRNA przy ekspresji "I genu CT/CGRP" (opracowanie w wersji nieco zmienionej, opartej na danych zawartych w doniesieniu Giscard-Darteville i wsp. [18]): numerowane prostokąty przedstawiają eksony, łączące je kreski introny, na czarno zaznaczono niekodujący RNA eksonów; skróty: PS = peptyd sygnałowy (*signal peptide*), NK = peptyd N-końcowy (*NH₂-terminal peptide*), CT = kalcytonina, CGRP = peptyd pochodny genu kalcytoniny (*calcitonin gene-related peptide*), skrótami C I i C II oznaczono fragmenty prekursorów peptydów odpowiadające katakalcyinie I i II (CCP I i CCP II) = polipeptydy C-końcowe (*COOH-terminal polipeptides*)

Niedawno wykryto jeszcze trzecią drogę wytwarzania dojrzałego RNA z genu CT/CGRP [1, 18]. Jest ona obserwowana w prawidłowej tarczycy tylko w śladowych ilościach. Ta nowa droga syntezy, tzw. "CT mRNA II" jest charakterystyczna dla komórek "linii TT" otrzymanych z raka rdzeniastego tarczycy. Prowadzi ona do

wytworzenia jeszcze trzeciego ostatecznego mRNA, powstającego równocześnie z poznanymi wcześniej CT mRNA I i CGRP mRNA (rys. 1). Ten nowy CT mRNA II jest matrycą do wytworzenia II prekursora peptydowego CT. CT mRNA II jest składany z wszystkich 6 eksonów, z tym, że w trakcie enzymatycznego cięcia i alternatywnego składania jest z niego wycinany i usuwany wraz z intronami duży fragment (na rys. 1 oznaczony jako 4'') eksonu 4.

Wszystkie trzy dojrzałe cząsteczki mRNA (CT mRNA I, CT mRNA II i CGRP mRNA) służą w procesie translacji jako matryce do wytworzenia trzech odrębnych prekursorowych dla PR polipeptydów. Zawierają one jednak także fragmenty RNA niekodujące, zaznaczone w przedstawionym schemacie na czarno.

W przypadku CT mRNA I eksony 2 i 3 zawierają kod struktury peptydu sygnałowego (PS) i peptydu NH₂-końcowego inaczej N-końcowego (NK), a fragment 4' z eksonu 4 dla CT i części początkowej C-końcowego peptydu (*carboxyl terminal peptide* = katalalcyna I = COOH-końcowy peptyd), podczas gdy fragment 4'' dla jego części końcowej. Najpierw jednak powstaje duża cząsteczka prekursora peptydowego (I prekursor CT), z której w wyniku swoistej proteolizy są odczepiane ostateczne PR. Z fragmentów oznaczonych na schemacie: NK, CT, C I powstają kolejno - peptyd N-końcowy, CT i CCP I, czyli peptyd C-końcowy (katalalcyna I).

W komórkach C tarczycy w wyniku swoistego enzymatycznego rozkładu drugiego znanego od wielu lat prekursora PR – na schemacie oznaczonego jako "prekursor CGRP" – powstają dwa peptydy regulacyjne: peptyd N-końcowy oraz CGRP. Kod informacji o sekwencji aminokwasów w CGRP jest zawarty w eksonie 5, włączanym podczas alternatywnego składania w strukturę dojrzałego CGRP mRNA.

Ostatnio odkryty, dojrzały CT mRNA II zawiera w swoich 6 eksonach całość informacji genetycznej występującej w obu wcześniej opisanych dojrzałych postaciach mRNA. Jednak w trakcie dojrzewania CT mRNA II dochodzi do modyfikacji tej informacji przez wytworzenie kodonu stop. Strefa połączenia między regionem 4' a eksonem 5 zmienia ramkę odczytu informacji genetycznej poprzez wprowadzenie nonsensownego kodonu na początku eksonu 5 (patrz kodon stop na schemacie). Kodon ten zapobiega translacji eksonu 5 kodującego strukturę CGRP na powstający prapeptyd (II prekursor CT). Tak więc przy translacji z CT mRNA II wykorzystany jest tylko początkowy fragment eksonu 5. Powstający w ten sposób II prekursor CT różni się od pierwszego końcową sekwencją ośmiu aminokwasów w obrębie fragmentu oznaczonego na schemacie jako C II. Z tego właśnie fragmentu powstanie "nowy" CCP II po enzymatycznym rozbiciu prekursora. Pozostałe odcinki I i II prekursora są identyczne i odpowiadają za wytworzenie CT i peptydu N-końcowego.

W opisie genetycznych mechanizmów związanych z wytwarzaniem PR należy też wspomnieć, że dla niektórych z nich może istnieć więcej niż jedna kopia genu w genomie danego gatunku ssaka. Na przykład w genomie szczura i człowieka opisano po dwa odrębne geny CT/CGRP [6, 16, 43]. Z pierwszego z tych genów mogą powstać w tarczycy trzy omówione typy dojrzałego mRNA przedstawione na schemacie. Stąd

tarczyca wytwarza z tego genu tak CT, jak i CGRP – określane czasem jako CGRP I. Natomiast z drugiego genu powstaje wyłącznie CGRP II mRNA, głównie w niektórych komórkach nerwowych i przysadce, toteż końcowym peptydem wytwarzanym przez te komórki będzie tylko CGRP II. CGRP I i II są produkowane w różnych proporcjach w poszczególnych tkankach. Różnią się one u człowieka trzema aminokwasami, a u szczura tylko jednym [6], zachowują przy tym w każdym przypadku niezmienną biologiczną aktywność.

FUNKCJA PEPTYDÓW REGULACYJNYCH W TARCZYCY

Mechanizm działania poszczególnych PR na terenie tarczycy poznano w różnym zakresie, a niektórych nie badano pod tym względem wcale. Przy tym w czasie badań często trudno odróżnić, kiedy obserwujemy bezpośrednie działanie PR na komórki C lub F, a kiedy jest to efekt pośredni np. poprzez rozszerzenie naczyń i silny wpływ inotropowy, jak to się stwierdza w przypadku CGRP [16]. Są jednak doniesienia potwierdzające bezpośredni wpływ CGRP na komórki nabłonkowe tarczycy mające swoiste receptory błonowe wiążące ten peptyd, jak to zaobserwowano u świni [12]. Przy czym stwierdzone tu stymulacyjne działanie CGRP na sekcję CT może wynikać zarówno z autokrynych, jak i innych mechanizmów, np. wpływu peptydergicznych zakończeń nerwowych oraz złożonych hormonalnych reakcji wiodących do homeostazy w obrębie tego gruczołu. CGRP może docierać do komórek docelowych w tarczycy różnymi drogami, jak też różne jest jego pochodzenie. W dodatku peptyd ten jest zawsze wydzielany łącznie z innymi PR i praktycznie nie obserwuje się na terenie tarczycy jego "czystego" oddziaływania [4]. Dotyczy to zarówno CGRP wydzielanego z peptydergicznych zakończeń nerwowych, jak i z komórek C. We włóknach nerwowych CGRP koegzystuje zazwyczaj z galaniną i SP, natomiast z komórek C jest on wydzielany wspólnie z kilkoma innymi PR [4]. Stąd też wyniki prób ustalenia funkcji tego peptydu w tarczycy są zaskakująco różne. Oprócz stymulującego wpływu CGRP na wydzielanie CT, a w pewnych warunkach T₃ i T₄ [12], obserwowano np., że CGRP, CT i katalalcyna stosowane oddzielnie u myszy nie wywierają wpływu na sekrecję hormonów tarczycowych, natomiast podane łącznie mają działanie hamujące na stymulowaną przez TSH sekrecję tych hormonów [2]. Także procesy wzrostowe tarczycy są hamowane przez CGRP i CT [40], chociaż efekt ich działania jest wyraźnie słabszy od silnie hamującego wpływu ST [55].

Funkcja somatostatyny (ST) w tarczycy nie budzi wątpliwości. Wiadomo jest, że peptyd ten przekazywany jest drogą parakrynną z komórek C do F i tu wyraźnie hamuje stymulowaną przez TSH sekrecję hormonów tarczycy [4]. ST hamuje również silnie procesy wzrostowe tego gruczołu [32, 55].

Wiele prac poświęcono roli VIP w tarczycy, jednak osiągnięte wyniki badań są niejednoznaczne. W zależności od warunków doświadczenia VIP wykazuje wg

Lewińskiego [32] "różnicowany wpływ na procesy wzrostowe tarczycy". Może to być raz wpływ hamujący, innym razem pobudzający. Na przykład dożylnie lub dotarczycowo podany VIP stymuluje procesy wzrostowe tarczycy. "*Wynik ten wiąże się zapewne z naczyniorozszerzającym działaniem tego neuropeptydu i w następstwie, zwiększeniem dostępności tarczycy dla dopływających różnych czynników pobudzających wzrost gruczołu*" – cyt. za Lewińskim [32]. Z kolei w doświadczeniu *in vitro* VIP działając bezpośrednio na komórki F hamuje procesy wzrostowe [33].

Przyjmuje się, że VIP jest najsilniejszym stymulatorem wydzielania hormonów tarczycy [4, 5, 25, 32]. Działa on nie tylko przez rozszerzenie wewnątrztruczycowych naczyń krwionośnych, ale również bezpośrednio przez swoiste receptory komórek F. W naturalnych warunkach peptyd ten nie działa sam. We włóknach ściśle przylegających do komórek F, a zawierających peptyd VIP stwierdza się zawsze również PHI [4, 22]. W tej sytuacji stymulujące działanie obu tych peptydów na sekrecję hormonów tarczycy należałoby rozpatrywać łącznie. Jednak badany oddzielnie PHI wykazuje znacznie mniej wyraźne tego typu działanie, podobnie zresztą jak helodermina, GRP, a także SP [4, 32].

Także pozostałe PR wydzielane są zazwyczaj łącznie z innymi, np. galanina towarzyszy zwykle, we włóknach nerwowych, SP lub CGRP, a neuromedyna U, SP-I, TRH, peptyd N-końcowy, CCP-I i II ulegają sekrecji z komórek C łącznie z CT i CGRP [4, 15, 18, 23].

Porównanie oddziaływania PR wykazuje także, że VIP najsilniej wzmaga przepływ krwi przez tarczycę, podobnie działa CGRP, a najslabiej PHI i helodermina [16, 25, 26, 32]. Przeciwny efekt zmniejszenia przepływu krwi przez naczynia zaobserwowano po zastosowaniu NPY [32]. Neuromedyna U została opisana w tarczycy jako niewątpliwy "parakryny regulator", gdyż jej sekrecja ulega wyraźnej zmianie wraz ze zmianą stanu aktywności komórek pęcherzykowych [15]. Dokładna ocena funkcji neuromedyny U w tarczycy jest trudna, ponieważ na jej bezpośrednie działanie nakładają się także efekty wpływów pośrednich. Przede wszystkim jest to peptyd podwyższający ciśnienie krwi przez zmiany w napięciu mięśni naczyń i akcji serca. A zatem i tą pośrednią drogą dochodzi do zmiany w czynności tarczycy.

Oba PR wydzielane przez komórki F: peptyd natriuretyczny (ANP) i endotelina-1 (ET-1) mają prawdopodobnie podobny mechanizm działania [11]. Badając ANP stwierdzono, że peptyd ten (wiążąc się ze swoistymi receptorami komórek F) hamuje w drodze autokrynnowej stymulowaną przez TSH i VIP sekrecję hormonów tarczycowych [3, 4, 41]. Natomiast dla niedawno wykrytej ET-1 ustalono jedynie, że działa ona na terenie łożyska naczyniowego; wywołuje tu skurcz mięśni gładkich oraz proliferację naczyń. Określono ją jako "autokrynowo/parakrynowy czynnik wzrostowy" (*autocrine/paracrine growth factor*) przenikający do miocytów z komórek śródbłonkowych w drodze parakrynnowej sekrecji, a do wytwarzających go komórek śródbłonka powracający i stymulujący ich rozrost jako produkt autokrynnowej sekre-

cji. Te same mechanizmy oddziaływania ET-1 w drodze autokrynowo/parakrynowej, są możliwe i w tarczycy [11].

Szczegóły wewnątrzkomórkowego działania PR w tarczycy są mało poznane. Przypuszcza się, że PR odgrywają głównie rolę w ekspresji lub przejściowym wyłączeniu genów odpowiedzialnych za czynność sekrecyjną lub proliferację [38, 39]. PR są przy tym przekazywane najczęściej w drodze parakrynowej, z wytwarzających je komórek C, do sąsiednich komórek F mających odpowiednie receptory błonowe. Równocześnie niektóre PR mogą działać także w drodze autokrynowej, gdy wytwarzająca dany peptyd komórka C lub nawet F ma odpowiednie receptory na błonie komórkowej. Część omawianych peptydów może przez tzw. "autokrynowe ujemne sprzężenie zwrotne" uczestniczyć w procesach hamowania sekrecji [4, 11]. Zakłada się, że powstające w nadmiarze ostateczne peptydy – produkty końcowe ekspresji danego genu, hamują zwrotnie dalszą jego ekspresję. Wytworzone na podstawie genu CT/CGRP peptydy wchodzą na różne drogi dalszych przemian biochemicznych. CT i CGRP, jako bardzo aktywne biologicznie hormony, znajdują liczne swoiste receptory także w odległych od tarczycy tkankach i dzięki temu są szybko usuwane z otoczenia komórek C. Natomiast stężenie peptydów N i C-końcowych narasta w czasie trwania ekspresji tego genu. Powoduje to zahamowanie dalszej "nadmiernej" ekspresji genu CT/CGRP przez zadziałanie ujemnego sprzężenia zwrotnego.

INNE CZYNNIKI REGULACYJNE

Podstawowa regulacja czynności tarczycy mieści się w kręgu współzależności hormonalnych, w obrębie osi podwzgórze-przysadka-tarczyca (P-P-T) i jest realizowana przez mechanizmy sprzężenia zwrotnego. Modulacja tych wzajemnych powiązań może wynikać z wpływu wielu zewnętrznych dla tego układu czynników, działających na różnych piętach osi P-P-T.

Od dawna jest znany bezpośredni wpływ na komórki tarczycy neurotransmitterów pochodzących z zakończeń nerwowych adrenergicznych, cholinergicznym i peptydergicznym [4, 31, 32]. Ponadto w ostatnich latach opisano także podobne działanie niektórych czynników wzrostu i cytokin [4, 8, 27, 35, 37]; początkowo sądzono, że regulują one tylko procesy wzrostu i różnicowania się komórek, jednak najnowsze badania wykazują ich wpływ również na sekrecję komórek F [4, 37].

Wśród przebadanych i wykazujących wymienione efekty regulacyjne w tarczycy są: naskórkowy czynnik wzrostu (EGF), insulino podobny czynnik wzrostu-I i II (IGF-I i II), czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α), interleukina-1 (IL-1) oraz interferony [4, 8, 37].

Jest oczywiste, że TSH – podstawowy hormon regulujący sekrecję komórek F – nie działa w izolacji, a skuteczność jego stymulującego wpływu zależy od szeregu innych hormonów i aktywnych biologicznie peptydów. W tym zamkniętym obiegu

wzajemnych współzależności, istotną rolę odgrywają czynniki wzrostowe. Dodatkowo produkcja tych czynników w komórkach F ułatwia ich szybką interwencyjną współpracę z TSH przez autokrynnowe działanie. IGF odgrywają np. kluczową rolę w regulacji mechanizmów, dzięki którym TSH zapewnia transport jodu i jego organifikację w pęcherzykach tarczycy [37].

Polipeptydy, zwane cytokinami powstają głównie w układzie immunologicznym i pełnią tu podstawową rolę w koordynacji działania całego układu przez inicjowanie, stymulowanie lub hamowanie szeregu procesów. Ostatnio przypisuje się im także rolę pośredników między układem immunologicznym a dokrewnym [8].

Lista wydzielanych przez komórki C różnorodnych peptydów ulega stale wydłużeniu [18, 28, 36, 37], a wśród nich pojawiają się nowe PR. Ta wyjątkowa zdolność komórek C do wytwarzania różnych PR musi mieć fizjologiczne przyczyny. Już na wstępie tej pracy założyliśmy, że charakterystyczne dla ssaków parafolikularne ułożenie komórek C i ich ścisła więź w rozmieszczeniu przestrzennym z komórkami F świadczy o wzajemnej czynnościowej współzależności. Potwierdzają to także zebrane w naszym opracowaniu dane o funkcji poszczególnych PR na terenie tarczycy. Wprawdzie pozostało jeszcze wiele wątpliwości co do roli niektórych z nich, to jednak ogólnie badacze akceptują już koncepcję wyznaczającą PR udział w mechanizmach wewnątrztrzonkowej regulacji czynności sekrecyjnej [4, 7, 9, 18, 28].

LITERATURA

- [1] ADEMA GJ, BAAS PD. A novel calcitonin-encoding mRNA is produced by alternative processing of calcitonin/calcitonin gene related peptide-I pre-mRNA. *J Biol Chem* 1992; **267**: 7943–7948.
- [2] AHRÉN B. Effects of calcitonin, katalcalcin and calcitonin gene-related peptide on basal and TSH-stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand* 1989; **135**: 133–137.
- [3] AHRÉN B. Atrial natriuretic factor (ANF) inhibits thyroid hormone secretion in the mouse. *Life Sci* 1990; **47**: 1973–1977.
- [4] AHRÉN B. Regulatory peptides in the thyroid gland – a review on their localization and function. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991; **124**: 225–232.
- [5] AHRÉN B, HEDNER P. Effects of YIP and helodermin on thyroid hormone secretion in the mouse. *Neuropeptides* 1989; **13**: 59–64.
- [6] AMARA SG, ARRIZA JL, LEFF SE, SWANSON LW, EVANS RM, ROSENFELD MG. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 1985; **229**: 1094–1100.
- [7] BIDEY SP, TOMLINSON S. The regulation and integration of thyroid follicular differentiation and function. *Clin Endocrinol* 1988; **28**: 423–444.
- [8] BIDIŃSKA B, JĘDRZEJUK D, BEDNAREK-TUPIKOWSKA G, SZECÓWKA K. Rola cytokin w układzie hormonalnym. *Endokrynol Pol* 1993; **44**: 601–609.
- [9] BRASS KM, HARAKALL SA, OUAFIK L, EIPPER BA, MAY V. Expression of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: an *in situ* hybridization and immunocytochemical study. *Endocrinology* 1992; **130**: 2778–2788.

- [10] BREDKJAER HE, WULFF BS, EMSON PC, FAHRENKRUG J. Location of PMH/VIP mRNA in human gastrointestinal tract detected by in situ hybridization. *Cell Tissue Res* 1994; **276**: 229–238.
- [11] COLIN I, BERBINSCHI A, DENEFF JF, KETELSLEGERS JM. Detection and identification of endothelin-1 immunoreactivity in rat and porcine thyroid follicular cells. *Endocrinology* 1992; **130**: 544–546.
- [12] COOPER CW, MC PHERSON MB, SEITZ PK, GREELEY GH, ABBAS SK, PICARD DW, CARE AD. Stimulation of calcitonin secretion in the pig by calcitonin gene-related peptide. *Bone Miner* 1991; **12**: 73–79.
- [13] DEFTOS LJ, HOGUE-ANGELETTI R, CHALBERG C, TU S. A chromogranin A-derived peptide differentially regulates the secretion of calcitonin gene products. *J Bone Miner Res* 1990; **5**: 989–991.
- [14] DENIJN M, DE WEGER RA, DEN OTTER W, VAN UNNIK JAM, LIPS CJM. Expression of the first calcitonin/CGRP gene in spontaneous and transplanted rat medullary thyroid carcinoma: a comparison of dot-blot analysis, *in situ* hybridization, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 1761–1767.
- [15] DOMIN J, AL-MADANI AM, DESPERBASQUES M, BISHOP AE, POLAK JM, BLOOM SR. Neuromedin U-like immunoreactivity in the thyroid gland of the rat. *Cell Tissue Res* 1990; **260**: 131–135.
- [16] FARYNA M, NAUMAN J. Peptyd zależny od genu kalcitoniny. *Post Nauk Med* 1991; **6**: 176–178.
- [17] FASCIOTTO BH, TRAUSS CA, GREELEY GH, COHN DV. Parastatin (porcine chromogranin A₃₄₇₋₄₁₉), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology* 1993; **133**: 461–466.
- [18] GISCARD-DARTEVELLE S, GHILLANI P, TABOULET J, TROALEN F, SEGONAD N, LASMOLES F. Specific immunostaining for CCP II, a novel calcitonin carboxyl terminal peptide encoded by the calcitonin/CGRP gene. *J Histochem Cytochem* 1993; **41**: 1605–1610.
- [19] GKONS PJ, TAVIANINI MA, LIU CC, ROOS BA. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells. *Mol Endocrinol* 1989; **3**: 2101–2109.
- [20] GRUNDITZ T, EKMAN R, HAKANSON R, RERUP C, SUNDLER F, UDDMAN R. Calcitonin gene-related peptide in thyroid nerve fibers and C cells: effects on thyroid hormone secretion and response to hypercalcemia. *Endocrinology* 1986; **119**: 2313–2324.
- [21] GRUNDITZ T, HAKANSON R, RERUP C, SUNDLER F, UDDMAN R. Neuropeptide Y in the thyroid gland: neuronal localization and enhancement of stimulated thyroid hormone secretion. *Endocrinology* 1984; **115**: 1537–1542.
- [22] GRUNDITZ T, HAKANSON R, HEDGE G, RERUP C, SUNDLER F, UDDMAN R. Peptide histidine isoleucine amide stimulates thyroid hormone secretion and coexists with vasoactive intestinal polypeptide in intrathyroid nerve fibers from laryngeal ganglia. *Endocrinology* 1986; **118**: 783–790.
- [23] GRUNDITZ T, HAKANSON R, SUNDLER F, UDDMAN R. Neurokinin A and galanin in the thyroid gland: neuronal localization. *Endocrinology* 1987; **121**: 575–585.
- [24] HUFFMAN LJ, CONNORS JM, WHITE BH, HEDGE GA. Vasoactive intestinal peptide treatment that increases thyroid blood flow fails to alter plasma T₃ or T₄ levels in the rat. *Neuroendocrinology* 1988; **47**: 567–574.
- [25] HUFFMAN L, HEDGE GA. Effects of vasoactive intestinal peptide on thyroid blood flow and circulating thyroid hormone levels in the rat. *Endocrinology* 1986; **118**: 550–557.
- [26] HUFFMAN LJ, MICHAŁKIEWICZ M, PIETRZYK Z, HEDGE GA. Helodermin, but not cholecystokinin, somatostatin, or thyrotropin releasing hormone, acutely increases thyroid blood flow in the rat. *Regul Pept* 1990; **31**: 101–105.
- [27] IMURA H, FUKATA J, MORI T. Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clin Endocrinol* 1991; **35**: 107–115.

- [28] KAMEDA Y. Production of monoclonal antibodies against a novel glycoprotein synthesized and secreted by dog thyroid C-cells. *J Histochem Cytochem* 1992; **40**: 541–553.
- [29] LARSSON LI. Differential changes in calcitonin, somatostatin and gastrin/cholecystokinin-like immunoreaktives in rat thyroid parafollicular cells during ontogeny. *Histochemistry* 1985; **82**: 121–130.
- [30] LEWIŃSKI A. Inhibitory effect of intrathyroidal injections of 6-hydroxydopamine on the compensatory thyroid hyperplasia in rats. *Neuroendocrinol Lett* 1981; **3**: 341–346.
- [31] LEWIŃSKI A. Neuropeptides and thyroid function and growth. I. Sympathetic and parasympathetic intrathyroid nerves and coexisting peptides (NPY, VIP). (W:) Progress in Neuropeptide Research, Döhler KD i Pawlikowski M. (red.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1989: 65.
- [32] LEWIŃSKI A. Neuropeptydy a tarczycza. *Endokrynol Pol* 1993; **44**: 399–403.
- [33] LEWIŃSKI A, WAJS E, KARBOWIK M. Effects of pineal-derived indolic compounds and of certain neuropeptides on the growth processes in the thyroid gland. *Thyroidology* 1992; **4**: 11–15.
- [34] LJUNGBERG O, NILSSON PO. Hyperplastic and neoplastic changes in ultimobranchial remnants and in parafollicular (C) cells in bulls: A histologic and immunohistochemical study. *Vet Patol* 1985; **22**: 95–103.
- [35] LOGAN A, BLACK EG, GONZALEZ AM, BUSCAGLIA M, SHEPPARD MC. Basic fibroblast growth factor: An autocrine mitogen of rat thyroid follicular cells. *Endocrinology* 1992; **130**: 2363–2372.
- [36] OKADA H, TOYOTA N, HARIMAYA Y, MATSUKAWA K. Immunohistochemical alterations of C cells in sheep treated with vitamin D. *J Comp Pathol* 1991; **105**: 263–270.
- [37] PHILLIPS ID, BECKS GP, WANG JF, HAN VKM, HILL DJ. Hormonal regulation and biological actions of insulin-like growth factor binding proteins in insolated ovine thyroid follicles. *Endocrinology* 1994; **134**: 1238–1246.
- [38] REUSE S, MAENHAUT C, DUMONT JE. Regulation of protooncogenes c-fos and c-myc expressions by protein tyrosine kinase, protein kinase C, and cyclic AMP mitogenic pathways in dog primary thyrocytes: a positive and negative control by cyclic AMP on c-myc expression. *Exp Cell Res* 1990; **189**: 33–40.
- [39] REUSE S, PIRSON I, DUMONT JE. Differential regulation of protooncogenes c-jun and jun D expressions by protein tyrosine kinase, protein kinase C, and cyclic-AMP mitogenic pathways in dog primary thyrocytes: TSH and cyclic-AMP induce proliferation but downregulate c-jun expression. *Exp Cell Res* 1991; **196**: 210–215.
- [40] RYBICKA I, LEWIŃSKI A, KUNTER-RADEK J, FARYNA M. Effects of calcitonin and calcitonin gene-related peptide on 3H-thymide incorporation into DNA of rat thyroid lobes *in vitro*. *Cytobios* 1992; **72**: 31–35.
- [41] SELLITTI DF, HUGHES C. Immunoreactive atrial natriuretic peptide in the thyroid gland. *Regul Pep* 1990; **27**: 285–298.
- [42] SHIMOSEGAWA T, SAID SI. Co-occurrence of immunoreactive calcitonin and calcitonin gene-related peptide in neuroendocrine cells of rat lungs. *Cell Tissue Res* 1991; **264**: 555–561.
- [43] STEENBERGH PH, HOPPENER JWM, ZANDBERG J, LIPS CJM, JANSZ HS. A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett* 1985; **183**: 403–409.
- [44] SUNDAY ME, WOLFE HJ, CHIN WW, SPINDEL E. Gastrin-releasing peptide gene expression in developing hyperplastic human thyroid C-cells. *Endocrinology* 1988; **122**: 1551–1558.
- [45] TAMIR H, HSIUNG SC, YU PY, LIN KP, ADLERSBERG M, NUNEZ F, GERSHON MD. Serotonergic signalling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT 2 receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse* 1992; **12**: 155–168.
- [46] VINOGRADOV SYu, POGORELOV YuV. Nejromediatorsnye bioaminy ~scitovidnoj zelezy i strukturno-funkcionalnye aspekty ee gomeostaza. *Arkh Anat Gistol Embriol* 1987; **92**: 12–22.

- [47] WANG YY, CUTZ E, PERRIN DG. Detection of calcitonin gene expression in human infant and monkey carotid body chief cells by in situ hybridization. *Cell Tissue Res* 1994; **276**: 399–402.
- [48] WINKLER H, FISHER-COLBRIER. The chromagranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992; **49**: 497–528.
- [49] ZABEL M. Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem J* 1984; **16**: 1265–1272.
- [50] ZABEL M. Hybrydocytochemia w badaniach nad regulacją genu kalcytoninowego w komórkach parafolikularnych tarczycy. *Post Biol Kom* 1991; **18**: 47–53.
- [51] ZABEL M, BIELA-JACEK I, SURDYK J, DIETEL M. Studies on localization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the thyroid-parathyroid complex. *Virchows Arch A* 1987; **411**: 569–573
- [52] ZABEL M, SCHŚFER H, SURDYK J, BIELA-JACEK I. Immunocytochemical studies on parafollicular cells of various mammals. *Acta Anat (Basel)* 1988; **131**: 222–226.
- [53] ZABEL M, SURDYK J, BIELA-JACEK I. Immunocytochemical studies on thyroid parafollicular cells in postnatal development of the rat. *Acta Anat (Basel)* 1987; **130**: 251–256.
- [54] ZHANG JX, FASCIOTTO BH, DARLING DS, COHN DV. Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, inhibits transcription of the parathyroid hormone and chromogranin A genes and decreases the stability of the respective messenger ribonucleic acids in parathyroid cells in culture. *Endocrinology* 1994; **134**: 1310–1316.
- [55] ŻEREK-MEŁEŃ G, LEWIŃSKI A. Inhibitory effect of somatostatin on the basal and TSH-stimulated 3H-thymidine incorporation into rat thyroid lobes incubated in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **154**: 417–420.

Otrzymano: 12.04.1994 r.

Przyjęto: 29.09.1994 r.

Adres autora: 15-230 Białystok, ul. Kilińskiego 1

TERAPIA GENOWA W LECZENIU NOWOTWORÓW

GENE THERAPY IN CANCER

Radosław ZAGOŹDŹON, Jakub GOŁĄB

Zakład Immunologii, Instytut Biostruktury, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie. Mając do dyspozycji metody pozwalające na ingerencję w głąb zjawisk genetycznych zachodzących wewnątrz komórki, badacze starają się wykorzystać je w próbach leczenia nowotworów, w których związek ze zmianami w obrębie genomu komórkowego jest już obecnie dobrze dowiedziony. Opracowano różnorodne strategie terapii nowotworów z wykorzystaniem metod wprowadzania genów do komórek zarówno prawidłowych, jak też nowotworowych. Poszczególne metody opierają się na modyfikacji genetycznej limfocytów naciekających nowotwór, komórek nowotworowych bądź fibroblastów pobranych *ex vivo* (tzw. szczepionki przeciwnowotworowe) lub też komórek guza pozostających w obrębie organizmu. Próbuje się również chronić leczony organizm przed skutkami ubocznymi stosowania tradycyjnych chemioterapeutyków przeciwnowotworowych. Nadziejemy budzą także badania nad zaburzeniem ekspresji genów odpowiadających za nowotworowy charakter wzrostu komórki. Do tego celu używa się antysensownych oligonukleotydów bądź też rybozymów. Część z opisanych strategii została już zatwierdzona do wstępnych prób w terapii nowotworów u ludzi.

Summary. During the last decade the genetic background of cancer disease has been well proved. Now scientists are trying to treat cancer using methods which let them interfere in genetic events inside cells. A variety of such methods has been recently designed. The main strategies in gene therapy of cancer are: genetic engineering of tumor infiltrating lymphocytes, cancer cells or fibroblasts obtained in *ex vivo* procedures (so-called cancer vaccines) or gene transfer into tumor cells *in situ*. Some of the strategies are focused on protecting the treated organism from side effects of classical chemotherapy. They also use antisense oligonucleotides and ribozymes to interfere with the expression of some genes responsible for neoplastic cell growth. Some of the strategies described here have been already approved for clinical trials.

Wykaz skrótów: BCG – szczepionka z żywych atenuowanych prątków *Mycobacterium tuberculosis*; CTL – cytotoksyczny limfocyt T; GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; HSV-TK – kinaza tymidynowa wirusa opryszczki zwykłej; IGF – insulinopodobny czynnik wzrostu; IL – interleukina; INF – interferon; LAK – komórka cytotoksyczna aktywowana limfokina; MAGE – gen związany z czerniakiem; MCP – monocytarny chemotaktyczny czynnik białkowy; M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; MDR – cząsteczka oporności

na leki; MHC I – główny układ zgodności tkankowej; NeoR – gen oporności na neomycynę, NK – naturalna komórka cytotoksyczna; TAA – antygen związany z nowotworem; TCR – receptor limfocyta T; TGF – transformujący czynnik wzrostu; TIL – limfocyt naciekający nowotwór; TNF – czynnik martwicy nowotworu; VDEPT – terapia z użyciem wektora wirusowego wykorzystująca enzym i prekursor leku (ang. *virus-directed enzyme/prodrug therapy*)

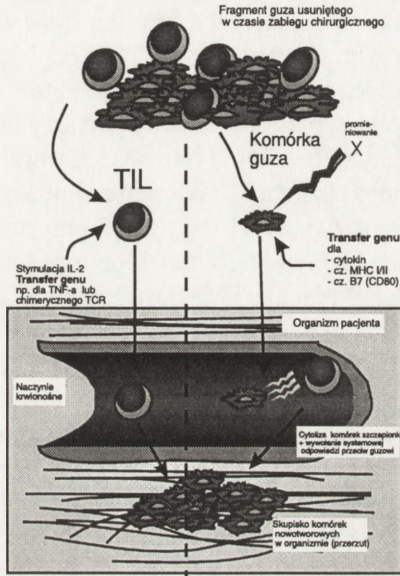
Rozwijane techniki terapii genowej wzbudzają dużą nadzieję jako skuteczne narzędzia w walce z nowotworami. Obecnie wydaje się, że modele terapii guza oparte w głównej mierze na leczeniu chirurgicznym, radioterapii oraz chemoterapii osiągają swój szczyt możliwości, dając wciąż nie zadowalające wyniki. Stosunkowo najlepsze wyniki uzyskiwane przez chirurgów zawodzą w obliczu specyficznej zdolności nowotworów do tworzenia przerzutów. Podstawową wadą dwóch pozostałych metod są ogromne efekty uboczne, nie pozwalające na zastosowanie dawek zapewniających pełne wyleczenie. Z tych powodów świat nauki coraz intensywniej poszukuje strategii cechujących się wyższą swoistością w stosunku do komórek nowotworu. Najlepsze pod tym względem wydają się być oczywiście techniki immunoterapii. Różnią się one od dotychczasowych podejść, gdyż w większości z nich nie stosuje się środków bezpośrednio niszczących komórki guza. Idea tych strategii opiera się na wykorzystaniu własnych mechanizmów obronnych chorego organizmu.

Wiele obserwacji potwierdza, że przynajmniej na komórkach niektórych nowotworów istnieją swoiste antygeny nowotworowe, np. produkty zmutowanych onkogenów, i że organizm gospodarza rozwija odpowiedź immunologiczną mającą na celu zniszczenie tkanki nowotworowej. Po pierwsze, w guzach litych często stwierdza się nacieki komórek układu immunologicznego, co uważane jest zresztą za korzystny wskaźnik prognostyczny [33, 46]. Po drugie, sporadycznie obserwuje się samoistną regresję najbardziej immunogennych nowotworów, np. czerniaka czy raka nerki. Kolejnym dowodem jest fakt częstszego występowania nowotworów u chorych poddawanych immunosupresji [52] i u osób ze znacznymi niedoborami immunologicznymi [3].

Niestety, po fali entuzjazmu okazało się, że w miarę proste modele immunoterapeutyczne, takie jak ogólnoustrojowe podawanie cytokin [25] czy terapia komórkami LAK (są to aktywowane IL-2 komórki cytotoksyczne, najczęściej typu NK)[72], nie są w stanie spełnić pokładanych w nich nadziei z powodu znacznych efektów ubocznych. W trakcie tych doświadczeń zdano sobie sprawę, że układ immunologiczny gospodarza wymaga nie tylko silnej, ale i swoistej stymulacji, aby odpowiedź immunologiczna przeciwko nowotworowi przyniosła oczekiwane rezultaty. Rozwinięto więc całą gamę modyfikacji zmierzających do osiągnięcia tego celu. W licznych spośród nich wykorzystano techniki terapii genowej. Najczęściej stosowaną obecnie techniką transferu genowego (ang. *gene transfer*) w terapii nowotworów jest wprowadzanie genów do komórek z użyciem wektorów retrowirusowych [5]. Przy stosowaniu tej metody uzyskuje się średnio ok. 50% wydajność, tzn. w hodowli komórkowej udaje się infekować około połowy komórek. Podobnie niewydajne są

techniki z wykorzystaniem liposomów lub innych nośników mających ułatwić wnikanie fragmentów kwasów nukleinowych do komórek [32].

W najbardziej rozpowszechnionych podejściach do problemu immunomodulacji wykorzystuje się *ex vivo* komórki limfatyczne naciekające nowotwór lub też komórki samego guza, zarówno po uprzednim ich pobraniu (rys. 1), jak i *in situ*.



Rys. 1. Schemat modeli terapii genowej nowotworów przy wykorzystaniu komórek chorego modyfikowanych genetycznie *ex vivo*; po lewej przedstawiona jest strategia stosowania limfocytów naciekających nowotwór (TIL), prawa część rysunku prezentuje schemat podejść określanych jako "szczepionki przeciwnowotworowe"

TERAPIA KOMÓRKAMI NACIEKAJĄCYMI NOWOTWÓR (TIL)

W wielu nowotworach stwierdza się obecność normalnych komórek limfocytarnych. W piśmiennictwie anglojęzycznym komórki takie określa się skrótem TIL. Stwierdzono, że komórki TIL zastosowane w podobnym modelu do tego, który wykorzystywał komórki LAK, wykazywały się większą skutecznością [57,58]. Założeniem początkowym było, że limfocyty naciekające nowotwór potrafią swoiście rozpoznawać antygeny w kontekście cząsteczek układu MHC na komórkach nowotworu i po powrotnym umieszczeniu ich w organizmie będą ponownie wykazywały zdolność do naciekania skupisk komórek nowotworowych. Zostało to doświadczalnie potwierdzone przez Rosenberga i wsp., dzięki wprowadzeniu do TIL bakteryjnego genu markerowego (NeoR). Wykorzystano w tym celu metodę przenoszenia genów przy pomocy retrowirusów. Badając uzyskiwane po pewnym czasie fragmenty guza stwierdzono w nich obecność komórek wykazujących ekspresję genu markerowego, potwierdzając w ten sposób słuszność pierwotnego założenia [56]. Przy okazji dowiedziano, że stosowana metoda transferu genowego nie wpływa w znaczący sposób na

właściwości komórek TIL. Zaczęto więc opracowywać modele mające na celu spó-
tęgowanie przeciwnowotworowego działania komórek TIL.

Pierwszym genem wybranym w tym celu był gen dla TNF. Sam TNF przy
podawaniu ogólnoustrojowym wykazywał wyraźne działanie przeciwnowotworowe,
jednak stężenia stosowane na zwierzętach były ok. 50-krotnie wyższe od stężeń
tolerowanych u ludzi. Limfocyty TIL miały pełnić rolę "konia trojańskiego", wcho-
dząc do guza i produkując TNF w lokalnie dużych stężeniach. W roku 1990 wprowa-
dzono model z komórkami TIL transdukowanymi genem dla TNF do badań klini-
cznych. Obecnie jest zbyt wcześnie, aby móc jednoznacznie ocenić skuteczność tej
metody, jednak wydaje się, że nie spełnia ona w pełni oczekiwań badaczy. Prawdo-
podobnie przenoszenie genu przy pomocy użytego wektora retrowirusowego nie jest
w stanie zapewnić zadowalającego poziomu wydzielania TNF przez limfocyty [31].
W dalszym ciągu poszukuje się sposobów rozwiązania tego problemu, np. przez
zastąpienie regionu kodującego w genie dla TNF odcinek transbłonowy sekwencją
kodującą w INF- γ peptyd sygnałowy. Produkt genu dla TNF jest białkiem o masie
26 kDa, z którego powstaje w dalszym etapie białko o masie 17 kDa wydzielane przez
limfocyt do otoczenia. Białko o masie 26 kDa zawiera w przeciwieństwie do formy
wydzielniczej odcinek transbłonowy i nie jest wydzielane do otoczenia. Po usunięciu
w genie dla TNF fragmentu kodującego region transbłonowy i wstawieniu w to
miejsce sekwencji odpowiedzialnej za produkcję peptydu sygnałowego w cząsteczce
INF- γ (spodziewano się przez to uzyskać ułatwione przenikanie produktu do siateczki
endoplazmatycznej limfocyty) uzyskano 5-krotny wzrost wydzielania TNF przez TIL
[31]. Doświadczenie to przeprowadzono *in vitro*, nie próbując oceniać wyników
stosowania tej metody w terapii.

Innymi kandydatami do transdukcji komórek TIL są IL-2, IL-4 czy INF- γ . Ten
ostatni na przykład miałby stymulować ekspresję cząsteczek MHC klasy I na komór-
kach guza oraz dodatkowo aktywowałby właściwości cytotoksyczne TIL.

Ciekawą próbą modyfikacji limfocytów naciekających nowotwór jest wprowadzenie
do nich genów dla chimerycznych receptorów TCR powstałych przez fuzję
sekwencji kodujących fragmenty kompleksu TCR/CD3 i genów dla części zmiennych
immunoglobulin przeciwko antygenom nowotworowym. Stosujący tę metodę bada-
cze liczą na zwiększenie swoistego gromadzenia się komórek TIL w skupiskach
komórek nowotworowych [17].

MODYFIKACJE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH *EX VIVO* – SZCZEPIONKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Idea szczepionek przeciwnowotworowych wywodzi się z obserwacji nad skutecz-
nością szczepień przeciwko wielu chorobom zakaźnym. Celem w tych modelach
terapii jest wykształcenie w organizmie skutecznej odpowiedzi immunologicznej
przeciwko antygenom związanym z nowotworem, przejawiającej się zniszczeniem

komórek guza rozwijającego się w szczepionym organizmie. Obecnie uważa się, że największe znaczenie w mechanizmie odrzucania nowotworu odgrywa odpowiedź immunologiczna typu komórkowego [22] i ta odpowiedź powinna być przede wszystkim stymulowana przy pomocy szczepionek.

Pojęcie antygenów związanych z nowotworem (TAA) nie jest nowe. Już w 1909 r. Paul Erlich podejrzewał ich istnienie. Przez następne dziesięciolecia próbowano przy pomocy różnych metod identyfikować i charakteryzować poszczególne antygeny tego typu. Do niedawna jednak nie udawało się uzyskać oczyszczonych TAA wykazujących się zadowalającą skutecznością w modelach szczepień przeciwnowotworowych. Metodą z wyboru było wprowadzanie atenuowanych (pozbawionych, najczęściej przez napromieniowanie, zdolności do tworzenia guza) komórek nowotworowych pobranych uprzednio w czasie zabiegu chirurgicznego. Niedoskonałość takiego podejścia polega na dostarczaniu do organizmu wielu antygenów równocześnie, wśród których tylko część stanowią antygeny związane z nowotworem, pozostałe stanowią zbędny balast. Co więcej, odpowiedź immunologiczna przeciwko tym dodatkowym antygenom może zagłuszyć reakcję na TAA. Niewątpliwą zaletą jest natomiast wprowadzanie dokładnie takiego zestawu antygenów, jaki charakteryzuje komórki danego guza. Ma to duże znaczenie przy uwzględnieniu heterogenności fenotypów nowotworowych, nawet wśród nowotworów wywodzących się z tej samej tkanki.

W początkowych badaniach bardzo szybko zaobserwowano, że wprowadzanie szczepionek zawierających wyłącznie napromieniowane komórki nowotworowe najczęściej nie jest w stanie skutecznie przełamać istniejącej w organizmie gospodarza alergii w stosunku do antygenów nowotworowych. Przyczyną tego jest prawdopodobnie brak tzw. "drugiego sygnału" (kostymulacji) do aktywacji limfocytów rozpoznających antygeny na niemodyfikowanych komórkach nowotworowych. Następnym etapem było więc wprowadzanie kolejnych modyfikacji w celu zwiększenia immunogenności wprowadzanych komórek. Jednym ze sposobów było umieszczanie w składzie szczepionki adiuwantów (np. BCG [23]). Techniki inżynierii genowej pozwoliły na modyfikację samych komórek guza przy pomocy różnych genów.

Kandydatami do genetycznej modyfikacji komórek nowotworowych są np. autologiczne cząsteczki MHC obu klas. W latach osiemdziesiątych wykazano na myszach, że transfekcja komórek nowotworu genem dla MHC klasy I (komórki te nie wykazywały przed modyfikacją ekspresji cząsteczek MHC klasy I) powoduje zmniejszenie zdolności tych komórek do tworzenia guza i dawania przerzutów [30, 71]. Dalsze prace, uwzględniające szerszą gamę nowotworów nie potwierdziły jednak jednoznacznej zależności pomiędzy ekspresją wprowadzonego genu dla MHC klasy I a zwiększoną immunogennością komórek [50]. U podłoża tego zjawiska może leżeć fakt, że komórki odznaczające się zmniejszoną ekspresją cząsteczek MHC na swojej powierzchni są bardziej podatne na cytotoksyczne działanie komórek NK. Jeżeli przez modyfikację genetyczną zwiększymy ekspresję cząsteczek MHC klasy I na komór-

kach nowotworów nie mających wystarczająco immunogennych antygenów związanych z nowotworem (TAA), wtedy takie komórki wymykają się spod kontroli NK, nie stając się jednocześnie wrażliwsiymi na działanie swoistych limfocytów T cytotoxicznych.

Prowadzono również prace nad wprowadzaniem do komórek nowotworowych genów dla cząsteczek MHC klasy II. Wykazano w tych pracach, iż ekspresja tych cząstek na powierzchni komórek nowotworowych może powodować zmniejszenie ich zdolności do tworzenia guza z towarzyszącą odpowiedzią przeciwko nowotworowi macierzystemu [51]. Wciąż nie do końca jest jasny mechanizm tego zjawiska, gdyż na powierzchni komórek nowotworu brak jest cząsteczek związanych z kostymulacją pomocniczych limfocytów T. Cząsteczki takie, np. B7/BB1 (CD80), występują na "profesjonalnych" komórkach prezentujących antygen, takich jak limfocyty B, makrofagi czy komórki dendrytyczne. Nie dziwi zatem fakt wykazania zwiększenia immunogenności komórek nowotworowych z wprowadzonymi równocześnie genami dla MHC klasy II i B7 [2]. Stwierdzono natomiast, że brak kostymulacji związanej z cząsteczką B7 w czasie przekazywania sygnału limfocytowi T za pośrednictwem szlaku kompleksu TCR/CD3 może prowadzić do zbyt słabej aktywacji limfocyty T, bądź też do wykształcenia stanu anergii [60]. Każę to przypuszczać, że odpowiedź immunologiczna przeciwko komórkom nowotworowym transdukowanym wyłącznie genem dla MHC klasy II wywoływana jest przez inne, nie poznane dotychczas dokładnie mechanizmy.

Rola, jaką cząsteczka B7/BB1 odgrywa w procesie aktywacji limfocytów T, uczyniła z niej poważnego kandydata do transferu genowego do komórek guza w szczepionkach przeciwnowotworowych. Cząsteczka B7 łączy się ze swoim ligandem na powierzchni limfocyty T, CD28, w czasie prezentacji limfocytowi antygeny na cząsteczkach obu klas MHC. CD28 jest uważana za receptor o dużym znaczeniu w kostymulacji limfocyty T [2,43]. Związanie się CD28 z B7 prowadzi w limfocycie do stabilizacji mRNA dla różnych cytokin, których produkcja wywoływana jest przez aktywację na szlaku TCR/CD3 [60]. Innym ligandem dla B7 znajdującym się na powierzchni limfocyty T jest cząsteczka CTLA4 o dotychczas nie poznanej dokładnie funkcji. Kilku laboratoriom udało się wykazać, że transfekcja komórek guza genem dla B7 powoduje znaczne zmniejszenie ich zdolności do tworzenia guza po podaniu ich syngenicznemu zwierzęciu. Dodatkowo zwierzęta te stawały się odporne na wprowadzanie do nich niemodyfikowanych komórek guza macierzystego [2,6,68]. W pracach tego typu koncentrowano się na roli B7 w fazie indukcji odpowiedzi komórkowej przeciwko antygenom nowotworowym. Ostatnio wykazano również (posługując się linią nowotworową nie wykazującą ekspresji cząsteczek MHC klasy II) udział B7 bezpośrednio w fazie efektorowej odpowiedzi immunologicznej [54]. Wiadomo również, że efekt wzmocnienia odpowiedzi komórkowej po transdukcji cząsteczki B7 do komórek szczepionki przeciwnowotworowej zależy od immunogenności samych komórek. Zdolność do tworzenia guza przez linie nowotworowe o niskiej

immunogenności jest w mniejszym stopniu ograniczana po wprowadzeniu do komórek genu dla B7 niż ma to miejsce przy liniach bardziej immunogennych [7].

Bardzo liczne są również prace, w których wykorzystuje się przenoszenie do komórek nowotworowych *ex vivo* genów dla różnych cytokin [10]. Udało się uzyskać wzmożenie odpowiedzi układu odpornościowego przeciwko komórkom nowotworowym transfekowanym genami dla IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IFN- α , INF- γ , TNF- α oraz GM-CSF [1, 18, 26, 27, 50, 53]. Różne są mechanizmy uzyskania tego efektu oraz jego nasilenie. Należy zaznaczyć, że istnieją poglądy podważające sens wprowadzania genów dla cytokin z użyciem technik przenoszenia genów. Podstawą jest fakt braku istotnych różnic między skutecznością szczepionek modyfikowanych genetycznie a podawaniem atenuowanych komórek guza wraz z adiuwantami (np. *Corynebacterium parvum*) [28]. Niemniej jednak techniki przenoszenia genów dla cytokin do komórek guza *ex vivo*, niezależnie od ich wykorzystania w klinice, są ważnym narzędziem w rękach badaczy zajmujących się rolą i mechanizmami działania poszczególnych cytokin w trakcie odpowiedzi immunologicznej przeciw nowotworowi. Postępy w tej dziedzinie stwarzają większe możliwości modelowania odpowiedzi układu odpornościowego. Dzięki tego typu badaniom udało się np. ustalić, że w skupiskach komórek nowotworowych produkujących IL-2 stwierdza się nacieki, w których skład wchodzi zarówno różne populacje limfocytów T oraz komórek NK, jak też neutrofile wraz z eozynofilami [35]. Natomiast w przypadku IL-4 guzy są w krótkim czasie (8–18 godzin) naciekane prawie wyłącznie przez eozynofile, czego następstwem jest niszczenie komórek nowotworu [66], pozwalając wnioskować o roli leukocytów kwasochłonnych stymulowanych IL-4 w reakcji układu immunologicznego na nowotwór. Oprócz wykazania stymulującego wpływu niektórych cytokin na mechanizmy obronne wycelowane w komórki guza, stwierdzono również, że część mediatorów reakcji immunologicznej nie wywiera znaczącego wpływu na ten proces (IL-5 [39], IL-10 [65]) lub też wręcz go hamuje (TGF- β_1 [67]).

Niemale znaczenie ma także ustalenie, czy efekt wywołany przez daną cytokinę ogranicza się do odpowiedzi typu lokalnego, powodującej zniszczenie komórek guza produkujących mediator oraz niespecyficznie innych komórek znajdujących się w sąsiedztwie (ang. *bystander effect*), czy też wiąże się z wywołaniem odpowiedzi systemowej przeciwko komórkom mającym te same antygeny, a znajdującym się w różnych częściach organizmu. Badania wskazują, że cytokiną działającą w pierwszym z wymienionych mechanizmów wydaje się być IL-4 [16], natomiast np. GM-CSF działa raczej potęgując odpowiedź ogólnoustrojową [16].

TECHNIKI Z WYKORZYSTANIEM SZCZEPIONEK ZAWIERAJĄCYCH KOMÓRKI NIENOWOTWOROWE

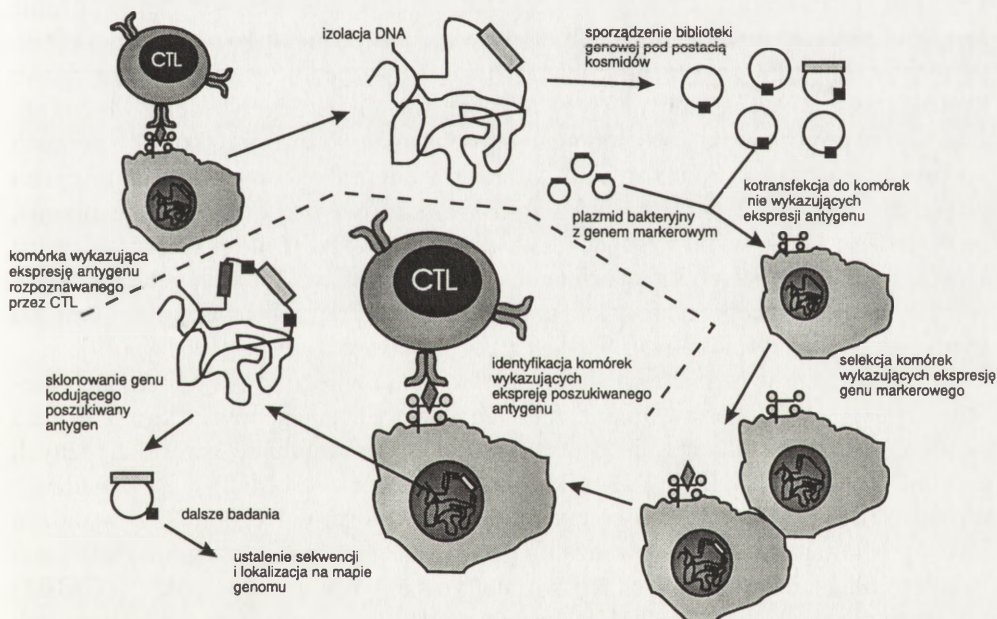
Istnieje także podejście podobne do metod szczepienia genetycznie modyfikowanymi komórkami guza, ale wykorzystujące komórki nienowotworowe. Ma to miejsce przy próbach leczenia nowotworów związanych z zakażeniem wirusami HPV, zwłaszcza typem 16. Wykazano na zwierzętach, że zastosowanie szczepionki zawierającej komórki fibroblastyczne z wprowadzonym genem dla białka E7 wirusa brodawczaka może prowadzić do wytworzenia odporności przeciwko wprowadzanym syngenicznym komórkom transformowanym wirusem HPV [8]. Próbuje się również podawać napromieniowane, niemodyfikowane komórki nowotworów zmieszane z fibroblastami, do których wprowadzano geny dla cytokin (np. IL-2 lub IL-4) [13]. Zaletą tego typu metod jest łatwość w prowadzeniu hodowli komórek fibroblastycznych w porównaniu z hodowlą różnorodnych linii wywodzących się z leczonych nowotworów.

NOWOCZESNE METODY IZOLACJI TAA

Z powodu niedoskonałości metod, w których wykorzystuje się całe komórki nowotworowe, prowadzone są wciąż prace mające na celu wyizolowanie i scharakteryzowanie TAA, zwłaszcza tych, które pozostają w związku z odpowiedzią immunologiczną typu komórkowego. Celem jest sporządzenie szczepionek uniwersalnych, których kombinacje będzie można stosować w leczeniu (a być może i w profilaktyce) różnych typów nowotworów. W chwili obecnej najlepiej poznanym pod tym względem nowotworem jest czerniak, w którym opisano na poziomie molekularnym antygeny rozpoznawane przez autologiczne, cytotoksyczne limfocyty T (CTL) [70]. Przy użyciu technik transferu genowego i techniki opartej na selekcji komórek przez swoiście uczulone cytotoksyczne limfocyty T (rys. 2) udało im się sklonować gen odpowiedzialny za ekspresję na komórkach czerniaka antygeny MZ2-E. Gen ten nazwano MAGE-1 i wykazano, że jego ekspresja zachodzi w komórkach ok. 50% czerniaków, a także kilku innych typów nowotworów, nie zachodzi natomiast w zdrowych tkankach (wyjątkiem są jądra). Antygen MZ2-E powstaje przez prezentację nonapeptydu pochodzącego z produktu genu MAGE-1 przez cząsteczkę MHC HLA-A1 [69]. Niestety kodujący ją gen nie jest najbardziej rozpowszechnionym allelem układu HLA (30% w populacji rasy kaukaskiej), a terapia przy użyciu szczepionki musiałaby się obecnie ograniczać do pacjentów wykazujących ekspresję właśnie tego allelu. Badacze liczą na to, że dzięki istnieniu sprawdzonej już metody klonowania genów dla TAA możliwa będzie identyfikacja na poziomie molekularnym kolejnych antygenów związanych z nowotworem mających znaczenie w odpowiedzi immunologicznej przeciw guzowi. Potwierdzeniem słuszności tych oczekiwań jest

sklonowanie ostatnio genu MAGE-3, odpowiadającego za ekspresję na komórkach czerniaka antygeny nazwanego MZ2-D. Należy on, podobnie jak MAGE-1 do rodziny genów MAGE, a od MAGE-1 różni się częstszym występowaniem w czerniaku (ok. 75%), co może decydować o jego większej przydatności w dalszych badaniach [19]. Wcześniej stwierdzono także występowanie odpowiedzi z udziałem CTL przeciwko fragmentom produktu genu dla tyrozynazy, enzymu biorącego udział w produkcji melaniny w melanocytach. Antygen ten prezentowany był w kontekście cząsteczki MHC HLA-A2 [4]. Kodujący ją gen jest najczęstszym allelem w populacji rasy kaukaskiej (ok. 48%), co dawałoby dużą nadzieję na potencjalne zastosowanie wyżej opisanego antygeny, niemniej jednak przed ewentualnym wprowadzeniem go do prób klinicznych należy ustalić, jakie znaczenie może mieć wywołanie odpowiedzi autoimmunologicznej przeciwko zdrowym melanocytom ludzkiego organizmu.

Prace prowadzone nad szczepionkami przeciwnowotworowymi, pozwalając na identyfikację cząsteczek istotnych dla rozwinięcia skutecznej odpowiedzi immunologicznej, mają duże znaczenie dla badaczy koncentrujących się na modyfikacji komórek guza *in vivo*.



Rys. 2. Schemat nowoczesnej metody identyfikacji genów odpowiadających za występowanie w komórkach nowotworu antygenów związanych z nowotworem (TAA), przeciwko którym możliwe jest rozwinięcie swoistej odpowiedzi immunologicznej działającej przez cytotoksyczne limfocyty T(CTL); metoda ta pozwoliła m.in. na identyfikację genów MAGE-1 oraz MAGE-3 w komórkach czerniaka człowieka

MODYFIKACJE KOMÓREK NOWOTWOROWYCH *IN VIVO*

Szczepionki nowotworowe często ograniczają liczbę nowo powstających przerzutów, natomiast o wiele rzadszym zjawiskiem jest efekt polegający na cofnięciu się przerzutów już istniejących w momencie szczepienia. Zjawisko to próbuje się wywołać przez dostarczanie do komórek guza *in vivo* "genów samobójczych", tzn. powodujących przez różnorodne mechanizmy śmierć komórek, w których zachodzi ich ekspresja.

Trudność w tych metodach sprawia opracowanie swoistej i wydajnej techniki wprowadzania genów do komórek nowotworu znajdujących się wewnątrz organizmu. Brak swoistości może dawać w rezultacie znaczne skutki uboczne terapii, natomiast zbyt niska wydajność może powodować nieskuteczność postępowania terapeutycznego. Swoistość próbuje się uzyskać łącząc wektory, przy pomocy których wprowadza się materiał genetyczny, z cząsteczkami swoiście rozpoznającymi antygeny na powierzchni komórek docelowych (np. fragmenty przeciwciał przeciwko TAA). Przykładem jest próba wprowadzania genów z użyciem retrowirusa ekotropowego (wirusy ekotropowe nie mają zdolności wnikania do ludzkich komórek) sprzężonego z przeciwciałami monoklonalnymi. Udało się w ten sposób uzyskać wprowadzenie genu do komórek, niemniej jednak metoda ta cechowała się niską wydajnością [59]. W planowaniu tego typu technik warto również uwzględnić wewnątrzkomórkowe czynniki decydujące o ekspresji wprowadzonego materiału genetycznego. Można np. zastosować promotor dla genu podlegającego wysokiej ekspresji tylko w komórkach nowotworowych (np. promotor CEA w rakach jelita grubego czy też promotor genu dla tyrozynazy w czerniakach). Jako źródło wektorów wirusowych w organizmie, zwłaszcza w modelu wykorzystującym wstrzyknięcie do guza, mogą służyć tak zwane komórki pakujące (komórki wydzielające do otoczenia wektory zawierające odpowiednie geny). Postępowanie takie ma miejsce np. przy wprowadzaniu genu dla wirusowej kinazy tymidynowej (HSV-TK) do guzów mózgu (patrz dalej) [49].

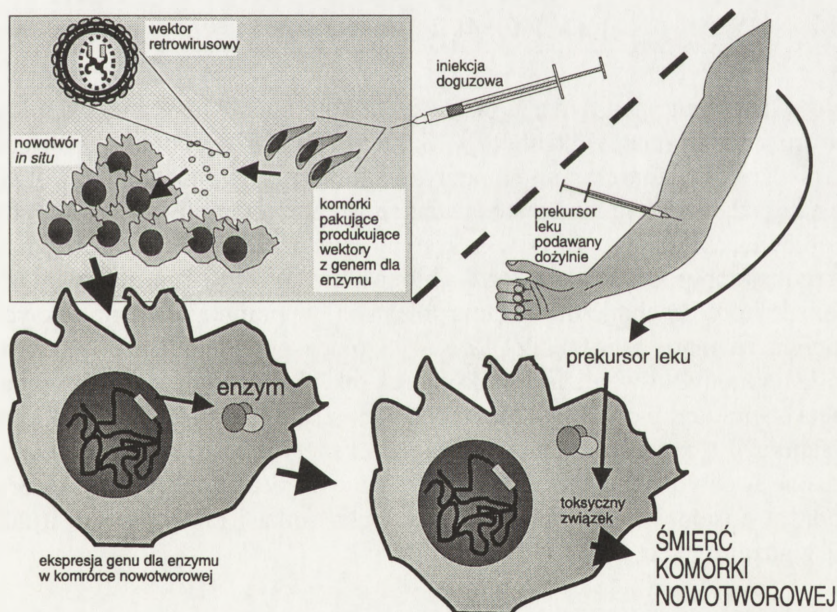
Repertuar genów nadających się do zastosowania w tego rodzaju metodach częściowo pokrywa się z zestawem w technikach wprowadzania genów do komórek guza *ex vivo* (tab. 1). Kandydatami o potencjalnym zastosowaniu są geny dla różnych cytokin, np. IL-2, IL-4, IL-7, INF- γ , TNF- α , GM-CSF czy też MCP-1. Dużą nadzieję wzbudza IL-4 jako cytokina o potencjalnej użyteczności w leczeniu guzów mózgu [66,74]. Alternatywą dla wprowadzania genów dla cytokin są strategie wykorzystujące geny dla białek wirusowych, kostymulatorów aktywacji limfocytów T (B7/BB1) lub allogeniczných cząsteczek MHC, w celu zwiększenia immunogenności komórek guza. U ludzi podjęto próby terapii, w których podawano doguzowo do powierzchniowych skupisk komórek czerniaka gen dla cząsteczki MHC klasy I HLA-B7 (u osób nie mających tego allelu) pod postacią plazmidów zamkniętych w liposomach [48].

Zastosowanie genów dla cząsteczek stymulujących opowiedź systemową przeciwko TAA pozwala mieć nadzieję, że oprócz wywołania efektu cytotoksycznego w

stosunku do komórek, w których zachodzi ekspresja wprowadzonych genów, uda się również spowodować eliminację komórek nowotworowych, do których nie powiodło się wprowadzenie genu, a znajdujących się w zasięgu pobudzonych mechanizmów układu immunologicznego (ang. *bystander effect*). Ma to szczególne znaczenie przy uwzględnieniu niskiej wydajności obecnie stosowanych technik wprowadzania genów *in vivo*. Z tych też względów istnieją sądy stwierdzające, że nie miałyby sensu stosowanie genów supresji guza (patrz dalej) lub genów dla toksyn niewydzielniczych [61], gdyż według tych opinii nie są one w stanie wywoływać tego typu efektu.

TERAPIA W SYSTEMIE ENZYME-PRODRUG

Niejako zaprzeczeniem stwierdzenia kończącego poprzedni akapit jest podejście nazywane w skrócie VDEPT. Polega ono na wprowadzeniu do organizmu wektora składającego się z promotora dla genu podlegającego wysokiej ekspresji selektywnie w komórkach nowotworowych w połączeniu z genem dla enzymu powodującego powstanie z nietoksycznej substancji (ang. *prodrug*) związku powodującego śmierć komórki (rys. 3). Enzymami branyymi pod uwagę są np. dezaminaza cytozyny (prze-



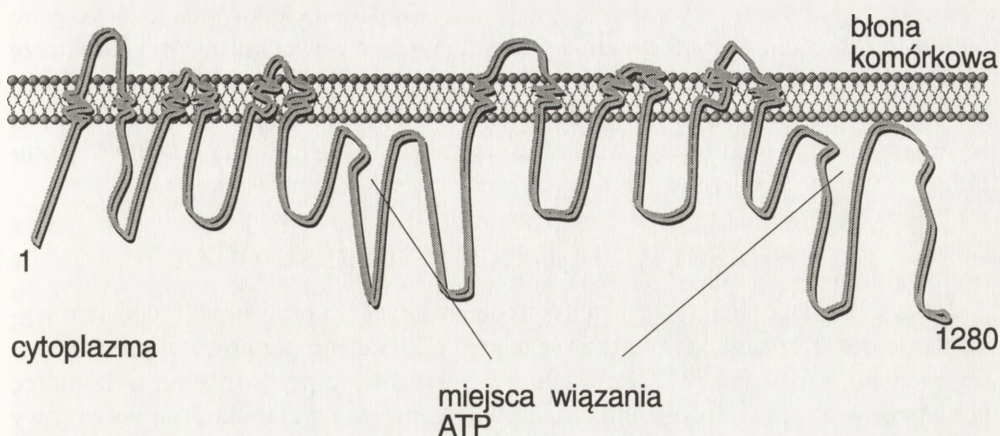
Rys. 3. Schemat terapii genowej nowotworów w systemie VDEPT; największe nadzieje pokłada się obecnie w wykorzystaniu tego rodzaju strategii w leczeniu nowotworów mózgu

tworząca 5-fluorocytozynę w 5-fluorouracyl [47]) czy też kinaza tymidynowa wirusów opryszczki HSV-TK (przetwarzająca wraz z normalnymi enzymami komórek ssaków gancyklowir w jego toksyczną pochodną [14]). Ciekawym zjawiskiem jest zaobserwowanie efektu zabijania komórek sąsiednich (*bystander effect*) przy zastosowaniu tego rodzaju metod [14]. Nie jest do końca poznany mechanizm odpowiedzialny za ten efekt, jednakże główną rolę wydaje się odgrywać dyfuzja toksycznego związku z komórek transdukowanych genem dla enzymu aktywującego go do komórek sąsiadujących. Dalsze badania wykazały dosyć dużą skalę tego zjawiska. Przypuszcza się mianowicie, że przy wywołaniu ekspresji genu dla HSV-TK w 10% komórek guza w 50% przypadków możemy spodziewać się całkowitej eliminacji nowotworu [13].

Ogromną zaletą VDEPT jest również brak zauważalnej systemowej toksyczności wprowadzonych leków. Naturalnym następstwem tak obiecujących rezultatów na modelach zwierzęcych (głównie na szczurach) są próby wprowadzenia VDEPT do badań klinicznych. Obecnie w Stanach Zjednoczonych zostały zatwierdzone cztery badania kliniczne wykorzystujące wyżej opisaną technikę w leczeniu guzów ośrodkowego układu nerwowego [13].

WPROWADZANIE GENU OPORNOŚCI NA LEKI DO KOMÓREK SZPIKU

Jak już wspomiano, jednym z największych problemów klasycznej chemioterapii nowotworów są ogromne skutki uboczne. Szczególnie wrażliwy na antyproliferacyjne i cytotoksyczne działanie chemioterapeutyków jest szpik. Istnieją linie nowotworowe odporne na działanie wielu leków stosowanych w chemioterapii (np. daunorubicyny, doksorubicyny, aktynomycyny D, winkrystyny i innych). Białkiem odpowiedzialnym za tego rodzaju oporność jest cząsteczka błonowa MDR-1 (nazywana również P-glikoproteina), której mechanizm działania polega na "wypompowywaniu" toksycznych substancji na zewnątrz komórki [21] (rys. 4). Izolacja genu kodującego tę cząsteczkę pozwoliła na modyfikowanie innych komórek tak, aby również stawały się bardziej odporne na chemioterapię. Kandydatami do takich zabiegów stały się komórki macierzyste szpiku. Po przeprowadzeniu udanych eksperymentów na zwierzętach [45] prowadzone w chwili obecnej są badania kliniczne mające na celu ocenę skuteczności tego rodzaju postępowania w chemioterapii raka sutka i raka jajnika, a także u chorych z guzami mózgu [13].



Rys. 4. Schemat ułożenia 1280-aminokwasowej cząsteczki MDR-1 w błonie komórkowej; cząsteczka ta jest ATP-zależnym kanałem błonowym "wypompowującym" z komórki toksyczne związki, np. stosowane w chemioterapii nowotworów: daunorubicynę, winkrystynę czy aktynomycynę D; terapie genowe związane z tą molekułą mają na celu zmniejszenie jej ekspresji w komórkach nowotworowych bądź też zwiększenie oporności szpiku na skutki uboczne chemioterapii (dalszy opis w tekście)

"NAPRAWA" GENETYCZNA

Przez kilkanaście ostatnich lat świat nauki starał się coraz wnikliwiej badać zjawiska molekularne prowadzące do przejścia zdrowej komórki w nowotworową. Wiadomo obecnie, że wiele tych zjawisk dotyczy zaburzenia równowagi pomiędzy kontrolą pozytywną a negatywną mechanizmów podziału komórkowego, a także na niewłaściwej kontroli procesów różnicowania komórki. Do tego dochodzą zmiany decydujące o powstawaniu "złośliwego" charakteru transformacji nowotworowej (nabycie zdolności do naciekania zdrowych tkanek i dawania przerzutów). Winą za tego typu zmiany obarcza się mutacje zachodzące z różnych przyczyn w obrębie genomu komórki. Mutacje onkogenów (genów kodujących czynniki decydujące o pozytywnej regulacji podziału komórki) prowadzą do ich nadmiernej aktywacji. Aby zaszła transformacja nowotworowa komórki, oprócz aktywacji onkogenów muszą ulec inaktywacji geny nazywane antyonkogenami lub genami supresji guza (ang. *tumor suppressor genes*, związane z regulacją negatywną wzrostu komórkowego [29]) [37]. Obraz ten jest znacznym uproszczeniem w stosunku do obecnego stanu wiedzy, niemniej jednak pozwala zrozumieć ideę modeli terapeutycznych ingerujących w tę zaburzoną równowagę wewnątrzkomórkową. Należy oczywiście nadmie-

nić, że proces przejścia w komórkę nowotworową jest procesem wieloetapowym i mutacja w obrębie tylko jednego genu nie powinna nigdy prowadzić do pełnej transformacji komórki. Z tych też względów korekcja funkcjonowania jednego genu nie może odwrócić wszystkich zmian decydujących o nowotworowym charakterze wzrostu komórkowego. Jednakże wydaje się, że nawet częściowe osłabienie "złośliwości" nowotworu może mieć znaczenie w leczeniu tej choroby. Poza tym niewątpliwym atutem prac tego typu jest nabywanie coraz szerszej wiedzy na temat skomplikowanych mechanizmów rządzących regulacją cyklu komórkowego.

1. SUBSTYTUCJA GENAMI SUPRESJI GUZA

Jak wspomniano, inaktywacja antyonkogenu zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia transformacji nowotworowej lub też nasila charakter nowotworowej transformacji już zaistniałej [37]. Pozwala przypuszczać, że przywrócenie w komórce nowotworowej prawidłowej funkcji antyonkogenu osłabi charakter nowotworowy wzrostu takiej komórki. Naturalnym następstwem takiego założenia są terapie polegające na substytucji prawidłowymi genami supresji guza komórek nie wykazujących ich właściwej ekspresji. Wiadomo, że wprowadzenie dzikiego typu białka dla p53 (zmiany w obrębie ekspresji tego genu występują w ok. 50% nowotworów człowieka [44]) do komórek nowotworowych może osłabiać ich wzrost i zdolność do tworzenia guza przez te komórki. Co więcej, zwiększenie ekspresji dzikiego typu genu dla p53 w komórkach nienowotworowych nie wydaje się wywierać na nie znaczącego wpływu szkodliwego [24]. Dawałoby to nadzieję na potencjalnie małą toksyczność ogólnoustrojową technik związanych z transdukcją komórek nowotworowych tym właśnie genem supresji guza. Być może fakt ten miałby znaczenie przy uwzględnieniu problemów związanych z selektywnością wprowadzania genów do komórek guza *in situ*. Białko p53 jest najlepiej opisanym pod względem funkcjonalnym produktem genu supresji guza, ale oprócz niego sklonowano siedem innych antyonkogenów (oznaczonych skrótami RB1, WT1, VHL, APC, DCC, NFI oraz NF2), a kilka następnych udało się umieścić na mapie genowej człowieka [37]. Dalsze prace nad tym zagadnieniem pozwolą być może na szersze wykorzystanie wyżej przedstawionych genów w terapii genowej nowotworów. Obecnie w Stanach Zjednoczonych trwa debata nad wprowadzeniem wektora retrowirusowego zawierającego gen dla p53 do terapii raka płuc [34].

2. TERAPIA OLIGONUKLEOTYDAMI ANTYSSENSOWYMI

Oligonukleotydy antysensowe są krótkimi (9–25 nukleotydów) odcinkami kwasów nukleinowych o sekwencji komplementarnej do fragmentu genu, którego ekspresja ma być w trakcie terapii zahamowana. Mechanizm ich działania nie jest jeszcze dokładnie poznany, wiadomo jednak, że wiąże się on z zaburzeniem przekazywania informacji na szlaku gen-białko [63]. Przypuszczalnymi zjawiskami o znaczeniu

terapeutycznym, które zachodzą po wprowadzeniu oligonukleotydów antysensownych do komórki są:

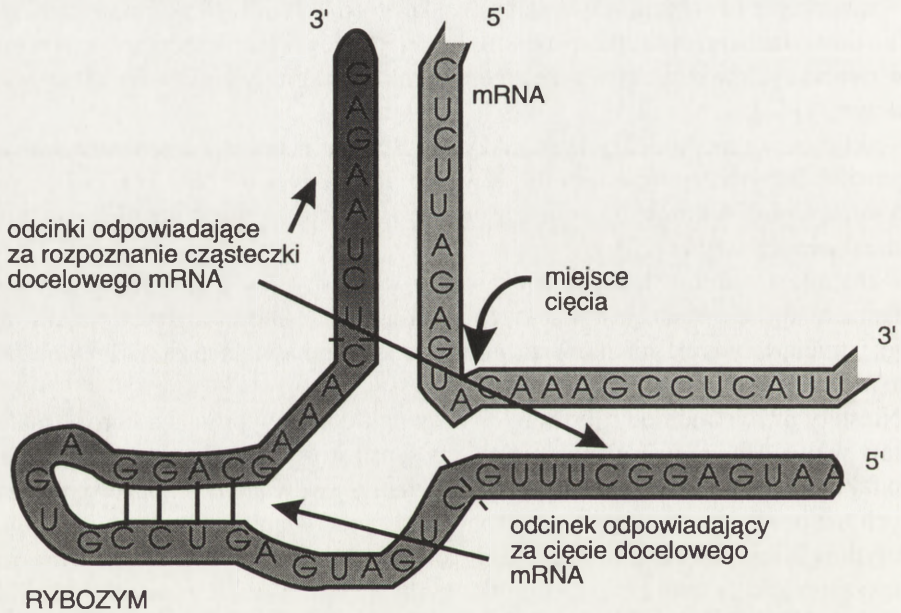
- tworzenie potrójnej helisy w obrębie DNA genomowego [64]; rezultatem jest zaburzenie transkrypcji odcinka rozpoznawanego przez sekwencję oligonukleotydu;
- interferencja z poliadenylacją mRNA na końcu 3' oraz z procesem przyłączania czapeczki do końca 5' (ang. *5' capping*); oligonukleotydy zaprojektowane dla blokowania tych procesów również wykazują działanie biologiczne [9, 73];
- zaburzenie cięcia i składania pierwotnego transkryptu (ang. *mRNA splicing*); znane są biologicznie aktywne oligonukleotydy zaprojektowane tak, aby rozpoznawały miejsca istotne dla cięcia i składania mRNA (ang. *splice junctions*), nie zgromadzono jednak dotychczas wystarczających dowodów na taki właśnie mechanizm ich działania [11];
- zaburzenie tworzenia trójwymiarowej konformacji mRNA; koncepcja ta opiera się na dowodach dużej skuteczności oligonukleotydów komplementarnych do regionów tworzących w strukturze przestrzennej mRNA regiony pętlowe (ang. *stem-loop structures*) [41];
- aktywacja rybonukleazy H (RNAzy H); RNAza H jest enzymem komórkowym odpowiedzialnym za cięcie nici RNA w kompleksie DNA-RNA; utworzenie przez antysensowne DNA kompleksu z interesującym nas mRNA może czynić je podatnym na działanie RNAzy H [20];
- zahamowanie translacji; duża część oligonukleotydów stosowanych obecnie w badaniach "wycelowana" jest w sekwencje zawierające kodon rozpoczynający translację; istnieją w tym przypadku wiarygodne dane przemawiające za wyżej wymienionym mechanizmem ich działania [11].

Niestety użycie niemodyfikowanych oligonukleotydów przynosi bardzo małe rezultaty w pracach *in vitro*, a zupełnie nie ma sensu stosowanie ich *in vivo*. Przyczyna tego faktu leży m.in. w ich podatności na zewnątrz- i wewnątrzkomórkowe nukleazy. Z tych też powodów trwają poszukiwania nad opracowaniem pochodnych oligonukleotydów zdolnych do ominięcia tego rodzaju przeszkód [15], a także mających zwiększoną siłę łączenia się z komórkowymi kwasami nukleinowymi [62]. Takie właśnie pochodne oligonukleotydów wykorzystywane są w pracach badawczych [55]. Prace z wykorzystaniem oligonukleotydów antysensownych w próbach terapii nowotworów (zwłaszcza *in vitro*) są obecnie bardzo liczne. Próbuje się również np. wprowadzić sekwencję antysensowną dla ludzkiego K-ras do terapii raka płuc u ludzi [34].

3. WYKORZYSTANIE RYBOZYMÓW

Rybozimy są krótkimi odcinkami kwasu rybonukleinowego (RNA), które mają zdolność do cięcia fragmentów RNA, rozpoznając uprzednio sekwencję swojego substratu i dokonując cięcia w ściśle określonym miejscu, znajdującym się po sekwencji nukleotydów GUA, GUC bądź GUU. W terapii genowej najczęściej używa się

tw. *hammerhead ribozymes* zawierających konserwatywny region 24-nukleotydo-
wy, po obu stronach którego znajdują się co najmniej 8-nukleotydo-
we sekwencje komplementarne do regionów znajdujących się w kierunku 5' i 3'
od miejsca cięcia na docelowej cząsteczce RNA [40] (rys. 5). Inżynieria genetyczna,
dając możliwość umieszczania w tych bocznych regionach dowolnych sekwencji
nukleotydowych, czyni z rybozymów bardzo kuszące narzędzie służące do
ingerowania w ekspresję genów w komórce. W tenże właśnie sposób próbuje się
wykorzystywać rybozimy w laboratoriach, próbując np. zaburzać ekspresję
onkogenu *H-ras* [36] bądź też sekwencji *bcr-abl* w chromosomie Philadelphia
(odpowiedzialnej za powstawanie ponad 95% przypadków przewlekłej
białaczki szpikowej) [40]. Skonstruowano również rybozimy interferujące z
ekspresją cząsteczki MDR-1 (patrz wyżej) w komórkach nowotworowych,
przez co stawały się one mniej odporne na chemioterapeutyki [38].



Rys. 5. Schemat działania rybozimu na docelową cząsteczkę mRNA

PODSUMOWANIE

Genetyka molekularna, a wraz z nią techniki określane wspólną nazwą terapii genowej, jest bardzo młodą dziedziną nauki. Niemniej jednak w ciągu ostatnich lat dokonał się na tym polu znaczący postęp. Z tą dziedziną wiedzy związane są ogromne nadzieje, gdyż wnika ona w podłoże chorób najbardziej, jak to jest obecnie możliwe, dając nadzieję na bezpośrednią korekcję ich przyczyn. Z tych też względów świat

TABELA 1. Przykłady zatwierdzonych prób klinicznych z wykorzystaniem technik terapii genowej w leczeniu nowotworów u ludzi [12]

Gen	Komórka	Nowotwór
Rodzaj strategii – wykorzystujące komórki pobrane <i>ex vivo</i>		
TNF	TIL	czerniak złośliwy
IL-2, TNF	komórka nowotworowa	rak jelita grubego
IL-2, TNF	jw.	czerniak złośliwy
B7 (CD80)	jw.	jw.
IL-2	jw.	neuroblastoma
antysensowy IGF-1	jw.	guzy mózgu
IL-2, TNF, GM-CSF	jw.	rak nerki
IL-2	jw.	rak płuca
IL-4	fibroblasty	rak sutka
IL-2, IL-4	jw.	rak jelita grubego
IL-4	jw.	czerniak złośliwy
IL-4	jw.	rak nerki
MDR-1	komórka macierzysta szpiku	guzy mózgu
MDR-1	jw.	rak sutka
MDR-1	jw.	rak jajnika
Rodzaj strategii –transfer genu <i>in vivo</i>		
HLA-B7 + β 2mikroglobulina	komórka nowotworowa	rak jelita grubego
HLA-B7 + β 2mikroglobulina	jw.	guzy lite
HLA-B7 + β 2mikroglobulina lub HLA-B7	jw.	czerniak złośliwy
HSV-TK	jw.	guzy mózgu
HSV-TK	jw.	rak jajnika
antysensowy K-ras, dziki typ p53	jw.	rak płuc

nauki z niecierpliwością oczekuje na wyniki prowadzonych prac badawczych. W dużej części z nich skoncentrowano się na jednej z najbardziej zagrażających życiu chorób – na nowotworze. W tym artykule starano się przybliżyć strategię obecnie istniejącą w tej dziedzinie. Skuteczność niektórych z tych strategii stara się obecnie oceniać w terapii nowotworów w klinice (tab. 1). Rezultaty uzyskiwane w tego rodzaju badaniach pozwalają mieć nadzieję, że być może niebawem metody wykorzystujące wprowadzanie materiału genetycznego do komórek wkroczą z dobrymi wynikami do codziennej praktyki onkologicznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ASCHER AL, MULE JJ, KASID A, RESTIFO NP, SALO JC, REICHERT CM, JAFFE G, FENDLY B, KRIEGLER M, ROSENBERG SA. Murine tumor cells transduced with the gene for tumor necrosis factor. *J Immunol* 1991; **146**: 3227–3234.

- [2] BASKAR S, OSTRANDROSENBERG S, NABAVI N, NADLER LM, FREEMAN GJ, GLIMCHER LH. Constitutive expression of B7 restores immunogenicity of tumor cells expressing truncated major histocompatibility complex class II molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5687–5690.
- [3] BERAL V. The epidemiology of cancer in AIDS patients. *AIDS* 1991; **5**: 99–103.
- [4] BRICHARD U, van PEL A, WÖLFEL T, WÖLFEL C, de PLAEN E, LETHÉ B, COULIE P, BOON T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on HLAA2 melanoma. *J Exp Med* 1993; **178**: 489–495.
- [5] CEPKO C, ROBERTS BE, MULLIGAN RC. Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector. *Cell* 1984; **37**: 1053–1062.
- [6] CHEN L, ASHE S, BRADY WA, HELLSTRÖM I, HELLSTRÖM KE, LADBETTERJA, MCGOWAN P, LINSLEY P. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA4. *Cell* 1992; **71**: 1093–1102.
- [7] CHEN L, MCGOWAN P, ASHE S, JOHNSTON J, LI Y, HELLSTRÖM I, HELLSTRÖM KE. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; **179**: 523–532.
- [8] CHEN L, THOMAS EK, HU S, HELLSTRÖM I, HELLSTRÖM KE. Human papilloma virus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 110–114.
- [9] CHIANG MY, CHAN H, ZOUNES MA, FREIER SM, LIMA WF, BENNETT CF. Antisense oligonucleotides inhibit intracellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1991; **266**: 18162–18171.
- [10] COLOMBO MP, GUIDO F. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? *Immunol Today* 1994; **15**: 4851.
- [11] CROOKE ST. Progress toward oligonucleotide therapeutics: Pharmacodynamic properties. *FASEB J* 1993; **7**: 533–539.
- [12] CULVER KW. Clinical applications of gene therapy for cancer. *Clin Chem* 1994; **40**: 510–512.
- [13] CULVER KW, BLEASE RM. Gene therapy for cancer. *TIG* 1994; **10**: 174–178.
- [14] CULVER KW, RAM Z, WALLBRIDGE S, ISHII H, OLDFIELD EH, BLEASE RM. *In vivo* gene transfer with retroviral vectorproducer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; **256**: 1550–1552.
- [15] DOLNICK BJ. Antisense agents in cancer research and therapeutics. *Cancer Invest* 1991; **9**: 185–194.
- [16] DRANOFF G, JAFFEE E, LAZENBY A, GOLUMBEK P, LEVITSKY H, BROSE K, JACKSON V, HAMADA H, PARDOLL D, MULLIGAN RC. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte macrophage colony stimulating factor stimulates potent, specific, and longlasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 3539–3543.
- [17] ESHAR Z, WAKS T, GROSS G, SCHINDLER DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chain consisting of antibody binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T cell receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 720–724.
- [18] FERRATINI M, PROIETTIE, SANTODONATO L, GABRIELLE L, PERRTTI M, PLAVEC I, MEYER F, KAIDO T, GRESSER I, BELARDELLI F. Alpha 1-interferon gene transfer into metastatic Friend leukaemia cells abrogated tumorigenicity in immunocompetent mice: anti-tumor therapy by means of interferon-producing cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 1107–1112.
- [19] GAUGLER B, VAN DEN EYNDE B, VAN DER BRUGGEN P, ROMERO P, GAFORIO JJ, DE PLAEN, LETHÉ B, BRASSEUR F, BOON T. Human gene MAGE-3 codes for antigen recognized on a melanoma by autologous cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; **179**: 921–930.

- [20]GILES RV, SPILLER DG, TIDD MD. Chimeric oligodeoxynucleotide analogues: enhanced cell uptake of structures which direct ribonuclease H with high specificity. *Anticancer Drug Des* 1993; **8**: 33–51.
- [21]GOTTESMAN MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture. *Cancer Res* 1993; **53**: 747–754.
- [22]GREENBERG PD. Adoptive T cell therapy of tumors: Mechanism operative in the recognition and elimination of tumors. *Adv Immunol* 1991; **49**: 281–355.
- [23]HANNA MG, PETERS LC. Specific immunotherapy of established visceral metastases by BCG-tumor cell alone as an adjunct to surgery. *Cancer* 1978; **42**: 2613–2625.
- [24]HARRIS CC, HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Engl J Med* 1993; **329**: 1318–1327.
- [25]HEATON KM, GRIMM EA. Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. *Cancer Immunol Immunother* 1993; **37**: 213–219.
- [26]HOCK H, DORSCH M, DIAMANSTEIN T, BLANKENSTEIN T. Interleukin 7 induces CD4⁺ T cell-dependent tumor rejection. *J Exp Med* 1991; **174**: 1291–1298.
- [27]HOCK H, DORSCH M, KUNZENDORF U, QIN Z, DIAMANSTEIN T, BLANKENSTEIN T. Mechanisms of rejection induced by tumor cell-targeted gene transfer of interleukin 2, interleukin 4, interleukin 7, tumor necrosis factor, or interferon. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 2774–2778.
- [28]HOCK H, DORSCH M, KUNZENDORF U, ÜBERLA K, QIN Z, DIAMANSTEIN T, BLANKENSTEIN T. Vaccinations with tumor cells genetically engineered to produce different cytokines: effectivity not superior to a classical adjuvant. *Cancer Res* 1993; **53**: 714–716.
- [29]HORST A. Działanie produktów genów przeciwnowotworowych w aspekcie cyklu komórkowego. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 311–329.
- [30]HUI K, GROVELD F, FESTENSTEIN H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984; **311**: 750–752.
- [31]HWU P, YANELLI J, KRIEGLER M, ANDERSON WF, PEREZ C, CHIANG Y, SCHWARZ S, COWHERD R, DELGADO C, MULE J, ROSENBERG SA. Functional and molecular characterisation of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-cDNA for the gene therapy of cancer in humans. *J Immunol* 1993; **150**: 4104–4115.
- [32]ISRAEL MA. Molecular approaches to cancer therapy. *Adv Cancer Res* 1993; **61**: 57–85.
- [33]JASS JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986; **39**: 585–589.
- [34]JENKS S. Gene therapy for lung cancer still on hold. *J Natl Cancer Inst* 1994; **86**: 486
- [35]KARP SE, FARBER A, SALO JC, HWU P, JAFFE G, ASHER AL, SHILONI E, RESTIFO NP, MULE JJ, ROSENBERG SA. Cytokine secretion by genetically modified nonimmunogenic murine fibrosarcoma. Tumor inhibition by IL-2 but not by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1993; **150**: 896–908.
- [36]KASHANI-SABET M, FUNATO T, FLORENES VA, FODSTADO, SCANLON K. Suppression of the neoplastic phenotype in vivo by an anti-ras ribozyme. *Cancer Res* 1994; **54**: 900–902.
- [37]KNUDSON AG. Antioncogens and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10914–10921
- [38]KOBAYASHI K, DORAI T, HOLLAND JF, OHNUMA T. Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res* 1994; **54**: 1271–1275.
- [39]KRÜGER-KRASAGAKES SW, LI W, RICHTER G, DIAMENTSTEIN T, BLANKENSTEIN T. Eosinophils infiltrating interleukin-5 gene-transfected tumors do not suppress tumor growth. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 992–995
- [40]LANGE W, CANTIN EM, FINKE J, DÖLKEN G. *In vitro* and *in vivo* effects of synthetic ribozymes targeted against BCR/ABL mRNA. *Leukemia* 1993; **7**: 1786–1794.

- [41]LIMA WF, MONIA BP, ECKER DJ, FREIER SM. Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics. *Biochemistry* 1992; **32**: 12055–12061.
- [42]LINSLEY PS, BRADY W, GROSMARE L, ARUFFO A, DAMLE NK, LADBETTER JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin-2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991; **173**: 721–730.
- [43]LINSLEY PS, CLARK EA, LEDBETTER JA. T cell antigen, CD28, mediates adhesion with B cells by interacting with the activation antigen B7/BB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 5031–5035.
- [44]MARX J. Learning how to suppress cancer. *Science* 1993; **261**: 1385–1387.
- [45]MCLACHLIN JR, EGLITIS MA, UEDA K, KANTOFF PW, PASTAN IH, ANDERSON WF, GOTTESMAN MM. Expression of human complementary DNA for the multidrug resistance gene in murine hematopoietic precursor cells with the use of retroviral gene transfer *J Natl Cancer Inst* 1990; **82**: 1260–1263.
- [46]MEDEIROS LJ, PICKER LJ, GELB AB, STRICKLER JG, BRAIN SW, WEISS LM, HORNING SJ, WARNKER A. Number of 'host' helper T lymphocytes and proliferating cells predict survival in diffuse small cell lymphomas. *J Clin Oncol* 1989; **7**: 1009–10017.
- [47]MULLEN CA, KILSTRUP M, BLAESE RM. Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine; a negative selection system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 33–37.
- [48]NABEL GJ, CHANG A, NABEL EG. Clinical protocol: Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 399–410.
- [49]OLDFIELD EH, RAM Z, CULVER KW, BLEASE RM, DEVROOM HL, ANDERSON WF. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 39–69.
- [50]PARDOLL DM. Cancer vaccines. *Immunol Today* 1993; **14**: 310–316.
- [51]PARDOLL DM. New strategies for active immunotherapy with genetically engineered tumor cells. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 619–623.
- [52]PENN I. Cancers complicating organ transplantation. *N Engl J Med* 1990; **323**: 1967–1968.
- [53]PORGADOR A, TZEHOVAL, VADAI E. Immunotherapy via gene therapy: comparison of the effect of tumor cells transduced with the interleukin-2, interleukin-6, or interferon- genes. *J Immunol* 1993; **14**: 191–201.
- [54]RAMARATHINAM L, CASTLE M, WU Y, LIU Y. T cell costimulation by B7/BB1 induces CD8 T cell-dependent tumor rejection: an important role of B7/BB1 in the induction, recruitment, and effector function of antitumor T cells. *J Exp Med* 1994; **179**: 1205–1214.
- [55]RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T. Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 177–196.
- [56]ROSENBERG SA, AEBERSOLD P, CORNETTA K, KASID A, MORGAN RA, MOEN R, KARSON EM, LOTZE M, YANG JC, TOPALIAN SL, MERINO MJ, CULVER K, MILLER AD, BLEASE M, ANDERSON WF. Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; **323**: 570–578.
- [57]ROSENBERG SA, PACKARD BS, AEBERSOLD P, SOLOMON D, TOPALIAN SL, TOY ST, SIMON P, LOTZE M, YANG JC, SEIPP CA, SIMPSON C, CARTER C, BOCK S, SCHWARTZENTRUBER D, WIE JP, WHITE WE. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma, a preliminary report. *N Engl J Med* 1988; **319**: 1676–1680.
- [58]ROSENBERG SA, SPIESS P, LAFRENIERE R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986; **223**: 1318–1321.
- [59]ROUX P, JEANTEUR P, PIEKARCZYK M. A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: Application to the infection of human cells

- by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukaemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 9079–9083.
- [60]RUDD CE, JANSSEN O, CAI Y, DA SILVA AJ, RAAB M, PRASAD KVS. Two-step TCR/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today* 1994; **15**: 225–234.
- [61]RUSSEL SJ. Gene therapy for cancer. *Cancer J* 1993; **6**: 21–25.
- [62]SAISON-BEHMOARAS T, TOCQUÉ, REY I, CHASSIGNOL M, THUONG NT, HELENE C. Short modified antisense oligonucleotides directed against Ha-ras point mutation induce selective cleavage of the mRNA and inhibit T24 cells proliferation. *EMBO J* 1991; **10**: 1111–1118.
- [63]SZKLARCZYK A. Mechanizmy działania antysensownych oligodeoksyrybonukleotydów. *Postępy Bioch* 1994; **40**: 166–174.
- [64]SZKLARCZYK A. Oligodeoksyrybonukleotydy jako narzędzie specyficznej regulacji transkrypcji genów. *Postępy Bioch* 1993; **39**: 221–227.
- [65]TEPPER RI, MULE JJ. Experimental and clinical studies of cytokine gene modified tumor cells. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 153–164.
- [66]TEPPER RI, PATTENGAL PK, LEDER P. Murine interleukin-4 displays potent antitumor activity *in vivo*. *Cell* 1989; **57**: 503–552.
- [67]TORRE-AMIONE G, BEAUCHAMP RD, KOEPPEN H, PARK BH, SCHREIBER H, MOSES HL, ROWLEY DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1486–1490.
- [68]TOWNSEND S, ALLISON JP. Tumor rejection after direct costimulation of CD8⁺ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 1993; **259**: 368–372.
- [69]TRANVERSARI K, VAN DER BRUGGEN P, LUESCHER IF, LURQUIN C, CHOMEZ P, VAN PEL A, DE PLAEN E, AMAR-COSTESECC A, BOON T. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J Exp Med* 1992; **176**: 1453–1457.
- [70]VAN DER BRUGGEN P, TRANVERSARI C, CHOMEZ P, LURQUIN C, DE PLAEN E, VAN DEN EYNDE B, KNUTH A, BOON T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; **254**: 1643–1647.
- [71]WALLICH R, BULBUC N, HÄMMERLING GJ, KATZAV S, FELDMAN M. Abrogation of metastatic properties of tumor cells by the novo expression of H-2K antigens following to H-2 gene transfection. *Nature* 1984; **311**: 750–752.
- [72]WEBER JS, ROSENBERG SA. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 1991; **11**: 381–400.
- [73]WESTERMAN P, GROSS B, HOINKIN G. Inhibition of expression of SV40 virus large T-antigen by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Biomed Biochim Acta* 1989; **48**: 85–93.
- [74]YU JS, WEI XM, CHIOCCA A, MARTUZA RI, TEPPER RI. Treatment of glioma by engineered interleukin 4-secreting cells. *Cancer Res* 1993; **53**: 3125–3128.

Otrzymano: 21.07.1994 r.

Przyjęto: 12.10.1994 r.

Adres autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5

PORYNA MITOCHONDRIALNA – KANAŁ VDAC*

MITOCHONDRIAL PORIN – VDAC CHANNEL.

Hanna KMITA, Jan MICHEJDA

Zakład Bioenergetyki, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Streszczenie. Poryna mitochondrialna jest głównym białkiem tworzącym kanały (VDAC – *voltage dependent anion selective channel*) w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Kanały te izolowane z mitochondriów różnych tkanek i organizmów i rekonstruowane w sztuczne błonki wykazują konserwatywność swych podstawowych właściwości: (i) średnica kanału; (ii) wartość przewodnictwa pojedynczego kanału; (iii) zależność od potencjału; (iv) zmiany selektywności związane ze stanem funkcjonalnym. Istnienie szeregu czynników wpływających na stan funkcjonalny kanału VDAC sugeruje, że białko to odgrywa podstawową rolę w regulacji metabolicznych i energetycznych funkcji mitochondriów. W artykule omówiono biogenezę, strukturę, właściwości elektryczne i regulację kanałów VDAC oraz ich udział w funkcjonowaniu mitochondriów. Przedstawiono także bioenergetyczne konsekwencje braku VDAC w mitochondriach mutantów bezporynowych.

Słowa kluczowe: kanał VDAC (poryna mitochondrialna), transport metabolitów, mutanty bezporynowe.

Summary. Mitochondrial porin is the major integral protein of outer mitochondrial membrane. Incorporated in artificial lipid bilayers it forms voltage-dependent anion selective channel (VDAC). VDAC channels isolated from different tissues and organisms reveal strong similarity of their basic properties: (i) channel diameter; (ii) value of single channel conductance; (iii) voltage dependence; (iv) selectivity changes connected with the functional state. The existence of many factors (native or artificial) influencing functional state of VDAC channel suggests that this protein is vital for energetic and metabolic functions of mitochondria. This article summarizes the recent information on biogenesis, structure, electrical properties and regulation of VDAC channel as well as on its role in transport of metabolites to mitochondria. Finally, bioenergetic consequences of the absence of VDAC in mutant mitochondria are described.

Key words: VDAC channel (mitochondrial porin), transport of metabolites VDAC-depleted mutants

*Praca finansowana z grantu KBN 2223/4/91.

WPROWADZENIE

Poryna mitochondrialna jest dominującym ilościowo, integralnym białkiem zewnętrznej błony mitochondrialnej [7]. Ze względu na to, iż po rekonstytucji w sztuczne błony lipidowe tworzy ona regulowane potencjałem kanały o selektywności anionowej, nazywana jest również VDAC (z ang. *voltage dependent anion selective channel*) [19,86]. Podobnie jak poryny bakteryjne, występujące u bakterii Gram ujemnych, poryna mitochondrialna umożliwia transport cząsteczek polarnych przez błonę [5]. Białka te mają także podobną strukturę drugorzędową (struktura β), co odróżnia je od innych białek błonowych, w których przypadku przeważa struktura α -helisy [5,6,30,51,101,104]. Jednakże szczegółowe badanie homologii tych białek doprowadziło do wniosku, iż są to cząsteczki odległe ewolucyjnie [6,35,67]. Istnieje natomiast możliwość ewolucyjnego pokrewieństwa między poryną mitochondrialną i pewnymi organellowymi białkami transportującymi, zlokalizowanymi w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [3,51] lub w otoczce chloroplastowej [84]. Niejasnym jest dotąd, czy VDAC występujący w błonach komórkowych niektórych komórek jest identyczny z VDAC mitochondrialnym [7,96].

Poryna mitochondrialna kodowana jest przez genom jądrowy i syntetyzowana na rybosomach cytoplazmatycznych bez odszczepialnej aminokwasowej sekwencji wiodącej (presekwencji, sekwencji targetowej) zlokalizowanej przy końcu N białka [44]. Informacja umożliwiająca skierowanie powstałego białka do mitochondriów jest więc prawdopodobnie zawarta w początkowym odcinku jego sekwencji przy końcu N [44,51,75], bądź też w końcowym – przy końcu C [30,43]. Wbudowanie poryny w zewnętrzną błonę mitochondrialną zachodzi bez udziału potencjału transbłonowego wewnętrznej błony mitochondrialnej, wymaga jednak obecności ATP, prawdopodobnie dla zapewnienia odpowiedniej konformacji białka przed jego włączeniem w błonę [40]. Najnowsze wyniki badań dotyczące transportu poryny do mitochondriów sugerują, iż proces ten zachodzi przez miejsca kontaktowe błon mitochondrialnych, z udziałem receptora usytuowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, zaangażowanego także w import białek do wewnętrznych przedziałów mitochondriów [92].

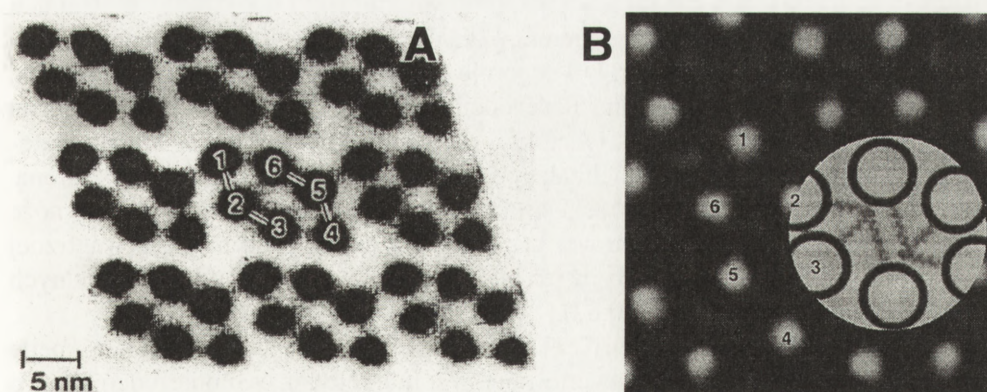
Pośród wszystkich zidentyfikowanych dotychczas kanałów zlokalizowanych w obu błonach mitochondrialnych, poryna jest jedynym białkiem o znanej sekwencji aminokwasów [88]. Określenie składu aminokwasowego białka lub sekwencjonowanie cDNA pozwoliło na wyznaczenie sekwencji aminokwasowej poryn izolowanych z mitochondriów *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictiostelium discoideum*, a także z błony komórkowej limfocytów B człowieka i mięśni szkieletowych ssaków [35,48,49,51,75,101].

STRUKTURA

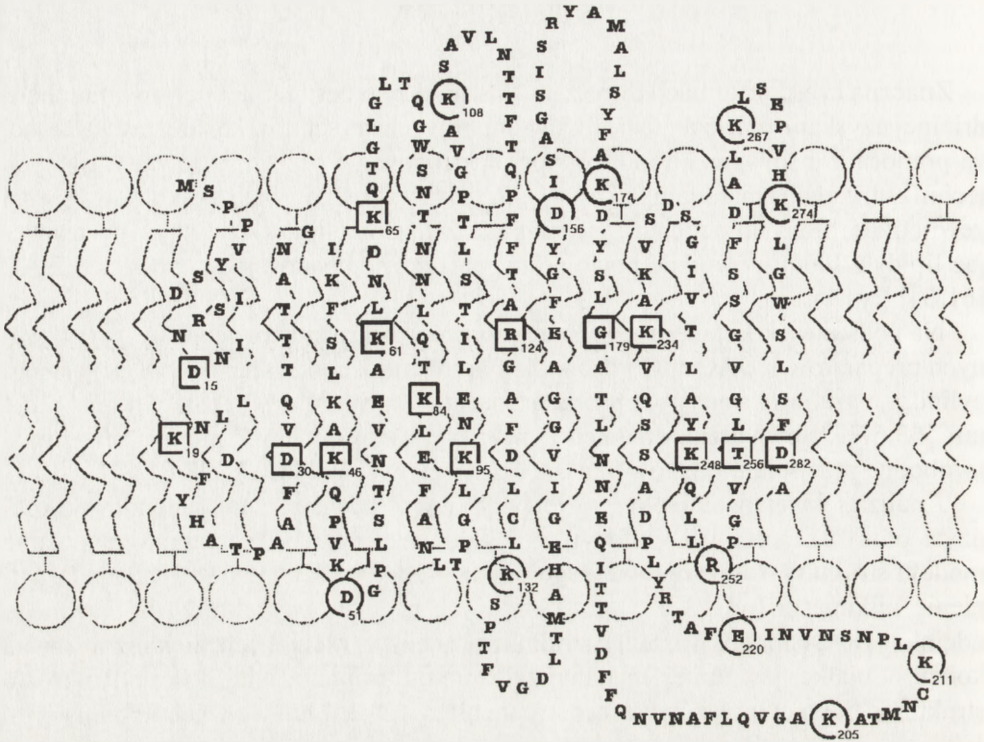
Znaczną część informacji dotyczących struktury przestrzennej poryny mitochondrialnej uzyskano dzięki analizie dwuwymiarowych kryształów kanału, prowadzonej za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego przy zastosowaniu różnych technik utrwalania materiału [65,66,67]. Kryształy takie powstają na skutek trawienia zewnętrznej błony mitochondrialnej rozpuszczalną fosfolipazą A_2 . Enzym ten usuwając lipidy z błony powoduje powolne i spontaniczne upakowywanie białek VDAC [61,64] (rys.1).

Na podstawie komputerowej analizy obrazów mikroskopowych tak przygotowanych preparatów VDAC stwierdzono, iż poryna mitochondrialna ma postać pustego cylindra o grubości ściany nie przekraczającej 1 nm i średnicy zewnętrznej $3,8 \pm 0,1$ nm [63,67]. Wewnętrzna średnica kanału wynosi więc ok. 2 nm, co umożliwia swobodne przejście związków o masie cząsteczkowej 4–6 kDa [5,28,64,67].

Analiza sekwencji aminokwasowej poryn wyizolowanych z mitochondriów drożdży i błony komórkowej limfocytów B człowieka pozwoliła na zaproponowanie modelu struktury drugorzędowej tego białka [7,14,27,29,30,35,51]. Zakłada on istnienie kilkunastu (od 12–19) transbłonowych rejonów o strukturze β i jednego odcinka (18–24 aminokwasów) o strukturze α helisy. Odcinek ten, zlokalizowany na końcu N białka, jest umiejscawiany, zależnie od proponowanej ilości odcinków o strukturze β , po cytoplazmatycznej stronie błony [29,35] lub we wnętrzu błony (rys. 1 lub rys. 2) [81]. Rejony o strukturze β utworzone są przez aminokwasy polarne, skierowane ku wnętrzu kanału i hydrofobowe, zanurzone w błonie. W zależności od wysycenia wiązań wodorowych między aminokwasami z sąsiadującymi rejonami o strukturze β kąt, jaki powstaje między tymi rejonami a osią kanału, może mieć różną



Rys.1. (A) Mikroskopowy obraz ułożenia kanałów VDAC powstały w wyniku trawienia zewnętrznej błony mitochondrialnej fosfolipazą A_2 [68]; (B) ramiona pomiędzy obszarami heksamerów reprezentują 20-aminokwasowe α -helisy eksponowane z każdego kanału do dwuwarstwy lipidowej [65]



Rys. 2. Model struktury drugorzędowej VDAC zakładający istnienie 12 odcinków o strukturze β ; zmiana ładunku w miejscach oznaczonych kółkami nie ma znaczenia dla zależności od potencjału; w miejscach oznaczonych kwadratami ma istotny wpływ na zależność od potencjału [14]

wartość, a to z kolei wpływa na możliwą ilość rejonów o strukturze β [65,67]. Kąt nachylenia między osią kanału a odcinkami o strukturze β oraz ilość tych ostatnich determinują wielkość zewnętrznej średnicy kanału [30,67]. Przy proponowanej mniejszej ilości odcinków o strukturze β sugeruje się większą wartość kąta nachylenia. Biorąc pod uwagę proponowaną ilość odcinków o strukturze β obliczyć można zewnętrzną średnicę kanału [7]. Odcinki o strukturze β tworzą ścianę kanału, natomiast funkcja jedyne rejonu helikalnego nie została jeszcze do końca wyjaśniona. Zależnie od proponowanego modelu struktury drugorzędowej [7] odcinek ten może pełnić funkcję sekwencji targetowej przy wbudowywaniu poriny do zewnętrznej błony mitochondrialnej [51,75], bądź też być jednym z elementów odpowiedzialnych za zamykanie kanału (rys. 4) [30,67].

Innymi rejonami kanału VDAC eksponowanymi na powierzchni błony są pętle tworzone przez aminokwasy zawarte między zanurzonymi w błonie odcinkami o strukturze β . Pętle te autorzy lokalizują bądź tylko po cytoplazmatycznej stronie błony [29,30], bądź też po obu jej stronach [67] (rys. 2).

Dzięki oparciu na strukturze β , zaproponowany model struktury drugorzędowej dopuszcza pewną dowolność w składzie aminokwasowym. Dlatego też model ten zastosować można dla poryn o tak różnej sekwencji aminokwasowej jak poryny wyizolowane z mitochondriów *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *D. discoideum* i limfocytów B człowieka [49,51,75,101], dla których homologia sekwencji aminokwasowej wynosi tylko ok. 5% [2], przy czym najniższą homologię z pozostałymi wykazuje poryna *D. discoideum*.

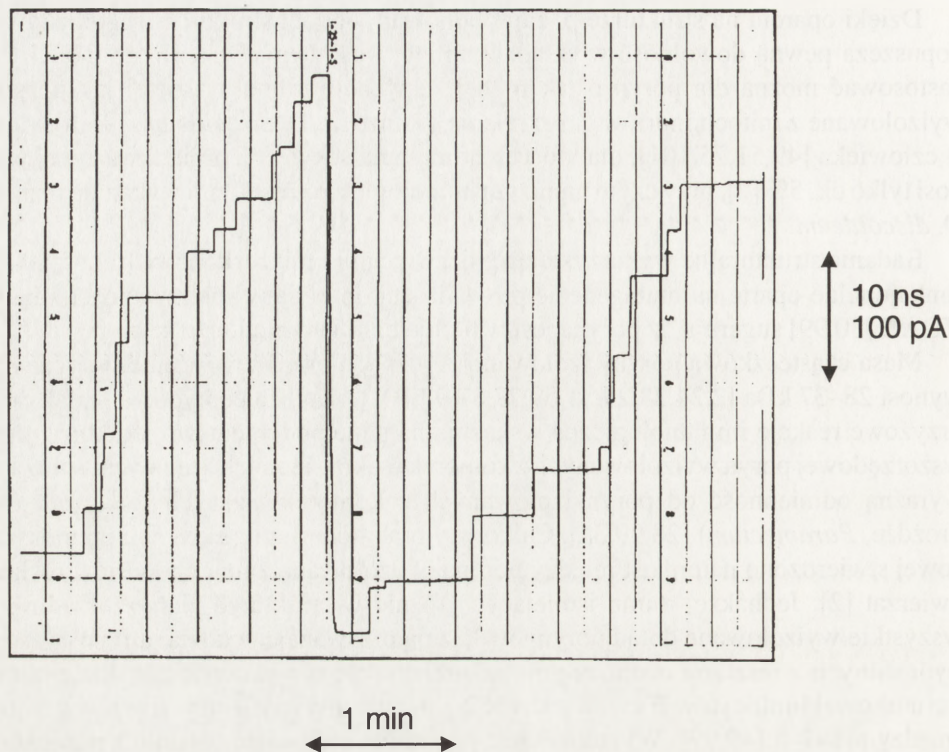
Badania strukturalne wykorzystujące różne techniki mikroskopowe [62,65,100] i funkcjonalne oparte na mutagenizie prowadzącej do zmiany selektywności kanału VDAC [80,99] sugerują, iż poryna jest w błonie białkiem monomerycznym.

Masa cząsteczkowa poryny izolowanej z różnych organizmów eukariotycznych wynosi 28–37 kDa [2,24,28,29,31,59,77,87,97,101]. Analiza peptydowa białek oraz krzyżowe reakcje immunologiczne wskazują na silne podobieństwo struktury pierwszorzędowej poryn wyizolowanych z komórek ssaków i innych kręgowców oraz ich wyraźną odmiennność od poryn izolowanych z komórek niższych *Eukariota* (np. drożdże, *Paramecium*) [28,29,31]. Całkowity brak homologii sekwencji aminokwasowej stwierdzono natomiast między poryną wyizolowaną z mitochondriów roślin i zwierząt [2]. Jednakże, mimo istniejących różnic w strukturze pierwszorzędowej, wszystkie wyizolowane dotąd poryny wykazują przeważający udział aminokwasów hydrofilnych z resztami obdarzonymi ładunkiem (np. poryna wyizolowana z błony komórkowej limfocytów B człowieka (56%), a ich punkt izoelektryczny zawarty jest między pH=7–8 [49,97]. Wyjątkiem jest poryna wyizolowana ostatnio z mitochondriów śluzowca *Dictyostelium discoideum*, której punkt izoelektryczny znajduje się w pH=10 [101].

WŁAŚCIWOŚCI KANAŁU

Mimo istniejących różnic poryny mitochondrialne, wyizolowane z różnych komórek eukariotycznych i wbudowane w sztuczne błonki lipidowe [9], wykazują silną konserwatywność podstawowych właściwości: wartości przewodnictwa pojedynczego kanału, selektywności i zależności od potencjału [2,5,6,7,11,21,24,28,31,59,-87,88,97,101].

Przewodnictwo kanału to wielkość opisująca (w terminach elektrycznych) jego zdolność do transportu jonów. Zgodnie z prawem Ohma jest ona zdefiniowana jako iloraz prądu przepływającego przez kanał i różnicy potencjału w poprzek błony, w której ów kanał jest zlokalizowany [88]. Wartość przewodnictwa pojedynczego kanału wszystkich wyizolowanych dotychczas poryn mitochondrialnych (z wyjątkiem *Paramecium*), wyznaczana w tych samych warunkach pomiarowych, wynosi ok. 4 nS [5,6,7,11,31,59,88] (rys.3).



Rys.3. Wzrost przepuszczalności (prądu jonowego) sztucznej błonki lipidowej po podaniu do inkubacji poriny wyizolowanej z mitochondriów drożdży; każda skokowa zmiana w zapisie odpowiada insercji pojedynczego kanału w błonę, warunki inkubacji: 1 M KCl, przyłożone napięcie 10 mV [7]

Znając wartość przewodnictwa pojedynczego kanału wyznaczyć można jego średnicę [5,6,9,101]. Dla wszystkich wyizolowanych jak dotąd poryn wynosi ona ok. 2 nm, co pozostaje w zgodzie z wartością wyznaczoną przy pomocy mikroskopu elektronowego [67]. Wyjątkiem jest poryna wyizolowana z mitochondriów *Paramecium*, która ze względu na niższą wartość przewodnictwa pojedynczego kanału ma mniejszą średnicę kanału [58]. Przypuszcza się, iż wynika to z odmiennej konfiguracji białka poriny w błonie [31,58]. Niektórzy autorzy uważają jednakże, iż wielkość średnicy kanału wyznaczona na podstawie wartości przewodnictwa pojedynczego kanału jest zaniżona w stosunku do rzeczywistych rozmiarów [7]. Wskazują oni między innymi na możliwość oddziaływania środowiska błony na wnętrze kanału, które ogranicza jego przepuszczalność, zmniejszając tym samym przewodnictwo [2].

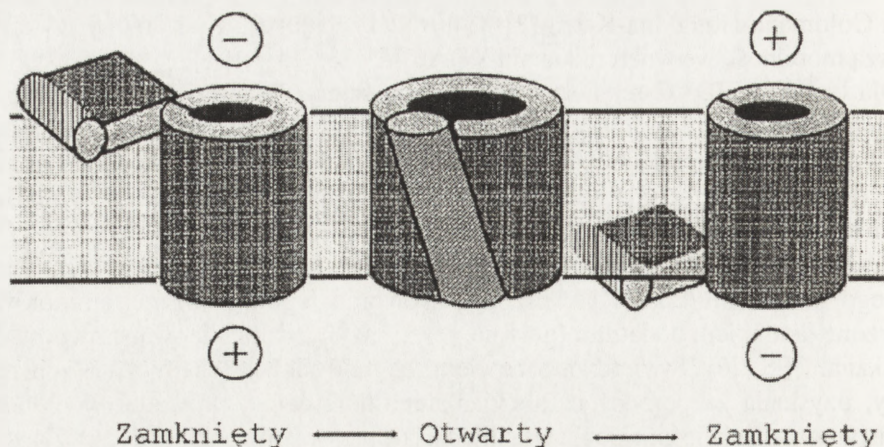
W stanie otwartym wszystkie scharakteryzowane dotychczas poriny mitochondrialne są anionowo selektywne [2,6,28,31,87,97,101]. Wartość stosunku przepuszczalności (Pa:Pc) dla anionów (Pa) i kationów (Pc) wyznaczona na podstawie rów-

kania Goldmana-Hodgkina-Katza [7] wynosi 2:1, co sugeruje, iż aniony wykazują większą mobilność we wnętrzu kanału VDAC [21,28,31,67,101].

Dla kanałów VDAC rekonstruowanych w sztuczne błonki obserwuje się zależność stanu funkcjonalnego tych kanałów od zastosowanego potencjału [5,6,21,28,65,88]. Do podobnych wniosków skłaniają także wyniki badań kanałów VDAC prowadzone metodą *patch clamp* na megamitochondriach (uzyskanych działaniem kuprizonu) lub proteoliposomach [50,76,88,93,94,106].

Wrażliwość kanału na przyłożony potencjał przypisuje się obecności w nim rejonu zwanego "sensorem" [20,21]. Utworzony jest on prawdopodobnie przez aminokwasy obdarzone ładunkiem dodatnim (głównie reszty lizyny), zlokalizowane na powierzchni kanału [20,26]. Stwierdzono bowiem, iż modyfikacja chemiczna tych reszt lizyny, uzyskana za pomocą izotiocyanianu fluoresceiny, prowadzi w układach rekonstruowanych do zniesienia wrażliwości na przyłożony potencjał [26]. Zastosowanie ukierunkowanej mutagenyzy dla lokalizacji reszt aminokwasowych tworzących sensor pozwoliło stwierdzić, iż aminokwasy te rozmieszczone są w różnych rejonach białka (głównie odcinek o strukturze α -helisy i cztery kolejne odcinki o strukturze β) (rys. 2). W tworzenie sensora zaangażowany jest więc stosunkowo duży obszar białka [98,99]. Działanie sensora upatruje się w jego przemieszczaniu w polu elektrycznym generowanym przyłożonym potencjałem [20,98,99], co indukuje zmiany konformacyjne prowadzące do zamknięcia kanału [21,108]. Dotychczas sformułowano dwa modele opisujące zmiany konformacyjne wynikające z ruchu sensora i prowadzące do zamknięcia kanału [67,88]. Pierwszy z nich zakłada przemieszczanie się poza obręb kanału rejonów tworzących jego ścianę (rys. 4). Drugi model za rejonu ulegające przemieszczeniu uznaje te fragmenty kanału, które zlokalizowane są na powierzchni błony. Pod wpływem przyłożonego potencjału fragmenty te ulegałyby przeniesieniu do wnętrza kanału. Niezależnie od proponowanego mechanizmu zmian w strukturze kanału, ich konsekwencją byłyby zmiany w objętości, średnicy i selektywności pory [67].

Przy zerowym bądź niskim potencjale kanały pozostają w stanie otwartym, charakteryzującym się wysokim przewodnictwem i selektywnością anionową. Zwiększenie przyłożonego potencjału powoduje "zamknięcie" kanałów, czemu towarzyszy zmniejszenie przewodnictwa i zmiana selektywności na kationową. Zmiany selektywności, towarzyszące przejściu ze stanu otwartego w zamknięty, tłumaczone są zmianą wypadkowego ładunku na wewnętrznej ścianie kanału [20]. Ładunek ten w stanie otwartym jest dodatni, co ułatwia przejście anionów; w stanie zamkniętym zmienia się on natomiast na ujemny, co wyjaśnić może preferencję dla kationów. Ponieważ ładunek na wewnętrznej ścianie kanału pochodzi od tworzących ją aminokwasów polarnych, należy sądzić, iż przy zmianie stanu funkcjonalnego kanału następuje zmiana konformacji białka, prowadząca do innego ułożenia aminokwasów tworzących ścianę kanału [98,99].



Rys. 4. Roboczy model działania sensora zakładający przemieszczanie się wewnętrznych rejonów kanału (helisa α i cztery odcinki o strukturze β) poza obręb kanału ku jednej z powierzchni błony w zależności od polaryzacji potencjału [22]

Analiza zależności stanu funkcjonalnego kanałów od potencjału wskazuje na istnienie różnych stanów ich zamknięcia [5,6,8,10,21,22,28,59,83,101]. W stanie zamkniętym średnica i objętość kanału ulegają zmniejszeniu [20], co powoduje, iż staje się on mniej przepuszczalny dla małych jonów i prawdopodobnie nieprzepuszczalny dla większych metabolitów [12]. Kanał VDAC nie zamyka się jednak nigdy całkowicie, nawet przy różnicy potencjałów wyższej niż 80 mV [2,8]. Jednak stosując różne techniki elektrofizjologiczne (pomiar przewodnictwa kanału po wbudowaniu w sztuczne błonki, *patch clamp* i *tip-dip* – patrz dalej) otrzymuje się odmienne wartości przewodnictwa i różny charakter zależności od potencjału [88]. Sytuację tę ilustruje tabela 1.

Po wbudowaniu w sztuczne błonki, zamykanie kanału poriny występuje niezależnie od znaku przyłożonego potencjału (polaryzacji potencjałów), jest więc procesem symetrycznym [6,21,28]. Rejestracja zdolności transportowych poriny uzyskana techniką *patch clamp* wskazuje natomiast, iż zamknięcie kanału uzależnione jest od znaku przyłożonego potencjału, jest więc procesem asymetrycznym [50,76,88,93,94]. Brak pełnej symetrii obserwuje się także w niektórych eksperymentach prowadzonych z zastosowaniem inkorporacji w sztuczne błonki, kiedy to w zależności od znaku zastosowanego potencjału, zamknięcie kanałów pojawia się przy różnej jego wartości. W tym przypadku przyczyn częściowej asymetrii w zachowaniu kanałów upatruje się we właściwościach zastosowanej sztucznej błonki. Dotyczyć one mogą orientacji białek, składu lipidowego czy stężenia detergentu [21,46]. Stwierdzono również, iż dla kanałów VDAC izolowanych z mitochondriów różnych komórek wrażliwość na przyłożony potencjał nie jest identyczna. Znajduje to swe odbicie w wyznaczonej wartości V_0 , tj. wartości potencjału, przy której 50% kanałów przyjmuje

TABELA 1. Główne aktywności kanałowe wykryte w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (wg [88], zmodyfikowane)

Metoda	Przewodnictwo (pS) w 0,15 M KCl	Typ kanału	Zależność od potencjału	Literatura
dwuwarstwa lipidowa	600–750	VDAC	symetryczna	[10,21]
	315	?	brak zależności	[32]
	420	?	symetryczna	[31]
<i>tip-dip</i>	> 440*, > 660**	PSC	asymetryczna	[34,95]
<i>patch-clamp</i> mitochondriów	99, 152, 220, 307	???	asymetryczna	[76]
<i>patch-clamp</i> proteoliposomów	97, 156, 224	???	asymetryczna	[76]
	535			
	650	VDAC	symetryczna	[106]

* w mitochondriach ssaków; ** w mitochondriach drożdży

konfigurację zamkniętą. Na przykład, dla poryny wyizolowanej z komórek drożdży wartość V_0 równa się 24 mV, podczas gdy dla poryny z serca wołu czy mózgu szczura wartość tego parametru wynosi ok. 60 mV [28]. Generalnie przyjmuje się, iż w sztucznych błonkach, złożonych z mieszaniny fosfolipidów, przejście kanałów VDAC w podstany o mniejszej przepuszczalności występuje przy wartości potencjału wynoszącej ok. 20 mV [6,12,21,25,101]. Zamykanie kanału wywołane przyłożonym napięciem trwa kilka sekund, podczas gdy jego otwarcie jest procesem szybkim, rzędu mikrosekund lub milisekund. Im dłużej trwa zamknięcie kanału wywołane przyłożonym potencjałem, tym dłuższy jest czas potrzebny dla jego ponownego otwarcia [21,106].

MODULACJE

Stan funkcjonalny VDAC może być regulowany także przez inne czynniki, które w układach rekonstruowanych zwiększają bądź zmniejszają zależność kanału od przyłożonego potencjału.

Wzmocnienie zależności od zastosowanego potencjału, tj. zamykanie kanału poryny przy niższych jego wartościach, obserwuje się przy niskiej sile jonowej środowiska [7] oraz w obecności syntetycznych polianionów [8,10,12,20,21,23,26,-56], makrocząsteczek [37–39] lub endogennego białka, zwanego modulatorem kanału VDAC. Białko to, o przeważającym udziale ładunku ujemnego, po raz pierwszy wyizolowano z mitochondriów *N. crassa* [46].

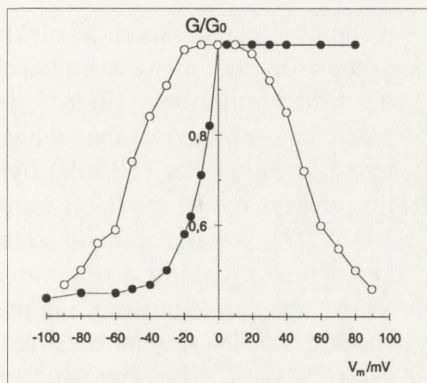
Do najczęściej stosowanych syntetycznych polianionów należy siarczan dekstranu (m. cz. 8 kDa lub 500 kDa) [20,21,56,60] i tzw. polianion Königa (kopolimer maleinianu, metakrylanu i styrenu 2:1:3, m. cz. 10 kDa) [8,10,12,23]. Polianiony te

zwiększając wrażliwość na przyłożony potencjał powodują zamknięcie kanału przy niższych wartościach potencjału. Działają one także bez przyłożonego potencjału, wywołując stan zamknięty o zmienionej selektywności, podobny do indukowanego potencjałem. Ich działanie w układach rekonstruowanych zależy od znaku przyłożonego potencjału. Powodują one zamknięcie wbudowanych w sztuczne błonki kanałów tylko wtedy, gdy potencjał po stronie ich podania (strona cis) do inkubacji ma znak ujemny. Przy potencjale dodatnim stabilizują one stan otwarty pory (rys. 5). Uważa się, iż ten asymetryczny efekt polianionów spowodowany jest brakiem możliwości ich przejścia przez kanał poryny [8,10,12,21,23,60].

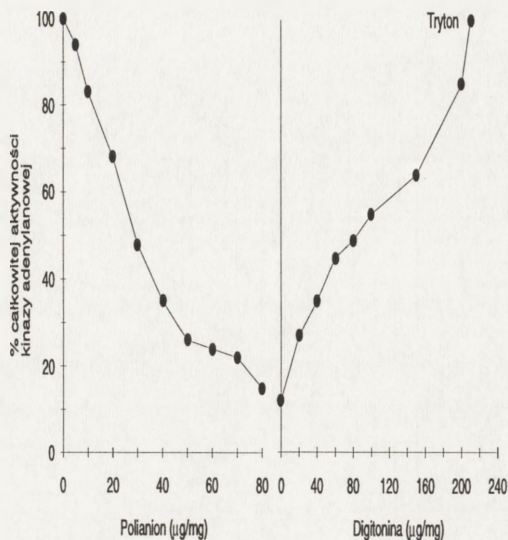
Inkubowane z nienaruszonymi mitochondriami, polianiony hamują procesy związane z transportem nukleotydów adeninowych przez kanał poryny, tj. fosforylację oksydacyjną i aktywność kinaz zlokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej i na powierzchni zewnętrznej błony mitochondrialnej (np. kinaza adenylationowa, kinaza kreatynowa, heksokinaza). Usunięcie bariery błony zewnętrznej znosi ten hamujący efekt polianionów [1,8,10,12,56,74] (rys.6).

Zależnie od branych pod uwagę danych eksperymentalnych, miejsce interakcji polianionu z kanałem poryny lokalizowane jest przy "ujściu" kanału [20,21] lub na zewnętrznej powierzchni białka, w miejscu kontaktu z otaczającymi lipidami [68]. Co więcej, wydaje się, iż miejsce oddziaływania polianionu na kanał VDAC uzależnione jest od typu zastosowanego polianionu. Stwierdzono bowiem, iż kompleksy poryny z detergentem LDAO, powstające w toku izolacji tego białka [25,29,79] wykazują, w zależności od rodzaju polianionu (polianion Königa, siarczan dekstranu), z którym uprzednio preinkubowano mitochondria, różne powinowactwo do kolumny zawierającej wymienniczkę kationową [26]. Oznacza to, iż nie te same rejony kanału VDAC odpowiedzialne są za oddziaływanie z siarczanem dekstranu [20,21,26] i polianionem Königa [26,68].

Ograniczenie przepuszczalności kanału VDAC poprzez zwiększenie zależności jego stanu funkcjonalnego od przyłożonego potencjału wywołane być może również przez makrocząsteczki (np. dekstrany o różnej masie cząsteczkowej, BSA) symulujące działanie białek cytoplazmatycznych [37,39]. Związki te w układach rekonstruowanych ułatwiają zamknięcie kanału VDAC i jego przejście w stan o niskim przewodnictwie. W nienaruszonych mitochondriach powodują one zwiększenie ilości miejsc kontaktowych i ograniczenie dyfuzji nukleotydów adeninowych przez kanał poryny [37–39]. Jednakże, w odróżnieniu od syntetycznych polianionów, ich obecność w inkubacji nie prowadzi do upośledzenia bioenergetycznych funkcji mitochondriów. Zmniejszenie efektywności transportu nukleotydów adeninowych przez kanał poryny powoduje zwiększenie kompartmentacji tych nukleotydów w przestrzeni międzybłonowej [37–39] (patrz dalej). Przy rozpatrywaniu mechanizmu działania tych cząsteczek na stan funkcjonalny kanału VDAC bierze się pod uwagę wywołane ich obecnością ciśnienie onkotyczne (stres osmotyczny) [39]. Nie bez znaczenia jest także zwiększenie "lepkości" płynu inkubacyjnego, co może ograniczać dyfuzję



Rys. 5. Zależność stanu otwarcia kanału VDAC od przyłożonego potencjału w nieobecności (czarne kółka) i w obecności polianionu Königa (białe kółka); stan otwarcia kanału VDAC przedstawiono za pomocą ilorazu przewodnictwa przy danej wartości przyłożonego potencjału (G) i przewodnictwa wyznaczonego przy potencjale 0 mV (G_0); warunki inkubacji: 1 M KCl, polianion 0,3 $\mu\text{g/ml}$ podany po stronie cis, wartości potencjału podane są w odniesieniu do strony cis [8]

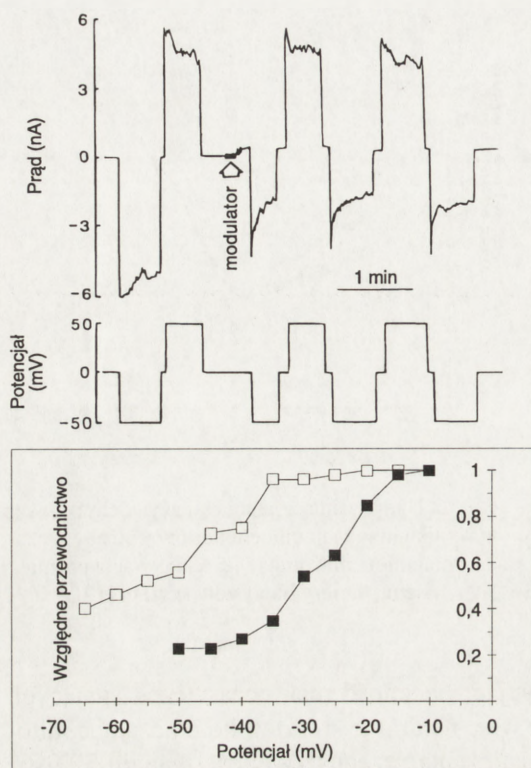


Rys. 6. Hamowanie działania kinazy adenylanowej w wyniku inkubacji mitochondriów wątroby szczura z polianionem Königa i jej reaktywacja po zniesieniu bariery błony zewnętrznej [12]

metabolitów do pory [39]. Podsumowując, obecność makrocząsteczek mających symulować białka cytoplazmatyczne, a więc naturalne środowisko otaczające mitochondria w komórce, prowadzi do ograniczenia przepuszczalności kanału VDAC. Ponieważ większość badań mających na celu pełną charakterystykę tego kanału prowadzono w płynach izotonicznych bez makrocząsteczek, możliwe jest, iż wyznaczona dotychczas w układzie izolowanym przepustowość kanału może być zawyżona [39].

Badania nad natywnym białkowym modulatorem kanału VDAC, prowadzone w układach rekonstruowanych i na całych mitochondriach, doprowadziły do wniosku, iż to endogenne białko, zlokalizowane w przestrzeni międzybłonowej, działa analogicznie do syntetycznych polianionów i makrocząsteczek, zmniejszając przepuszczalność i zmieniając selektywność kanału poryny [46,47,55,56]. Wydłużenie procesu otwierania kanału VDAC obserwowane przy braku potencjału oraz znaczne skrócenie czasu zamykania tego kanału przy ujemnych wartościach potencjału w obecności modulatora sugeruje, iż białko to ma zdolność stabilizacji stanów o niższej przepuszczalności [46,47,55–57] (rys.7).

Przez zwiększenie zależności od potencjału, modulator, w warunkach *in vivo*, działać może jako regulator kontrolujący przepływ metabolitów przez kanał VDAC i modyfikujący w ten sposób szybkość procesów komórkowych. Obecność modulatora sprawia, iż potencjał, jaki mógłby powstać w poprzek zewnętrznej błony mi-



Rys. 7. Podwyższenie wrażliwości na potencjał kanałów VDAC z mitochondriów *N. crassa* przez białkowy modulator wyizolowany z mitochondriów ziemniaka: (A) modulator (w stężeniu końcowym 15 $\mu\text{g/ml}$) podano od strony cis, od której przyłożony był potencjał; zarejestrowane wartości natężenia prądu są sumą aktywności 30 kanałów; (B) względne wartości przewodnictwa w stanie równowagi jako funkcji przyłożonego potencjału, kanałów VDAC niepotraktowanych (kółko puste) i potraktowanych modulatorem (kółko pełne), za maksymalną wartość przewodnictwa przyjęto wartość prądu przy potencjale -10 mV; warunki pomiaru jak w A; modulator dramatycznie zwiększa szybkość zamykania, ale tylko przy ujemnych potencjałach, dodatnie potencjały indukują stan otwarty (asymetria zależności od potencjału)

tochondrialnej na skutek jej elektrycznego sprzężenia z wewnętrzną błoną mitochondrialną (12 mV przy potencjale w poprzek błony wewnętrznej wynoszącym 150 mV) byłby już efektywny w regulacji kanału VDAC [7]. W zależności od stopnia aktywności modulatora kanały VDAC mogą być otwarte lub przechodzić w jeden ze stanów zamkniętych o ograniczonej przepuszczalności. Przypuszcza się, iż regulacja aktywności tego białkowego modulatora polegać może na jego fosforylacji, wiązaniu i uwalnianiu metabolitów lub jonów czy też zmianie pH środowiska [55,56]. Fakt, że w układach rekonstruowanych kanały VDAC z różnych źródeł są jednakowo regulowane przez białkowy modulator izolowany z różnych organizmów (ssaki, rośliny, grzyby) sugeruje konserwatywny charakter podstawowych cech strukturalnych i funkcjonalnych białkowego modulatora kanału VDAC [47,54–57].

Do drugiej grupy czynników regulujących stan otwarcia kanału VDAC należą czynniki zmniejszające jego wrażliwość na przyłożony potencjał. Są to: wysokie pH [21,26], bezwodnik bursztynianu [20,21,26] i metale trójwartościowe: aluminium, skand, gal, ind, chrom i żelazo [107,108]. Uważa się, że czynniki te wywołując w sensorze zmiany, uniemożliwiają jego ruch w powstałym polu elektrycznym (rys. 4), powodują osłabienie zależności stanu funkcjonalnego kanału od przyłożonego potencjału [20,21].

ZNACZENIE FIZJOLOGICZNE

Sprecyzowanie fizjologicznej funkcji poryny utrudnione jest ze względu na odmienną wynikiem opisujących zdolności transportowe tego białka w sztucznych błonkach lipidowych od wyników otrzymanych dla nienaruszonych mitochondriów. Stwierdzono bowiem, iż w stanie zamkniętym, indukowanym polianionem Königa [8,23], poryna wbudowana w sztuczne błonki jest nadal przepuszczalna dla ATP [4], podczas gdy te same warunki inkubacji powodują, że poryna w nienaruszonych mitochondriach staje się nieprzepuszczalną dla tego związku [12]. Sugeruje to, iż zależnie od środowiska lipidowego i białkowego zamykanie się kanału VDAC nie jest procesem identycznym.

Zmniejszenie przepuszczalności poryny w układach rekonstruowanych pod wpływem przyłożonego potencjału transbłonowego sugeruje możliwość regulacji tą drogą przepuszczalności błony zewnętrznej *in vivo*. Regulacja taka mogłaby zachodzić: (i) w miejscach kontaktowych przez oddziaływanie transbłonowego potencjału błony wewnętrznej [7,10], bądź też dzięki interakcji kanału VDAC (ii) z powierzchniowym potencjałem błony wewnętrznej poza miejscami kontaktowymi lub (iii) potencjałem Donnana tworzącym się w poprzek zewnętrznej błony mitochondrialnej [70].

Odkrycie endogennego białkowego modulatora kanału VDAC zwiększającego wrażliwość tego kanału na potencjał [46] sugeruje, iż zamykanie kanału VDAC pod wpływem potencjału nie jest tylko artefaktem pojawiającym się w sztucznych błonkach.

Ponieważ przyjmuje się, że kanał VDAC jest jedynym miejscem transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, regulację jego przepuszczalności uznaje się za jeden z podstawowych czynników prowadzących do kompartmentacji nukleotydów adeninowych na terenie przestrzeni międzybłonowej [36–38,53]. Kompartmentacja ta nazywana jest dynamiczną, ponieważ wynika z szybkości wymiany nukleotydów adeninowych przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Z kolei szybkość tej wymiany, a więc szybkość dyfuzji nukleotydów przez kanał poryny zależy od gradientu nukleotydów adeninowych pomiędzy przestrzenią międzybłonową a cytoplazmą. [36,37]. Dynamiczna kompartmentacja prowadząca do powstania trzeciej (nie związanej z matriks mitochondrialną i cytoplazmatyczną) puli nukleotydów adeninowych może mieć istotne znaczenie fizjologiczne, szczególnie przy wysokiej szybkości wymiany tych nukleotydów [37–39].

Szereg danych eksperymentalnych wskazuje na to, iż poryna jest miejscem wiązania (w sposób specyficzny tkankowo [7]) niektórych kinaz lokalizowanych w przestrzeni międzybłonowej i poza mitochondriami, np: kinazy glicerolowej, heksokinazy, glukokinazy, kinazy kreatynowej, kinazy dwufosforanów nukleotydów [1,16,52,77,78,103]. Wyniki te implikują wniosek, iż kanał VDAC odgrywa istotną rolę w regulacji działania tych kinaz. Stwierdzono np., iż wiązanie heksokinazy czy

też kinazy glicerolowej z poryną prowadzi do wzrostu aktywności tych enzymów [17,105]. Regulacja aktywności kinaz cytoplazmatycznych poprzez ich oddziaływanie z kanałem VDAC ma istotne znaczenie fizjologiczne. Na przykład wiązanie glukokinazy (komórki β trzustki) i heksokinazy (komórki białej tkanki tłuszczowej) z kanałem VDAC odgrywa znaczną rolę w regulacji wydzielania insuliny (trzustka) i szybkości metabolizmu glukozy (tkanka tłuszczowa). Osłabienie wiązania między kanałem VDAC i kinazami fosforylującymi glukozę, wywołane w tych tkankach przez podanie glimepirydu (sulfonilmocznik), prowadzi do zwiększenia wydzielania insuliny (trzustka) i przyspieszenia metabolizmu glukozy w białej tkance tłuszczowej, czego efektem jest obniżenie poziomu glukozy we krwi [77].

Badania dotyczące dystrybucji poryny w błonie zewnętrznej wskazują, iż białko to zlokalizowane jest zarówno w obrębie miejsc kontaktowych (miejsca styku błony zewnętrznej i wewnętrznej), jak i poza tymi rejonami [16]. Miejscem wiązania kinaz białkowych jest głównie poryna umiejscowiona w miejscach kontaktowych [1,52,103,105]. Jest całkiem prawdopodobne, iż w miejscach kontaktu obu błon mitochondrialnych potencjał błony wewnętrznej może zostać "przeniesiony" na błonę zewnętrzną i kontrolować stan otwarcia kanału poryny [7,10], regulując w ten sposób przejście anionowych metabolitów (np. nukleotydy adeninowe, fosfokreatyna). A zatem w warunkach *in vivo*, w zewnętrznej błonie mitochondrialnej mogłyby współistnieć dwie frakcje poryny: (i) jedna, w miejscach kontaktowych, poddana regulacji potencjału, przechodząca w stan zamknięty o niższym przewodnictwie i kationowej selektywności; (ii) druga, poza miejscami kontaktowymi, nie regulowana potencjałem, pozostająca w stanie otwartym o wysokim przewodnictwie i selektywności anionowej (rys.8).

Podsumowując, lokalizacja kinazy w miejscach kontaktowych (np. kinazy kreatynowej) i jej współdziałanie z kanałami VDAC regulowanym potencjałem stwarza większą możliwość regulacji aktywności tego enzymu niż w przypadku lokalizacji poza miejscami kontaktu obu błon mitochondrialnych (np. kinaza adenylanowa).

Uważa się, że kinaza związana w miejscu kontaktowym, może być funkcjonalnie sprzężona z translokazą nukleotydów adeninowych [1,18,52,103], co umożliwiłoby bezpośrednie przeniesienie energii fosforylacyjnej z eksportowanego ATP na metabolit, np. kreatynę, który po fosforylacji opuszczałby przestrzeń międzybłonową kanałem poryny nie regulowanym potencjałem (rys. 8). Umożliwiłoby to wysoką szybkość wymiany ATP/ADP przez translokazę zlokalizowaną w błonie wewnętrznej, nawet w obecności wysokiego potencjału fosforylacyjnego w cytoplazmie. Zasadniczą rolę w stabilizacji potencjału fosforylacyjnego odgrywałyby kanały VDAC nie regulowane potencjałem elektrycznym, poprzez umożliwienie działania kinazy adenylanowej, zlokalizowanej w przestrzeni międzybłonowej poza miejscami kontaktowymi i powodującej przekształcenie nadmiaru ADP w ATP i AMP [1]. Model ten, uwzględniający różnice w zdolnościach transportowych kanałów VDAC umiejscowionych w miejscach kontaktowych i poza nimi, zaproponowano dla kinazy kreaty-

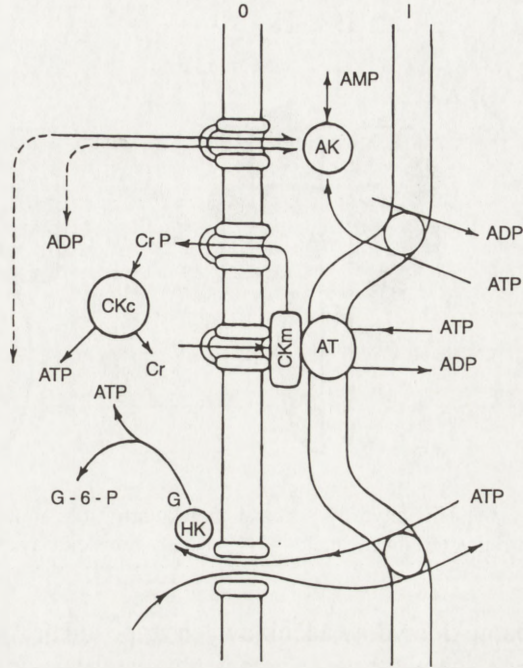
nowej (rys.8) [1,10,53,103]. Związanie tego enzymu w miejscach kontaktowych wydaje się być ułatwionym przez jego uczestnictwo w indukcji tych miejsc. Stwierdzono bowiem, iż w formie oktameru zlokalizowanego w przestrzeni międzybłonowej, kinaza kreatynowa jest zdolna do równoczesnej interakcji z obydwoma błonami mitochondrialnymi, co ułatwia tworzenie się miejsc kontaktowych [53,85]. Dwa izozymy tego enzymu, mitochondrialny i cytoplazmatyczny, tworzą tzw. "wahadło fosfokreatynowe", uczestniczące w przekształcaniu energii produkowanej w mitochondriach.

Postulowane funkcjonalne sprzężenie między poryną a translokazą nukleotydów adeninowych, zachodzące na terenie miejsc kontaktowych, ma także istotne znaczenie dla działania kinaz wiązanych na zewnętrznej powierzchni mitochondriów (np heksokinaza, kinaza glicerolowa). Enzymy te odgrywają ważną rolę w regulacji sprzężenia między glikolizą i syntezą ATP w mitochondriach [16].

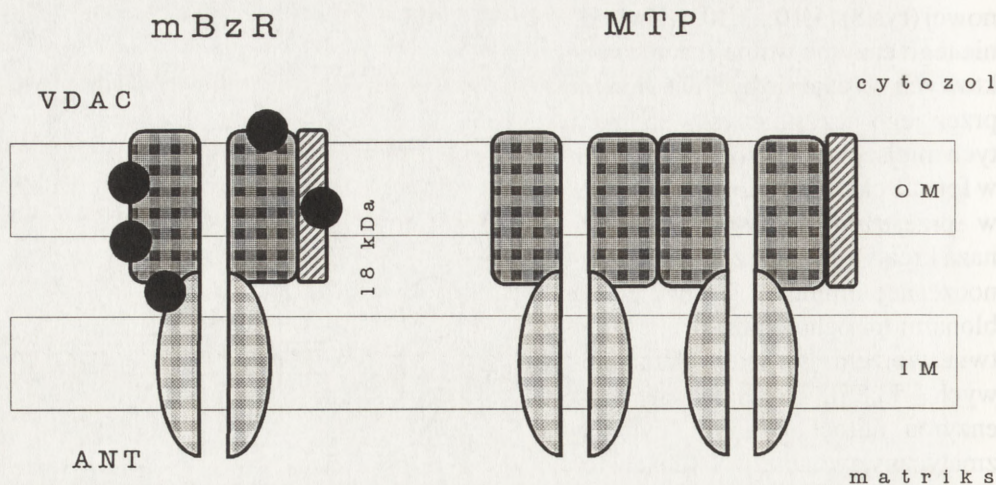
Ostatnie badania nad transportem nukleotydów adeninowych przez kanały VDAC tworzące kompleksy z kinazami w miejscach kontaktowych wskazują, iż istotne znaczenie dla zdolności transportowych tych kanałów ma typ reakcji katalizowanej przez kinazę. Kinazy wiązane przez porynę w miejscach kontaktowych prowadzić mogą dwa typy reakcji:

- (i) przekształcanie energii (*energy transmitting kinases*), np. kinaza kreatynowa,
- (ii) pochłanianie energii (*energy consuming kinases*), np. heksokinaza [16].

Zależnie od typu reakcji katalizowanej przez kinazę, przepuszczalność kanału VDAC dla nukleotydów adeninowych zmienia się, co z kolei pośrednio wpływa na aktywność enzymu. Kinazy pochłaniające energię umożliwiają przejście ATP i ADP przez kanał poryny mimo ograniczającego wpływu potencjału transbłonowego, natomiast kinazy przekształcające energię dodatkowo obniżają przepuszczalność poryny



Rys. 8. Lokalizacja kanałów VDAC w obrębie zewnętrznej błony mitochondrialnej i ich współdziałanie z kinazami: O – zewnętrzna błona mitochondrialna, I – wewnętrzna błona mitochondrialna, CKc – kinaza kreatynowa cytoplazmatyczna, CKm – kinaza kreatynowa mitochondrialna, Cr – kreatyna, CrP – fosforan kreatyny, G – glukoza, G-6-P – glukoza-6-fosforan, HK – heksokinaza, AT – translokaza nukleotydów adeninowych, AK – kinaza adenylanowa



Rys. 9. Hipotetyczny schemat molekularny: (A) mitochondrialnego receptora benzodiazepinowego (mBzR); (B) megakanalu (MTP), ANT – translokaza nukleotydów adeninowych, objaśnienia w tekście

dla nukleotydów adeninowych, zapewniając w ten sposób skuteczne oddzielenie od cytoplazmatycznego potencjału fosforylacyjnego [105].

Poryna uznawana jest także przez niektórych badaczy za istotny element aparatu transportu białek do mitochondriów [16,67]. Na podstawie analizy mikroskopowej kryształów tworzonych przez kanały VDAC [67] stwierdzono, iż peptyd bądź prekursor białkowy zawierający sekwencję targetową, kierującą białko do mitochondriów, wiąże się z fragmentem poryny, wywołując strukturalne zmiany w siatce krystalicznej zawierającej kanały [69]. Inni autorzy natomiast uznają udział kanałów VDAC w transporcie innych białek do mitochondriów za mało prawdopodobny [82, 88].

Ostatnie badania z zakresu farmakologii molekularnej wskazują na udział kanałów VDAC w tworzeniu mitochondrialnego receptora (alloreceptora) dla benzodiazepin [71], środków działających przeciwłękowo, nasennie i przeciwdrgawkowo oraz regulujących napięcie mięśniowe (rys. 9a). Niektórzy autorzy sugerują, iż receptor ten może być równocześnie białkiem odpowiedzialnym za indukowaną jonami Ca^{2+} , przejściowo zwiększoną przepuszczalność wewnętrznej błony mitochondrialnej (PTP – permeability transition pore = MTP – mitochondrial transition pore), której elektrofizjologicznie odpowiada prawdopodobnie tzw. "megakanal" (megachannel – MCC) [89,90,91]. Postulowany udział kanału VDAC w tworzeniu mitochondrialnego receptora dla benzodiazepin, jak i zbliżoność elektrofizjologicznej charakterystyki kanału VDAC i kompleksu MTP pozwalają przypuszczać, iż kanał VDAC pełni istotną rolę w działaniu kompleksu MTP (rys.9b). Funkcjonowanie tego kompleksu, zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, wymaga obecności kana-

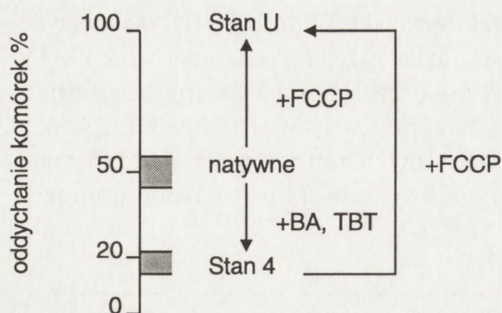
tu umożliwiającego transport, którego funkcje może pełnić występujący w postaci dimeru kanał VDAC (rys. 9b) [89,90].

Zlokalizowanie VDAC w miejscach kontaktowych [1,52,83,103,105], a nawet we frakcji błony wewnętrznej [83] pozwala uznać udział VDAC w funkcjonowaniu MTP za całkiem prawdopodobny [7,96]. Przypuszcza się też, iż poryna pozamitochondrialna pośredniczy w działaniu szeregu receptorów położonych w różnych częściach komórki, np. w błonie komórkowej stransformowanych limfocytów B, w której kanał VDAC zlokalizowano przy użyciu testów cytotoksyczności i mikroskopii immunofluorescencyjnej [96].

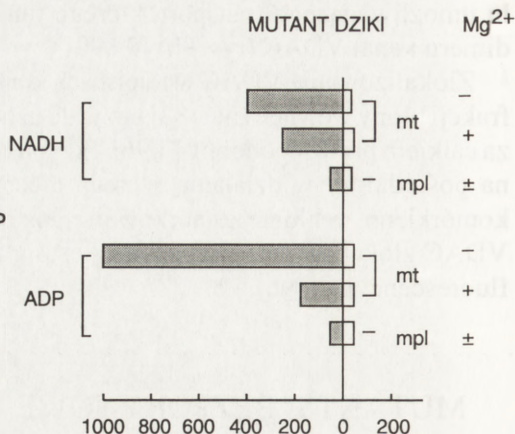
MUTANTY BEZPORYNOWE – ALTERNATYWA WOBEC VDAC

Przegląd ten uwidacznia, jak niepełną jest informacja o fizjologicznej (regulacyjnej) roli VDAC i jak trudną jest ona do udowodnienia, zwłaszcza wobec różnorodności charakterystyki elektrycznej kanałów uzyskiwanej różnymi metodami. Sama charakterystyka elektryczna dokumentuje działanie kanału, który jednak nie musi takiej funkcji pełnić *in situ* [7]. Dlatego też cenne są wszystkie informacje wykazujące konsekwencje genetycznego wykluczenia poryny. Jest to jednak możliwe tylko wtedy gdy brak kanału VDAC nie prowadzi do silnego zaburzenia struktury i funkcji mitochondriów, a jedynie do zaniknięcia lub ograniczenia określonych funkcji przypisywanych temu kanałowi. Dlatego też przeżywające w warunkach wymagających funkcjonalnych mitochondriów (niefermentujące źródło węgla) mutanty bezporynowe drożdży uzyskane w drodze delekcji genu kanału VDAC mogą dostarczyć dowodów przemawiających za pełnieniem określonych funkcji przez kanał VDAC *in vivo*.

Fakt, iż komórki skonstruowanych dotychczas mutantów bezporynowych rosną na niefermentującym źródle węgla, wskazuje na to, iż między cytoplazmą a mitochondriami, w komórkach tych mutantów, musi istnieć wymiana metabolitów zachodząca przez zewnętrzną błonę mitochondrialną [73]. Mutanty te różnią się jednak zdolnością wzrostu na niefermentującym źródle węgla, a więc i prawdopodobnie szybkością transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną. Mutant otrzymany przez Dihanich i in.[33] wymaga długiego (2–3 dni) okresu adaptacji do wzrostu na glicerolu i rośnie na nim dużo wolniej niż szczep dziki. Wykazuje on także silnie obniżony poziom cytochromów mitochondrialnych, których zawartość wzrasta w procesie adaptacji do wzrostu na glicerolu [33]. Inny mutant bezporynowy *S. cerevisiae* (B5), uznawany za reprezentatywny dla wszystkich skonstruowanych przez Guo i Lauquina [41], rośnie na pożywce glicerolowej z szybkością porównywalną z wyznaczoną dla wyjściowego szczepu dzikiego, nie wykazując opóźnienia wynikającego z konieczności adaptacji do wzrostu na niefermentującym źródle węgla [73].



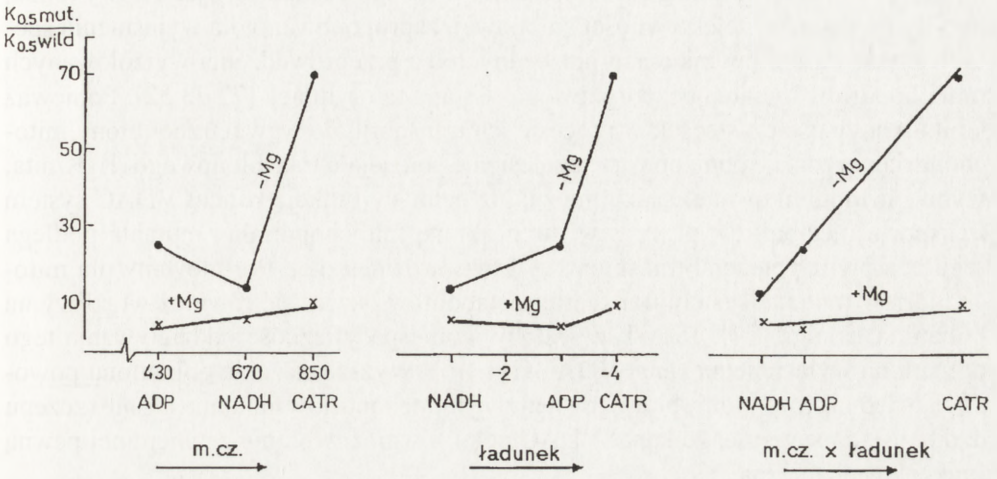
Rys. 10. Graficzne przedstawienie sprzężenia w komórkach mutantów bezporynych; obszary zakreślone odpowiadają różnicom w mierzonych wartościach uzyskanym w przeprowadzonych doświadczeniach [73]



Rys. 11. Porównanie wartości $K_{0,5}$ dla utleniania egzogenego NADH w stanie spoczynkowym (wrażliwego na Antymycynę A) i fosforylacji ADP w mitochondriach i mitoplastach wyjściowego szczepu dzikiego i mutantu pozbawionego kanału VDAC; wartość $K_{0,5}$, przybliżona do wartości K_m , jest miarą restrykcji w dostępie obu metabolitów do wewnętrznej błony mitochondrialnej

Możliwość indukcji w komórkach mutantu B5 stanu spoczynkowego i rozprężonego w obecności etanolu (substratu oddechowego dyfundującego przez błony) wskazuje, iż aktywność łańcucha oddechowego nie zależy od obecności poryny [72]. Ponadto komórki tego mutantu rosnąc na glicerolu są sprzężone energetycznie, co dowodzi dostępu nukleotydów adeninowych do mitochondriów. Wykazano to wywołując silne obniżenie, występującego w obecności etanolu, oddechania komórek mutantu przez podanie inhibitorów stanu fosforylującego, tj. inhibitora translokazy nukleotydów adeninowych (kwas bongkrekowy – BA) lub syntetazy ATP (TBT) i następnie przyspieszenie zużycia tlenu na skutek podania protonoforu – FCCP [73] (rys.10).

Stwierdzenie sprzężenia energetycznego *in situ* pozostaje w zgodzie z faktem, iż wyizolowane mitochondria mutantu, z nieuszkodzoną zewnętrzną błoną mitochondrialną, zdolne są do odwracalnego przejścia między stanem oddechowym spoczynkowym a fosforylującym i to niezależnie od zastosowanego substratu oddechowego (np. etanol, egzogeny NADH) [72,73]. Poza tym aktywność kinazy adenylnowej wyznaczana (w obligatoryjnej obecności wysokich stężeń nukleotydów adeninowych i jonów Mg^{2+}) dla mitochondriów mutantu jest porównywalna z otrzymaną dla mitochondriów wyjściowego szczepu dzikiego [74]. Dowodzi to możliwości transportu nukleotydów adeninowych oraz egzogenego NADH przez zewnętrzną błonę mitochondrialną mutantu, a więc w nieobecności kanału VDAC. Jednakże w porównaniu z mitochondriami szczepu dzikiego transport ten podlega wyraźnym ogranicze-



Rys.12. Masa cząsteczkowa i ładunek anionowy jako determinanty ograniczeń w transporcie metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną mutantu pozbawionego kanału VDAC

niom, szczególnie przy braku kationów w inkubacji [74]. Znajduje to swój wyraz w różnicach wartości $K_{0,5}^{NADH}$ i $K_{0,5}^{ADP}$, wskaźników wybranych dla określenia dostępności egzogenego NADH i ADP do wewnętrznej błony mitochondrialnej, a wyznaczanych dla obu typów mitochondriów (rys.11).

Wartości tych wskaźników są dużo wyższe w przypadku mitochondriów mutantu, szczególnie przy braku jonów Mg^{2+} w inkubacji. Oznacza to konieczność obecności kationów dwuwartościowych i zastosowania dużo wyższych, w porównaniu ze szczepem dzikim, stężeń metabolitów dla uzyskania sprzężonych energetycznie mitochondriów mutantu. Zależności te są jeszcze silniej wyrażone w przypadku CATR, inhibitora translokazy nukleotydów adeninowych [72,74], który stosowano doświadczalnie dla przerywania stanu fosforylacyjnego. Konsekwencją ograniczeń istniejących w transporcie cząsteczek obdarzonych ładunkiem (NADH, ADP, CATR) do mitochondriów mutantu jest zjawisko ich konkurencji o dostęp do wewnętrznej błony mitochondrialnej [74], znajdujące swój wyraz we wzroście wartości $K_{0,5}$ wyznaczanych dla funkcji umożliwionych przez transport tych cząsteczek.

Rysunek 12 uwidacznia, iż ograniczenia istniejące w transporcie NADH, ADP i CATR do mitochondriów mutantu, a więc zarazem ich konkurencyjność ulega nasileniu wraz ze wzrostem ładunku anionowego i silnemu osłabieniu w obecności kationów. Czynnym kationem jest tutaj Mg^{2+} , a także Ca^{2+} .

Występujące przy braku kanału VDAC zależne od obecności kationów ograniczenia w transporcie cząsteczek do wewnętrznej błony mitochondrialnej zanikają po zniesieniu bariery błony zewnętrznej (rys.11), co dowodzi, iż wynikają one z właściwości systemu transportującego metabolity przez tę błonę w nieobecności kanału

VDAC [74]. Istnienie takiego systemu, definiowanego początkowo jako nowy rodzaj poriny o obniżonej selektywności anionowej, zaproponowano dla wyjaśnienia specyficznych warunków inkubacji niezbędnych dla przeprowadzenia wyizolowanych mitochondriów mutanta bezporynowego w stan fosforylujący [72,73,32]. Ponieważ konkurencyjność cząsteczek w procesie ich transportu do wewnętrznej błony mitochondrialnej zostaje obniżona przez zniesienie potencjału transbłonowego (H. Kmita, wyniki nieopublikowane) sądzić można, iż pełniący funkcję kanału VDAC system transportu metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną mutanta podlega regulacji przez potencjał transbłonowy błony wewnętrznej. Postulowany dla mitochondriów mutantu system transportu metabolitów okazał się również wrażliwy na polianion Königa [74], co wskazywałoby na niespecyficzność oddziaływania tego polianionu wyłącznie na kanał VDAC (rys. 13). Wyższe stężenie polianionu powodowało jednak rozerwanie błony zewnętrznej mitochondriów mutantu (ale nie szczepu dzikiego), co sugeruje, że kanał VDAC pełni również w błonie zewnętrznej pewną funkcję mechaniczną.

Podsumowując:

(1) brak kanału VDAC nie przeciwdziała transportowi metabolitów przez zewnętrzną błonę mitochondrialną;

(2) transport ten zachodzi przy udziale systemu (hipotetyczne białko kanałowe) o następujących właściwościach: preferencja wobec kationów, średnica kanału zmniejszona w porównaniu z kanałem VDAC, czego konsekwencją są ograniczenia w transporcie cząsteczek, udział potencjału transbłonowego wewnętrznej błony mitochondrialnej w regulacji zdolności transportowych;

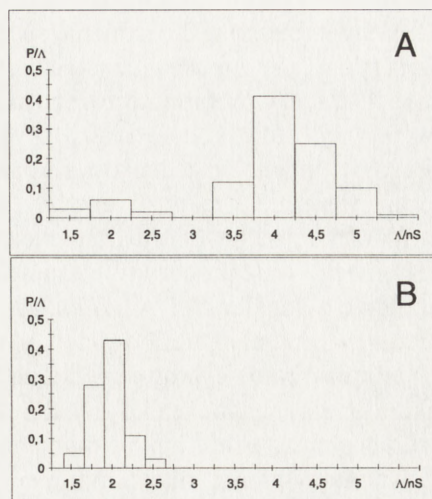
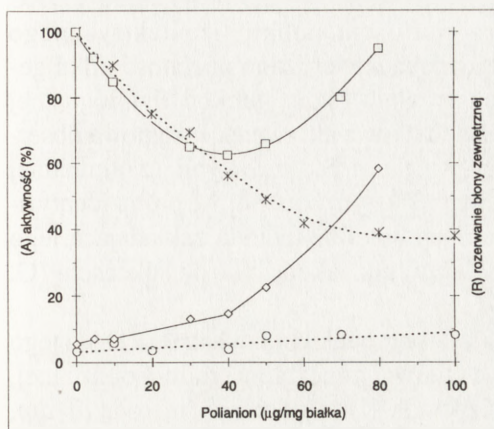
(3) w komórkach mutantów bezporynowych istnieją warunki umożliwiające działanie tego systemu: efektywne stężenie kationów i transportowanych metabolitów. Związek między obecnością kationów dwuwartościowych a efektywnym działaniem tego systemu (hipotetycznego białka kanałowego) w wyizolowanych mitochondriach mutantu może mieć dwa wytłumaczenia:

1) kationy ekranują ujemny ładunek transportowanych cząsteczek;

2) kationy utrzymują postulowany kanał w stanie otwartym [72–74].

Badania w układach rekonstruowanych, prowadzone po solubilizacji detergentem zewnętrznej błony mitochondrialnej mutantu otrzymanego przez Dihanich i in. [33] doprowadziły do ujawnienia białka tworzącego nieregulowany potencjałem kanał o selektywności kationowej oraz o obniżonym przewodnictwie i zmniejszonej w stosunku do kanału VDAC średnicy (1,2 nm) [11,32] (rys. 14).

Dane te pozostają w zgodzie z opracowanym na podstawie testów bioenergetycznych zarysem właściwości hipotetycznego białka kanałowego, lokalizowanego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej innego mutantu bezporynowego (B5) [72–74]. Jednakże, porównanie składu białkowego zewnętrznej błony mitochondrialnej mutantu otrzymanego przez Dihanich i in. [33] i jego wyjściowego szczepu dzikiego nie doprowadziło do zidentyfikowania nowego jakościowo białka [32]. Można więc



Rys. 13. Hamowanie aktywności kinazy adenylanowej (A) w nietkniętych mitochondriach drożdży przez polianion Königa i efekt tego polianionu rozrywający błonę zewnętrzną (R) mierzony testem utleniania egzogenego cytochromu c: (o) – mitochondria szczepu dzikiego), (*) – mitochondria mutanta pozbawionego kanału VDAC

Rys. 14. Histogram przedstawiający zmiany przewodnictwa obserwowane dla sztucznej błonki w obecności: (A) poriny wyizolowanej z mitochondriów szczepu dzikiego drożdży HR125-5B; (B) frakcji zewnętrznej błony mitochondrialnej mutantu bezporynowego drożdży HR125-5A, P/λ – prawdopodobieństwo wystąpienia określonej wartości przewodnictwa pojedynczego kanału; λ/nS – wartość przewodnictwa pojedynczego kanału (wyrażona w nS) [11]

sądzić, iż zidentyfikowany elektrofizjologicznie kanał obecny jest nie tylko w mitochondriach mutantu, ale także w mitochondriach szczepu dzikiego lub też występuje tylko u mutantu w ilościach tak małych, iż nie jest wykrywany metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS PAGE) [32].

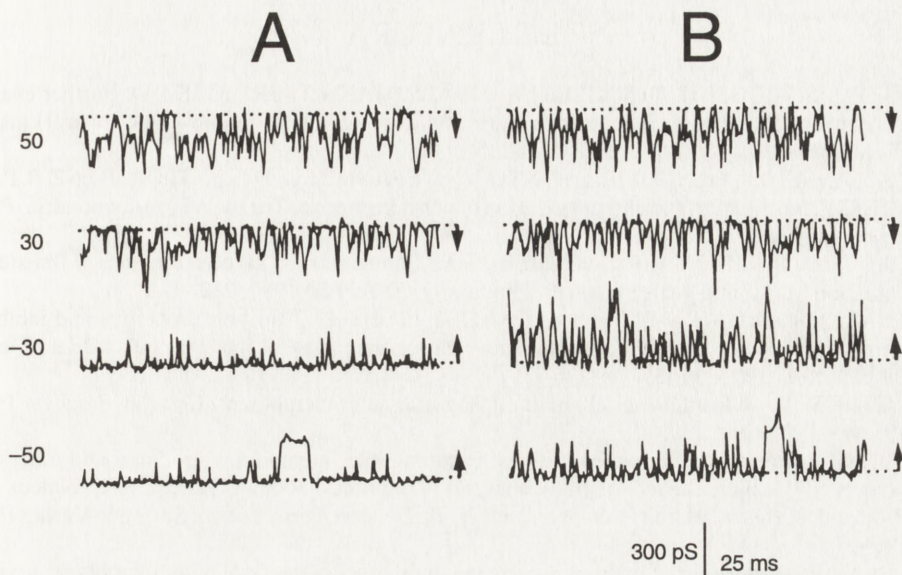
Założenie, iż hipotetyczne białko kanałowe, proponowane dla mutantów bezporynowych, obecne jest także w zewnętrznej błonie mitochondrialnej szczepu dzikiego prowadzi do wniosku, iż istnieją przynajmniej dwa odrębne geny kodujące białka zdolne do tworzenia transportujących metabolity kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Analiza preparatu białkowego zawierającego kanały VDAC, izolowanego z mitochondriów wątroby węgorka, doprowadziła do identyfikacji dwóch frakcji tego kanału różniących się przewodnictwem, średnicą i masą cząsteczkową [31]. Również w mitochondriach kiełków grochu, obok typowego kanału VDAC, stwierdzono obecność kanału o selektywności anionowej, lecz zmniejszonym przewodnictwem i średnicy [87]. Białka tego, ze względu na znikomą jego ilość w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, nie udało się jednakże zidentyfikować metodą SDS PAGE. Przy rekonstrukcji poriny, izolowanej z różnych źródeł, często uzyskuje się dwie populacje, różniące się wartością przewodnictwa pojedynczego kanału

[2,28]. Stwierdzono także istnienie specyficznych tkankowo izoform kanału VDAC różniących się masą cząsteczkową i wartością punktu izoelektrycznego [13,15,49,77,97]. W bibliotece genowej człowieka stwierdzono obecność kilku genów poryny, które kodują białka o przypuszczalnie różnej funkcji fizjologicznej [15,42,65]. Nie można jednak wykluczyć, iż dodatkowa aktywność porynowa obserwowana w układach rekonstruowanych jest artefaktem bądź też wynika z odmiennej konfiguracji tej samej poryny mitochondrialnej [31], tym bardziej, że próba identyfikacji nowego rodzaju poryny w mitochondriach drożdży metodą zakładającą jego homologię z kanałem VDAC (*homology cloning*) nie zakończyła się sukcesem (G. Lauquin, wyniki nieopublikowane).

Natomiast bardziej prawdopodobne jest, iż w przypadku braku kanału VDAC jego funkcje przejmują inne białko zlokalizowane w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, które zasadniczo pełni funkcje odmienne niż kanał VDAC. Stosując metodę *tip dip*, w zewnętrznej błonie mitochondrialnej zarówno mutantu bezporynowego B5, jak i wyjściowego szczepu dzikiego stwierdzono obecność zależnego od potencjału kanału o selektywności kationowej i wysokim przewodnictwie [34,95]. Metoda *tip dip* polega na rejestracji sygnałów elektrycznych w dwuwarstwach tworzonych na zakończeniu mikroelektrod z suspensji proteoliposomów zawierających błony mitochondrialne. Aby wykluczyć, iż obserwowana aktywność jest artefaktem wynikającym z użytej metody, zastosowano rekonstrukcje w sztuczne błonki potwierdzając obecność kanału o identycznych właściwościach [95]. Zidentyfikowany w ten sposób kanał nazwano PSC (z ang. *peptide sensitive channel*), ponieważ jest on blokowany przez peptydy zawierające sekwencję targetową kierującą białko do mitochondriów [45,95]. Ze względu na tę właściwość kanałowi PSC przypisuje się udział w mitochondrialnym aparacie transportu białka [34,102] (rys. 15).

Dzięki zastosowaniu bezporynowego mutantu drożdży B5 [41], stwierdzono elektrofizjologicznie odrębność kanału PSC od kanałów VDAC [34,95]. Identyczność sygnałów charakteryzujących kanał PSC w mutancie bezporynowym B5 i w dzikim szczepie wyjściowym pozwala wnioskować, iż kanał PSC funkcjonuje w zewnętrznej błonie mitochondrialnej niezależnie od obecności czy też braku poryny [34,95]. Kanał kationowy zidentyfikowany w zewnętrznej błonie mitochondrialnej mutantu bezporynowego otrzymanego przez Dihanich i in. [33] swą charakterystyką elektryczną przypomina częściowo kanał PSC [32,34,95], a wykazane różnice wynikać mogą zarówno z zastosowania odmiennych metod badania aktywności kanałów, jak i użycia różnych mutantów bezporynowych.

Wydaje się więc prawdopodobne, iż w przypadku braku kanału VDAC kanał PSC uczestniczyć może w transporcie metabolitów, stanowiąc w ten sposób awaryjny system transportu (*rescue pore, emergency pore*) postulowany dla mitochondriów mutantów bezporynowych [7,74]. Przy braku kanału VDAC system ten jest w stanie zabezpieczyć normalny wzrost komórek i funkcjonowanie mitochondriów. Zakładając, iż główną funkcją kanału PSC jest udział w mitochondrialnym aparacie transportu



Rys. 15. Aktywność kationowo-selektywnego kanału z mitochondriów pozbawionego VDAC mutantu drożdży (A) i blokada tej aktywności przez kationowy peptyd ($10 \mu\text{M}$) z mitochondrialną sekwencją targetową (12 aminokwasów + 1) (B); pomiar prowadzono metodą *tip-dip* w łatkach wyciętych z olbrzymich proteoliposomów azolektynowych, prąd rejestrowano przy różnych potencjałach zaznaczonych po lewej stronie każdego zapisu, strzałki oznaczają kierunek zamykania kanału, identyczne zapisy otrzymano dla mitochondriów dzikiego szczepu drożdży, a więc nie są one obrazem aktywności kanału VDAC [95]

białka, występujące w przypadku mutantu skonstruowanego przez Dihanich i in. [33] opóźnienie wzrostu komórek i obniżony poziom cytochromów mitochondrialnych mogłyby znaleźć swe wytłumaczenie w konkurencji zachodzącej między prowadzonym przez kanał PSC transportem białka i awaryjnym transportem metabolitów.

Usunięcie kanału VDAC z mitochondriów drożdży nie pozwoliło jednak do tej pory rozwiązać problemu, czy kanał ten bierze specyficzny udział w funkcjonowaniu i składzie molekularnym kompleksu MTP (*mitochondrial transition pore*), ponieważ w mutantach bezporynowych skonstruowanych przez Dihanich i in. [33] wykrywa się podobną aktywność kanałową, którą próbuje się tłumaczyć zaangażowaniem kanału PSC w miejsce kanału VDAC. Byłaby to więc następna funkcja PSC (poza transportem metabolitów), którą przejmuje on w nieobecności kanału VDAC, a mianowicie udział w tworzeniu kompleksu MTP. Ponieważ kompleksy białkowe MTP identyfikuje się z kompleksem mitochondrialnego receptora dla benzodiazepin [71,89,90] (rys.9), oznaczałoby to, przez analogię, że kanał PSC może zastąpić kanał VDAC również w tym receptorze. Ta atrakcyjna koncepcja wymaga jednak pełniejszego udokumentowania doświadczonego.

LITERATURA

- [1] ADAMS V, BOSCH W, SCHLEGEL J, WALLIMANN T, BRDICZKA D. Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases. *Biochim Biophys Acta* 1989; **981**: 213–225.
- [2] ALJAMAL JA, GENCHI G, DePINTO V, STEFANIZZI L, DeSANTIS A, BENZ R PALMIERI F. Purification and characterization of porin from corn (*Zea mays* L) mitochondria. *Plant Physiol* 1993; **102**: 615–621.
- [3] AQUILA H, LINK TA, KLINGENBERG M. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria from a homologous protein family. *FEBS Lett* 1987; **212**: 1–9.
- [4] BATHORI G, SAHIN-TOTH M, FONYO A, LIGETI E. Transport properties and inhibitor sensitivity of isolated and reconstituted porin differ from those of intact mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1145**: 168–176.
- [5] BENZ R. Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. *Crit Rev Biochem* 1985; **19**: 145–190.
- [6] BENZ R. Porin from mitochondrial and bacterial outer membranes: structural and functional aspects. [w] Anion carriers of mitochondrial membranes. Azzi A, Nałęcz KA, Nałęcz MJ, Wojtczak L, (red.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag 1989: 199–214.
- [7] BENZ R. Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membrane: reviews on mitochondrial porin. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1197**: 167–196.
- [8] BENZ R, BRDICZKA D. The cation-selective substate of mitochondrial outer membrane pore: single channel conductance and influence of intermembrane and peripheral kinases. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 33–39.
- [9] BENZ R, JANKO K, BOOS W, LAUGER P. Formation of large, ion-permeable membrane channels by matrix protein (porin) of *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 1978; **511**: 305–319.
- [10] BENZ R, KOTTKE M, BRDICZKA D. The cationically selective state of mitochondrial outer membrane pore: a study with intact mitochondria and reconstituted mitochondrial porin. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1022**: 311–318.
- [11] BENZ R, SCHMID A, DIHANICH M. Pores from mitochondrial outer membranes of yeast and a porin-deficient yeast mutant: a comparison. *J Bioenerg Biomembr* 1989; **21**: 439–450.
- [12] BENZ R, WOJTCZAK L, BOSCH W, BRDICZKA D. Inhibition of adenine nucleotide transport through the mitochondrial porin by a synthetic polyanion. *FEBS Lett* 1988; **231**: 75–80.
- [13] BLACHLY-DYSON E, FORTE M. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 379–388.
- [14] BLACHLY-DYSON E, PENG S, COLOMBINI M, FORTE M. Selectivity changes in site-directed mutants of the VDAC ion channel: structural implications. *Science* 1990; **247**: 1233–1236.
- [15] BLACHLY-DYSON E, ZAMBRONICZ EB, YU WH, ADAMS V, McCABE ERB, ADELMAN J, COLOMBINI M. Cloning and functional expression in yeast of two human isoforms of the outer mitochondrial membrane channel, the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1835–1841.
- [16] BRDICZKA D. Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein- transfer. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1071**: 291–312.
- [17] BRDICZKA D, ADAMS V, KOTTKE M, BENZ R. Topology of peripheral kinases: its importance in transmission of mitochondrial energy. [w] Anion Carriers of Mitochondrial Membranes. Azzi A, Nałęcz KA, Nałęcz MJ, Wojtczak L, (red.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag 1989: 361–372.
- [18] BRDICZKA D, WICKER U, GELLERICH FN. The function of the mitochondrial outer membrane pore in the regulation of peripheral kinases and energy metabolism. [w] Molecular

- biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 297–312.
- [19] COLOMBINI M. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* 1979; **279**: 643–645
- [20] COLOMBINI M. Regulation of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1987; **19**: 309–320.
- [21] COLOMBINI M. Voltage gating in the mitochondrial channel, VDAC. *J Membr Biol* 1989; **111**: 103–111..
- [22] COLOMBINI M. Structure and function of the VDAC channel.[w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 281–298.
- [23] COLOMBINI M, YEUNG ChL, TUNG J, KONIG T. The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is regulated by a synthetic polyanion. *Biochim Biophys Acta* 1987; **905**: 279–286.
- [24] DePINTO , BENZ R, CAGGESE C, PALMIERI F. Characterization of the mitochondrial porin from *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 1989; **987**: 1–7.
- [25] DePINTO V, BENZ R, PALMIERI F. Interaction of non-classical detergents with the mitochondrial porin. A new purification procedure and characterization of the pore forming unit. *Eur J Biochem* 1989; **183**: 179–187.
- [26] DePINTO V, AL JAMAL JA, BENZ R, PALMIERI F. Positive residues involved in the voltage-gating of the mitochondrial porin-channel are localized in the external moiety of the pore. *FEBS Lett* 1990; **274**: 122–126.
- [27] DePINTO V, CAIZZIR, ALJAMAL JA, CAGGESE C, PALMIERI F. Experimental supports to a sixteen-strands model of transmembrane arrangement of mitochondrial porin and preliminary results concerning a multigene family in *Drosophila melanogaster* related to human mitochondrial porin. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994: 265–280.
- [28] DePINTO V, LUDWIG O, KRAUSE J, BENZ R, PALMIERI F. Porin pores of mitochondrial outer membranes from high and low eukaryotic cells: biochemical and biophysical characterization. *Biochim Biophys Acta* 1987; **894**: 109–119
- [29] DePINTO V, PALMIERI F. Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 21–26.
- [30] DePINTO V, PREZIOSO G, THINNES F, LINK TA, PALMIERI F. Peptide-specific antibodies and proteases as probes of the transmembrane topology of the bovine heart mitochondrial porin. *Biochemistry* 1991; **30**: 10191–10200.
- [31] DePINTO V, ZARA V, BENZ R, GNONI GV, PALMIERI F. Characterization of pore-forming activity in liver mitochondria from *Anguilla anguilla*. Two porins in mitochondria? *Biochim Biophys Acta* 1991; **1061**: 279–286.
- [32] DIHANICH M, SCHMID A, OPPLIGER W, BENZ R. Identification of a new porein the mitochondrial outer membrane of porin-deficient yeast mutant. *Eur J Biochem* 1989; **181**: 703–708.
- [33] DIHANICH M, SUDA K, SCHATZ G. A yeast lacking mitochondrial porin is respiratory-deficient, but can recover respiration with simultaneous accumulation of an 86-kD extramitochondrial protein. *EMBO J* 1987; **6**: 723–728.
- [34] FEVRE F, CHICH J-F, LAUQUIN GJ-M, HENRY J-P, THIEFFRY M. Comparison of mitochondrial cationic channels in wild-type and porin-deficient mutant yeast. *FEBS Lett* 1990; **262**: 201–204.
- [35] FORTE M, GUY R, MANNELLA C. Molecular genetics of the VDAC ion channel: structural model and sequence analysis. *J Membr Biol* 1987; **19**: 341–350.
- [36] GELLERICH FN, The role of adenylate kinase in dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space. *FEBS Lett* 1992; **297**: 55–58.

- [37] GELLERICH FN, BOHNENSACK R, KUNZ W, Role of the mitochondrial outer membrane in dynamic compartmentation of adenine nucleotides. [w] Anion carriers of mitochondrial membranes. Azzia, Nałęcz KA, Nałęcz MJ, Wojtczak L, (red.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag 1989; 349–359.
- [38] GELLERICH FN, KAPISCHKE M, WAGNER M, BRDICZKA D. Influence of macromolecules on the permeability of porin pores and dynamic compartmentation of adenine nucleotides in the mitochondrial intermembrane space. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 327–340.
- [39] GELLERICH FN, WAGNER M, KAPISCHKE, WICKER U, BRDICZKA D. Effect of macromolecules on the regulation of the mitochondrial outer membrane pore and the activity of adenylate kinase in the intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1142**: 217–227.
- [40] GLICK BS, WACHTER C, SCHATZ G. The energetics of protein import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1101**: 249–251.
- [41] GUO XJ, LAUQUIN GJ-M. Mitochondrial porin-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: *in vitro* construction and preliminary properties. 1986; *EBEC Reports* 4: 292.
- [42] HA H, HAJEK P, BEDWELL DM, BURROWS PD. A mitochondrial porin cDNA predicts the existence of multiple human porin. *J Biol Chem* 1993; **268**: 12143–12149.
- [43] HAMAJIMA S, SAKAGUCHI M, MIHARA K, ONO S, SATO R. Both amino- and carboxy-terminal portions are required for insertion of yeast porin into the outer mitochondrial membrane. *J Biochem* 1988; **104**: 362–367.
- [44] HARTL F-U, PFANNER N, NICHOLSON DW, NEUPERT W. Mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta* 1989; **988**: 1–45.
- [45] HENRY JP, CHICH JF, GOLDSCHMIDT D, THIEFFRY M. Blockade of a mitochondrial cationic channels by an addressing peptide: an electrophysiological study. *J Membr Biol* 1989; **112**: 139–147.
- [46] HOLDEN MJ, COLOMBINI M. The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is modulated by soluble protein. *FEBS Lett* 1988; **241**: 105–109.
- [47] HOLDEN MJ, COLOMBINI M. The outer mitochondrial membrane channel, VDAC, is modulated by a protein localized in the intermembrane space. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1144**: 396–402.
- [48] JURGENS L, ILSEMANN P, KRATZIN HD, HESSE D, ECKART K, THINNES FP, HILSCHMANN N. Studies on human porin IV. The primary structures of "Porin 31HM" purified from human skeletal muscle membranes and of "Porin 31HL" derived from human B lymphocyte membranes are identical. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1991; **372**: 455–463.
- [49] KAYSER H, KRATZIN HD, THINNES FP, GOTZ H, SCHMIDT WE, ECKART K, HILSCHMANN N. II Charakterisierung und Primärstruktur eines 31-kDa-Porins aus menschlichen B-Lymphozyten (Porin 31HL). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989; **370**: 1265–1278.
- [50] KINNALLY KW, TEDESCHI H. Mitochondrial Channels: An Integrated View. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 169–198.
- [51] KLEENE R, PFANNER N, PFALLER R, LINK A, SEBALD W, NEUPERT W, TROPSCHUG M. Mitochondrial porin of *Neurospora crassa*: cDNA cloning, *in vitro* expression and import into mitochondria. *EMBO J* 1987; **6**: 2627–2633.
- [52] KOTTKE M, ADAMS V, RIESINGER I, BREMM G, BOSCH W, BRDICZKA D, SANDRI G, PANFILI E. Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points to hexokinase and creatine kinase location and control of Ca²⁺ transport. *Biochim Biophys Acta* 1988; **935**: 87–102.
- [53] KOTTKE M, ADAMS V, WALLIMANN T, NALAM VK, BRDICZKA D. Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1061**: 215–225.

- [54] LIU MY, COLOMBINI M. Voltage gating of the mitochondrial outer membrane channel VDAC is regulated by a very conserved protein. *Am J Physiol* 1991; **260**: C371–C374.
- [55] LIU MY, COLOMBINI M. A soluble mitochondrial protein increases the voltage dependence of the mitochondrial channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 41–46.
- [56] LIU MY, COLOMBINI M. Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1098**: 255–260.
- [57] LIU MY, TORGRIMSON A, COLOMBINI M. Characterization and partial purification of the VDAC-channel-modulating protein from calf liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1185**: 203–212.
- [58] LUDWIG O, BENZ R, SCHULTZ IE. Porin of Paramecium mitochondria: isolation, characterization and ion selectivity of the closed state. *Biochim Biophys Acta* 1989; **978**: 319–327.
- [59] LUDWIG O, KRAUSE J, HAY R, BENZ R. Purification and characterization of the pore forming protein of yeast mitochondrial outer membrane. *Eur Biophys J* 1988; **15**: 269–276.
- [60] MANGAN PS, COLOMBINI M. Ultrastep voltage dependence in a membrane channel. *Soc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4896–4900.
- [61] MANNELLA C. Mitochondrial outer membrane channel (VDAC, Porin) two-dimensional crystals from *Neurospora*. *Methods Enzymol* 1986; **125**: 595–610.
- [62] MANNELLA C. Electron microscopy and image analysis of the mitochondrial outer membrane channel, VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1987; **19**: 329–340.
- [63] MANNELLA C. Diameter of the mitochondrial outer membrane channel: evidence from electron microscopy of frozen-hydrated membrane crystals. *FEBS Lett* 1989; **253**: 231–234.
- [64] MANNELLA C. Structure of the mitochondrial outer membrane channel derived from electron microscopy of 2D crystals. *J Bioenerg Biomembr* 1989; **21**: 427–437.
- [65] MANNELLA C. The "ins" and "outs" of mitochondrial membrane channels. *TIBS* 1992; **17**: 315–320.
- [66] MANNELLA C. Insights into the structure of the mitochondrial channel, VDAC, provided by electron microscopy. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 249–264.
- [67] MANNELLA C, FORTE M, COLOMBINI M. Towards the molecular structure of the mitochondrial channels VDAC. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 7–19.
- [68] MANNELLA C, GUO X-W. Interaction between the VDAC channel and a polyanionic effector. An electron microscopic study. *Biophys J* 1990; **57**, 23–31.
- [69] MANNELLA C, GUO X-W, DIAS J. Binding of a synthetic targeting peptid to a mitochondrial channel protein. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 55–61.
- [70] MANNELLA C, TEDESCHI H. Importance of the mitochondrial outer membrane channel as a model biological channel. *J Bioenerg Biomembr* 1987; **19**: 305–308.
- [71] McENERY MW. The mitochondrial benzodiazepine receptor: evidence for association with the voltage-dependent anion channel (VDAC). *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 63–69.
- [72] MICHEJDA J, GUO X-J, LAUQUIN GJ-M. Bioenergetic consequences of the lack of mitochondrial porin: identification of a putative new pore. [w] Anion carriers of mitochondrial membranes. Azzi A, Nałęcz KA, Nałęcz MJ, Wojtczak L, (red.) Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo: Springer-Verlag 1989: 225–235.
- [73] MICHEJDA J, GUO X-J, LAUQUIN GJ-M. The respiration of cells and mitochondria of porin deficient yeast mutants is coupled. *Bioch Biophys Res Com* 1990; **171**: 354–361.
- [74] MICHEJDA J, KMITA H, STOBIEŃSKA O, BUDZIŃSKA M, LAUQUIN GJ-M. Restrictions of metabolite permeation through the outer mitochondrial membrane of porin-deficient yeast mutant. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 341–356.

- [75] MIHARA K, SATO R. Molecular cloning and sequencing of cDNA of yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure. *EMBO J* 1985; **4**: 769–774.
- [76] MORAN O, SCIANCALEPORE M, SANDRI G, PANFILI E, BASSI R, BALLARIN C, SORGATO MC. Ionic permeability of the mitochondrial outer membrane. *Eur Biophys J* 1992; **21**: 311–319.
- [77] MLLER G, KORNDORFER A, KORNAK U, MALAISSE WJ. Porin from rat pancreatic islet cells and white adipocytes: identification and regulation of hexokinase binding by the sulfonyleurea glimepiride. *Arch Biochem Biophys* 1994; **308**: 8–23.
- [78] NELSON BD, KABIR F. The role of the mitochondrial outer membrane in energy metabolism of tumor cells. *Biochimie* 1986; **68**: 407–415.
- [79] PALMIERI F, DePINTO V. Purification and properties of the voltage-dependent anion channel of the outer mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 1989; **21**: 417–425.
- [80] PENG S, BLACHLY-DYSON E, COLOMBINI M, FORTE M. Determination of the number of polypeptide subunits in a functional VDAC channel from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 27–31.
- [81] PENG S, BLACHLY-DYSON E, FORTE M, COLOMBINI M. Large scale rearrangement of protein domains is associated with voltage gating of the VDAC channel. *Biophys J* 1993; **62**: 1–9.
- [82] PFANNER N, WEINZIERL A. Mechanisms of mitochondrial protein import. *Int. J Biochem* 1992; **24**: 65–69.
- [83] PON L, MOLL T, VESTWEBER D, MARSHALLSAY B, SCHATZ G. Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol* 1989; **109**: 2603–2616.
- [84] POTTOSIN II. One of the chloroplast envelope ion channels is probably related to the mitochondrial VDAC. *FEBS Lett* 1993; **330**: 211–214.
- [85] ROJO M, HOVIUS R, DEMEL RA, NICOLAY K, WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 1991; **266**: 200290–20295.
- [86] SCHEIN SJ, COLOMBINI M, FINKELSTEIN A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from *Paramecium mitochondria*. *J Membr Biol* 1976; **30**: 99–120.
- [87] SCHMID A, KROMER S, HELDT HW, BENZ R. Identification of two general diffusion channels in the outer membrane of pea mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1112**: 174–180.
- [88] SORGATO MC, MORAN O. Channels in mitochondrial membranes: knows, unknowns and prospects for the future. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1993; **18**: 127–171.
- [89] SZABO I, DePINTO V, ZORRATI M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS Lett* 1993; **330**: 206–210.
- [90] SZABO I, ZORATTI M. The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS Lett* 1993; **330**: 201–205.
- [91] SZABO I, ZORATTI M. The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* 1992; **24**: 111–117.
- [92] TAKAHASHI K, ONO H, YOSHIDA T, TUBOI S. Integration of porin into outer mitochondrial membrane through the common import machinery located in contact sites. *Biochem Mol Biol Int* 1993; **29**: 429–434.
- [93] TEDESCHI H, KINNALLY KW. Channels in the mitochondrial outer membrane: evidence from patch clamp studies. *J Bioenerg Biomembr* 1987; **19**: 321–327.

- [94] TEDESCHI H, MANNELLA CA, BOWMAN ChL. Patch clamping the outer mitochondrial membrane. *J Membr Biol* 1987; 97: 21-29.
- [95] THIEFFRY M, FEVRE F, PELLESCI M, HENRY JP. The mitochondrial outer membrane contains at least two distinct channels. 1992. [w] Forte M, Colombini M, red. Molecular biology of mitochondrial transport system. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 209-220.
- [96] THINNES FP. Evidence for extra-mitochondrial localization of the VDAC/porin channel in eucaryotic cells. *J Bioenerg Biomembr* 1992; 24: 71-75.
- [97] THINNES FP, GOTZ H, KAYSER H, BENZ R, SCHMIDT WE, KRATZIN HD, HILSCHMANN N. I. Reinigung eines Porins aus menschlichen B-Lymphozyten (Porin 31HL) und sein topochemischer Nachweis auf dem Plasmalemm der Herkunftszelle. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1989; 370: 1253-1264.
- [98] THOMAS L, BLACHLY-DYSON E, COLOMBINI M, FORTE M. Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion selective channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5446-5449.
- [99] THOMAS L, BLACHLY DYSON E, COLOMBINI M, FORTE M. Probing for the voltage sensor in a mitochondrial channel, VDAC, using site-directed mutagenesis. [w] Molecular biology of mitochondrial transport system. Forte M, Colombini M, (red.)Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1994; 229-248.
- [100] THOMAS L, KOCSIS E, COLOMBINI M, ERBE E, TRUS BL, STEVEN AC. Surface topography and molecular stoichiometry of the mitochondrial channel, VDAC, in crystalline arrays. *J Struct Biol* 1991; 106: 161-171.
- [101] TROLL H, MACHLOW D, MULLER-TAUBENBERGER A, HUMBEL B., LOTTSPREICH F, ECKE M, GERISCH G, SCHMID A, BENZ R. Purification, functional characterization and cDNA sequencing of mitochondrial porin from *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1992; 267: 21072-21079.
- [102] VALLETTE FM, JUIN P, PELLESCI PJM, HENRY J-P. Basic peptides can be imported into yeast mitochondria by two distinct targeting pathways. Involment of the peptide-sensitive channel of the outer membrane. *J Biol Chem* 1994; 269: 13367-13374.
- [103] WALLIMANN T, WYSS M, BRDICZKA D, NICOLAY K, EPPENBERGER M. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992; 281: 21-40.
- [104] WEISS MS, KREUSCH A, SCHILTZ E, NESTEL U, WELTE W, WECKESSER J, SCHULZ GE. The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution. *FEBS Lett* 1991; 280: 379-382.
- [105] WICKER U, BUCHELER K, GELLERICH FN, WAGNER M, KAPISCHKE M, BRDICZKA D. Effect of macromolecules on the structure of the mitochondrial inter-membrane space and the regulation of hexokinase. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1142: 228-239.
- [106] WUNDER UR, COLOMBINI M. Patch clamping VDAC in liposomes containing whole mitochondrial membranes. *J Membr Biol* 1991; 123: 83-91.
- [107] ZHANG D-W, COLOMBINI M. Inhibition by aluminium hydroxide of the voltage dependent closure of the mitochondrial channel, VDAC. *Biochim Biophys Acta* 1989; 991: 68-78.
- [108] ZHANG D-W, COLOMBINI M. Group III A-metal hydroxides indirectly neutralize the voltage sensor of the voltage-dependent mitochondrial channel, VDAC, by interacting with a dynamic binding site. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1025: 127-134.

Otrzymano: 20.10.1994 r.

Przyjęto: 25.10.1994 r.

Adres autora: 61-701 Poznań, ul. Fredry 10

**PRZESZCZEPIANIE KOMÓREK
KRWIOTWÓRCZYCH KRWI PĘPOWINOWEJ
U CZŁOWIEKA
– ALTERNATYWA DLA PRZESZCZEPIEŃ SZPIKU
KOSTNEGO**

TRANSPLANTATION OF HUMAN UMBILICAL CORD
HEMATOPOIETIC CELLS – AN ALTERNATIVE
TO BONE MARROW TRANSPLANTATION

Krzysztof ILNICKI*, Wiesław WIKTOR-JĘDRZEJCZAK**

*Bank Tkanek Zakładu Genetyki Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie; ** Zakład Immunologii Centralnego Szpitala Klinicznego WAM w Warszawie

Streszczenie. Wykazano, że krew pępowinowa zawiera komórki macierzyste krwiotworzenia wystarczające do ustanowienia hematopoезy u dzieci i prawdopodobnie zdolne do dokonania tego u dorosłych biorców. Krew pępowinowa jest materiałem łatwo dostępnym i uzyskiwanym bez narażania dawcy na jakiegokolwiek niebezpieczeństwo. Może być również przechowywana w zamrożeniu i dlatego nadaje się do tworzenia banków komórek krwiotwórczych do przeszczepienia. Obecnie wykonano około pięćdziesięciu przeszczepień allogenicznej krwi pępowinowej, w tym dwa od dawców niespokrewnionych, a pozostałe od nowonarodzonego rodzeństwa biorcy. W artykule omówiono zarówno teoretyczne przesłanki wykorzystania komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej zamiast szpiku, jak i aspekty praktyczno-techniczne wszystkich faz pozyskiwania, preparowania, przechowywania i przeszczepiania tych komórek u ludzi.

Summary. It has been shown that human umbilical cord blood contains hematopoietic stem cells in the number sufficient for establishing hematopoiesis in children, and most likely capable of doing so also in adult recipients. Umbilical cord blood is easily available and obtained without creating any risk for a donor. It can be easily stored and, therefore, is a good source of cells for the banks of hematopoietic cells. Until now, about fifty allogeneic transplantations of umbilical cord blood have been performed including two from unrelated donors and remaining from newborn siblings. In this review both the theoretical basis and practical and technical aspects of all phases of procurement, preparation, storage and transplantation of hematopoietic cells of umbilical cord blood instead of bone marrow in man are discussed.

Przeszczepianie szpiku kostnego jest szeroko stosowaną metodą leczenia nowotworowych i nienowotworowych chorób układu krwiotwórczego. Najwięcej pozytywnych wyników leczenia uzyskano w wyniku przeszczepienia szpiku między rodzeństwem posiadającym takie same antygeny zgodności tkankowej. Jednakże, tylko 20% chorych ma takich dawców. Dla pozostałych dodatkową możliwością znalezienia dawcy oferują rejestry honorowych dawców szpiku – osób niespokrewnionych z biorcą, które wyraziły gotowość oddania szpiku w razie potrzeby. Ze względu na szczególnie duży polimorfizm układu HLA tylko dodatkowych 20% biorców może liczyć na znalezienie takiego alternatywnego dawcy mimo znacznej liczby zarejestrowanych [35,72,80]. Na niezadowalającą sytuację w zakresie dawstwa szpiku kostnego mogą mieć wpływ dwa czynniki:

- pewna uciążliwość samego zabiegu pobierania szpiku oraz
- ryzyko związane z anestezją stosowaną przy pobieraniu [81].

Mogą one mieć wpływ na labilność w obrębie rejestru dawców, tym bardziej uciążliwą w przypadku niezapowiedzianej rezygnacji potencjalnego dawcy. Nie bez znaczenia są wysokie koszty procedury typowania antygenów zgodności tkankowej nowych dawców, którzy dołączają do rejestru w miarę ubywania poprzednich.

Opracowano metodę pobierania szpiku kostnego ze zwłok [51]. Wydaje się jednak, że ta metoda tylko w niewielkim stopniu zwiększy dostępność materiału do przeszczepień, natomiast wieloetapowa i skomplikowana obróbka kości z pewnością zwiększa ryzyko zakażenia.

Stwierdzono, że obecne w wątrobie płodowej komórki krwiotwórcze nadają się do przeszczepienia. Wykazano skuteczność takiego zabiegu w odniesieniu do ciężkiego skojarzonego niedoboru odporności [76], jednakże próby zastosowania komórek krwiotwórczych wątroby płodowej do leczenia niedokrwistości aplastycznej nie dały zachęcających wyników. Komórki krwiotwórcze wątroby płodowej wydają się mieć zasadniczą zaletę nad komórkami szpiku kostnego dawcy dorosłego czy ze zwłok. Wielu autorów [35,75] wskazuje na niski poziom reakcji: Przeszczep Przeciw Gospodarzowi (PPG) w przypadku niedokładnego doboru dawcy i biorcy, dużo mniejszy niż w przypadku takiej samej różnicy w obrębie układu HLA między biorcą a dorosłym dawcą szpiku.

Na niepowodzenia w zastosowaniu komórek wątroby płodowej mogą mieć wpływ, poza innymi czynnikami, niewystandaryzowane i niedoskonałe metody pozyskiwania materiału wzorowane na doświadczeniach ze zwierzętami. Opracowano [41] standardową metodę umożliwiającą pozyskanie komórek krwiotwórczych z wątroby płodowej z maksymalną wydajnością. Touraine [76] opisał trzy budzące nadzieję przypadki podania komórek krwiotwórczych wątroby płodowej *in utero*, bez ustalania zgodności tkankowej między dawcą a biorcą.

Jednakże dostępność wątroby i innych narządów płodowych jest mocno ograniczona ze względów naturalnych, a w wielu krajach dodatkowo przepisami prawnymi i względami etycznymi.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na jeszcze jedno źródło komórek krwiotwórczych, jakim jest krew pępowinowa, która jest materiałem łatwo dostępnym i wcześniej nie była wykorzystywana do innych celów.

2. PODSTAWOWE DANE O ROZWOJU UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Zarodkowy rozwój układu krwiotwórczego rozpoczyna się od powstania macierzystych komórek krwiotworzenia – *hematopoietic stem cells*. Te komórki mają bardzo duży potencjał samoodnawiania i pełne zdolności do wielokierunkowego różnicowania się. Komórki te mogą całkowicie odtworzyć układ krwiotwórczy po ich wprowadzeniu do organizmu biocy uprzednio poddanego działaniu cytostatyków bądź letalnego napromieniowania. Mikrośrodowisko, w którym rozwija się krwiotworzenie w narządach, tworzą fibroblastoidalne komórki podścieliska – *stromal cells*. One też różnią się w zależności od narządu, w którym występują i wpływają na typ wytwarzanych komórek krwiotwórczych [40,60].

Jest wysoce prawdopodobne, że zarówno komórki podścieliska, jak i ich komórki wyjściowe mają inne pochodzenie niż macierzyste komórki krwiotwórcze [40,65].

U człowieka w momencie porodu krwiotworzenie jest już prawie w całości przemieszczone do szpiku kostnego, niemniej istnieją jeszcze ślady hematopoezy wątrobowej i śledzionowej [42].

Mimo zewnętrznego podobieństwa istnieje szereg zasadniczych różnic między hematopoezą płodową, a szpikową dorosłego osobnika. W krwiotworzeniu płodowym występuje wysokie tempo namnażania komórek, stały i szybki wzrost puli komórkowej, różnicowanie *in vivo* głównie wzdłuż szlaku erytroidalnego, przyspieszony czas dojrzewania (*in vitro*) większa wrażliwość na erytropoetynę oraz mniejsza wrażliwość na czynniki stymulujące wzrost kolonii granulocytarno-makrofagowych. Dla przykładu, na początku drugiego trymestru najwyższy jest odsetek BFU-E. W tym okresie jest on około 3 razy wyższy niż później we krwi pępowinowej i 10 razy wyższy niż w szpiku osobnika dojrzałego [30].

Tworzenie kolonii z komórek podścieliska krwi płodowej jest wolniejsze niż ze szpiku [60]. Izolowane komórki macierzyste i ukierunkowane (CD34+++) z krwi pępowinowej są dużo mniej wrażliwe na cytokiny supresyjne (H-ferrytyna, TGF- β 1, MIP-1 α i inne) niż analogiczne komórki szpiku osobnika dorosłego [49].

Wydaje się, że powyższe różnice między hematopoezą płodową a szpikową wynikają z tego, że z natury rzeczy komórki hematopoezy płodowej są bliższe swojego początku, tj. pierwszych krwiotwórczych komórek macierzystych danego osobnika, a komórki hematopoezy dojrzałej dzieli od tego okresu dłuższy czas i więcej podziałów samoodnawiania, różnicowania i dojrzewania [42].

Te i inne różnice między komórkami krwiotwórczymi obecnymi we krwi pępowinowej a komórkami krwiotwórczymi szpiku nie mają charakteru zasadniczego i w związku z tym nie wykluczają wykorzystania tych pierwszych do ustanowienia krwiotworzenia po przeszczepieniu zamiast komórek szpikowych. Problemy te zostaną omówione w dalszej części pracy.

3. KOMÓRKI KRWIOTWÓRCZE KRWI PĘPOWINOWEJ

Zander [84] sugeruje, że krew obwodowa dzieci zawiera więcej komórek krwiotwórczych niż krew dorosłych.

Wiele danych wskazuje na to, że krew pępowinowa jest bogatym źródłem komórek krwiotwórczych o wysokim potencjale proliferacyjnym [4,15,16,29,55]. Należy nadmienić, że nie ma dotychczas dobrych metod bezpośredniego badania komórek macierzystych człowieka, a przedstawione wyniki uzyskano w większości metodami pośrednimi.

Di Landro i wsp. [46] oraz Gluckmann [32] stwierdzili większą częstość występowania komórek tworzących kolonie granulomonocytarne (CFC-GM) we krwi pępowinowej niż we krwi obwodowej dorosłego czy w szpiku kostnym, oraz ich względną niedojrzałość w stosunku do CFC-GM szpikowych. Zaobserwowali też ich wysoką wrażliwość na czynniki stymulujące (CSF) oraz szybszy rozwój (w 10–12 dniu hodowli). Z kolei Hows i wsp. [38,39] stwierdzili większą niż w szpiku częstość występowania komórek tworzących kolonie erytrocytarne (BFU-E) oraz wskazali na obecność we krwi pępowinowej prymitywnych komórek tworzących kolonie megakariocytarne (CFU-Mk) tworzących większe kolonie niż CFU-Mk szpikowe. Olson i wsp. [57] również porównali kolonie megakariocytarne z krwi pępowinowej i ze szpiku. Wykazali, że liczba CFC-Mk we krwi pępowinowej jest nieco większa niż we krwi obwodowej, lecz znacznie mniejsza niż w szpiku. Wykazali też, że kolonie tworzone przez CFC-Mk krwi pępowinowej są liczebniejsze.

Lynch i wsp. [52] oszacowali liczbę CFC-GM na 100-krotnie, a BFU-E na 400-krotnie większą niż we krwi obwodowej oraz zaobserwowali większą wrażliwość tych komórek na odpowiednio CSF i Epo. Broxmeyer i wsp. [17] używając *Steel Factor* (SF) stwierdzili lepszą odpowiedź CFC-GM i CFC-GEMM pochodzących z krwi pępowinowej niż ze szpiku. Można wnioskować, że powyższe komórki z krwi pępowinowej są mniej dojrzałe niż ze szpiku.

Nakahata i wsp. [54] również stwierdzili występowanie we krwi pępowinowej bardziej prymitywnych komórek, tzw. CFC-GEMM, nie stwierdzili komórek tworzących kolonie limfocytarne oraz wykryli obecność licznych komórek tworzących kolonie złożone z blastów o dużym potencjale samoodnawiania. Leary i wsp. [48] otrzymali kolonie blastów z hodowli krwi pępowinowej stymulowanej podłożem pochodzącym z hodowli limfocytów z fitohemaglutyniną. Nie zaobserwowano tego

typu kolonii w szpiku. Cicuttini i wsp. [21] sygnalizują obecność progenitorów limfocytów NK we krwi pępowinowej, których ilość szacują na 1% wszystkich komórek jądrzastych. Foa i wsp. [29] uzyskali z krwi pępowinowej kolonie limfocytów T jednakże w ilości wyraźnie mniejszej niż w normalnej krwi obwodowej stymulowanej PHA.

Cardoso i wsp. [18] porównywali zdolności komórek CD34+CD38- (frakcja zawierająca krwiotwórcze komórki macierzyste) ze szpiku i krwi pępowinowej do produkcji komórek ukierunkowanych w długotrwałej hodowli. Ustalili że: frakcja komórek CD34+CD38- jest ok. 4-krotnie liczniejsza we krwi pępowinowej; komórki CD34+CD38- z krwi pępowinowej i szpiku wytwarzają porównywalne liczby komórek CFU-GEMM, lecz produkują 2-krotnie większą liczbę komórek CFU-GM i 3-krotnie większą liczbę BFU-E. Ponadto, kolonie tworzone przez komórki ukierunkowane z krwi pępowinowej były znacznie większe niż szpikowe. Niemniej, stwierdzili również ok. 4-krotnie mniejszą wydajność generacji późnych komórek ukierunkowanych przez komórki krwi pępowinowej.

Z kolei Kinnburgh i wsp. [43] stwierdzili we krwi pępowinowej podobną liczbę komórek CD34+, jak w szpiku, lecz większą liczbę prymitywnych komórek o fenotypie LTC-IC (CD34+/CD45RO+). Falkenburg i wsp. [27] wykazali, że jakkolwiek całkowita liczba komórek krwiotwórczych w krwi pępowinowej i w szpiku jest podobna, to liczba komórek na wczesnym etapie rozwoju jest ok. 2-krotnie wyższa w krwi pępowinowej. Częstość występowania BFU-E ocenili na podobną jak w szpiku, częstość CFU-GM na niższą, a CFU-GEMM na ponad 2-krotnie wyższą niż w szpiku.

Z krwi pępowinowej bardzo trudno jest uzyskać hodowlę długoterminową. Prindull i wsp. [60] wykazali jednak obecność komórek tworzących kolonie fibroblastoidalne (CFC-F) we krwi pępowinowej, które tworzyły te kolonie w obecności kortizonu a bardzo rzadko bez. Równie wzrost komórek podścieliska z krwi pępowinowej jest wolniejszy. To może uzasadniać trudności z uzyskaniem hodowli długoterminowej z krwi pępowinowej [39,73], której komórki podścieliska będące źródłem CSF nie nadążają za wzrostem komórek krwiotwórczych. Hows [38] twierdzi, że na wcześniej wytworzonym podścielisku komórki z krwi pępowinowej rosną dynamiczniej niż odpowiednie komórki szpiku. Biesecker i wsp. [9] wykazali, że surowica krwi pępowinowej jest bogatym źródłem interleukiny 6 i pobudza krwiotworzenie zarodkowych komórek macierzystych *in vitro*.

Wielu autorów koreluje liczbę prymitywnych komórek krwiotwórczych we krwi pępowinowej z wczesnym porodem [14,33,72,73,74]. Jednakże DiLandro [46] nie stwierdza zwiększonej ilości GM-CFC u wczesnie urodzonych, przeciwnie, wskazuje na nieco wyższy odsetek tych komórek we krwi pępowinowej noworodków urodzonych w terminie. Sugeruje natomiast pozytywną korelację między ilością prymitywnych komórek krwiotwórczych a niedomaganiem w czasie ciąży, takimi jak nadciśnienie, infekcja czy inne.

4. WYKORZYSTANIE KRWI PĘPOWINOWEJ DO ODTWORZENIA KRWIOTWORZENIA

Opisując pionierskie prace Broxmeyera J. Corlis [23] twierdzi, że ... "krew pępowinowa może być linią życia dla niektórych chorych".

Wiele danych z praktyki klinicznej wskazuje, że liczba komórek krwiotwórczych w jednej porcji krwi pępowinowej starcza do pełnego odtworzenia krwiotworzenia u prawie 100% dzieci (do 50 kg wagi) i u ok. 50% dorosłych [32,33,35,80]. Zdaniem Falkenberga [27]) przy założeniu, że udane przeszczepienie wymaga podania 10^4 CFU-GM na kg masy ciała biorcy, należy choremu przetoczyć przynajmniej 1 ml krwi pępowinowej na 1 kg masy ciała biorcy. Można z tego wnioskować, że porcja 100–150 ml pobranej krwi pępowinowej powinna wystarczyć do odtworzenia krwiotworzenia osobnika dorosłego.

Broxmeyer i wsp. [15], Auerbach i wsp. [4], Gluckmann i wsp. [32,33], Kohli-Kumar i wsp. [45] i inni użyli z powodzeniem krwi pępowinowej do odtworzenia krwiotworzenia po leczeniu anemii Fanconiego u dzieci. Wagner i wsp. [80] opisali przypadek wykorzystania krwi pępowinowej do odtworzenia krwiotworzenia po leczeniu młodzieńczej formy przewlekłej białaczki szpikowej. Bogdanic i wsp. [11] opisali przypadek wykorzystania krwi pępowinowej do odtworzenia krwiotworzenia u 28-miesięcznej dziewczynki chorej na przewlekłą białaczkę szpikową z chromosomem Ph'. Vilmer i wsp. [79] użyli krwi pępowinowej w przypadku zaawansowanej białaczki limfatycznej. Oprócz opisanych powyżej przypadków, sygnalizowano użycie krwi pępowinowej do odtworzenia krwiotworzenia w takich schorzeniach, jak neuroblastoma, limfoproliferacyjne choroby związane z chromosomem X czy niedokrwistość aplastyczna po zapaleniu wątroby [35]. W związku z tym, że układ odpornościowy w chwili porodu jest jeszcze daleki od osiągnięcia swojego ostatecznego stadium rozwoju [34], reakcja PPG jest bardzo słaba w przypadku podania krwi pępowinowej biorcy niezgodnemu [32,45,79]. Z wyżej wymienionych względów, również niezgodność w obrębie układu ABO nie jest przeszkodą w dokonaniu przeszczepu [33,80].

We krwi pępowinowej stwierdzono znaczny odsetek komórek niedojrzałych czynnościowo, nieuczulonych i wykazujących silną aktywność supresyjną [35,59,79]. Jednakże Broxmeyer [15] przestrzega o zagrożeniu reakcją GVH w przypadku zanieczyszczenia krwi pępowinowej krwią matki.

Dotychczas wykonano na świecie ponad 40 udanych zabiegów przeszczepienia allogenicznych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. W tej liczbie mieszczą się też dwa udane zabiegi przeszczepienia krwi uzyskanej z banku, pochodzącej od niespokrewnionych dawców. Częstość powikłań przy tych zabiegach była znacznie mniejsza niż po przeszczepieniu szpiku [5].

5. PROBLEMY TECHNICZNE ZWIĄZANE Z WDRAŻANIEM TEJ METODY LECZNICZEJ

Brossard [14] wylicza szereg sytuacji klinicznych, w których należy odstąpić od pobrania krwi pępowinowej.

Rozważając natomiast problemy techniczne związane z pobraniem należy zwrócić uwagę na sprawę zasadniczą, jaką jest jednorazowość pobrania porcji krwi pępowinowej i niewielka objętość próbki. Uzupełnić krew pępowinową można tylko szpikiem pobranym od tego samego dawcy. Obraz odsetkowy krwi noworodka zmienia się bardzo szybko w kierunku obrazu normalnego i już po 24 godzinach liczba komórek we wczesnym stadium rozwojowym zmniejsza się do 50% [17,72,74]. Dlatego też spośród rozważanych technik należy zastosować te, które gwarantują największą wydajność pozyskania krwi pępowinowej i najmniejsze straty w jej dalszej obróbce.

Następujące procedury składają się na cykl obróbki:

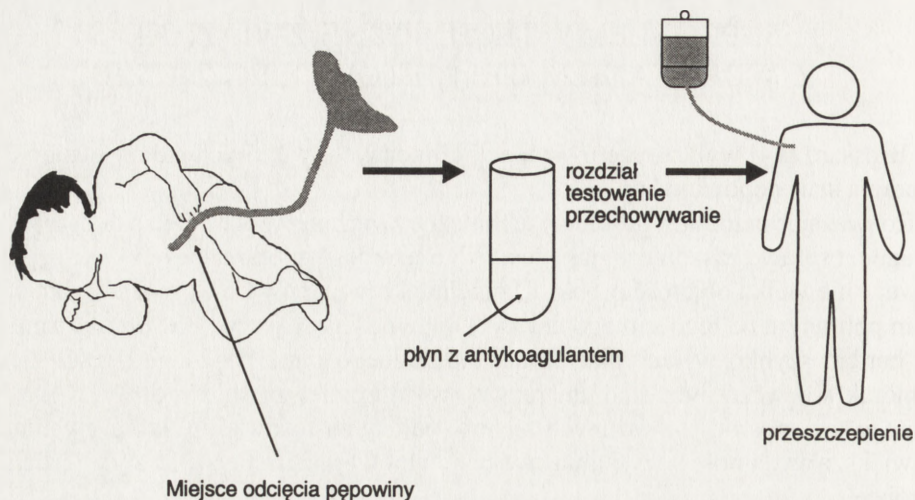
- pozyskanie krwi pępowinowej,
- obróbka przed krioprezerwacją, w tym ewentualna izolacja frakcji leukocytarnej,
- krioprezerwacja,
- obróbka po odmrózeniu – ewentualne odplukanie substancji kriochronnej.

Metody pozyskania krwi pępowinowej można ogólnie podzielić na 2 grupy: pasywne i aktywne.

Metoda pasywna polega na postępowaniu identycznym jak podczas normalnego porodu. Naczynia pępowinowe zostają zaciśnięte klemem w odległości 5–7 cm od pępka, przecięte, a krew grawitacyjnie spuszczone do naczynia z antykoagulantem. Z badań autora wynika, że na 22 pobrane porcje średnia objętość próbki pobranej tą metodą wynosiła 47 ml, największa porcja zawierała 90, a najmniejsza 25 ml krwi. Generalnie można sądzić, że metoda ta pozwala na pozyskanie dostatecznej ilości krwi do odtworzenia krwiotworzenia tylko u małego dziecka. Gluckman [35] opisuje znaczny rozrzut w zakresie zarówno objętości pozyskiwanej krwi, jak i liczby obecnych w niej komórek, w tym komórek ukierunkowanych.

Nie stwierdzono korelacji między liczbą przeżytych ciąż czy płcią dziecka, a liczbą pozyskanych komórek jądrzastych. Również nie stwierdzono korelacji między pozyskaną objętością krwi a liczbą pozyskanych komórek ukierunkowanych, co pozwala wnioskować, że nawet niewielkie próbki mogą zawierać dostateczną liczbę komórek ukierunkowanych do wszczepienia. Z danych autora wynika, że na 34 pobrane próbki krwi pępowinowej średnia leukocytoza wynosiła 17,2 tys. komórek na μl , przy najwyższej wynoszącej 24,8, a najniższej 12,1 tys. komórek jądrzastych w 1 μl krwi, co daje między 210 a 1370 mln komórek w całej próbce.

Opisano kilka metod aktywnych zwiększających ilość pobranej krwi. O ile jednak metodą pasywną krew pępowinową może pozyskać asystująca przy porodzie położna, o tyle przy metodzie aktywnej należy uwzględnić na sali porodowej obecność pra-



Rys. 1. Sposób opracowania krwi pępowinowej przeznaczonej do przeszczepienia

cownika zajętego wyłącznie pozyskiwaniem krwi pępowinowej. Broxmeyer i wsp. [15,16] oraz Auerbach i wsp. [4] po zaklejeniu naczyń pępowinowych pobierali krew spływającą grawitacyjnie przy łożysku pozostającym jeszcze w macicy, a dodatkową ilość aspirowali z naczyń łożyska po jego urodzeniu. Uzyskiwali przeciętnie 80 ml. Thierry i wsp. [73] cewnikowali naczynie pępowinowe igłą o dużej średnicy, gdy łożysko znajdowało się w macicy, uzyskali podobną wydajność jak Broxmeyer. Turner i wsp. [78] zmodyfikowali 2-etapową metodę Broxmeyera poprzez aktywną perfuzję odciętego łożyska roztworem soli fizjologicznej z antykoagulantem. Uzyskali ponad 2-krotnie większą ilość pozyskiwanej krwi w stosunku do klasycznej metody Broxmeyera.

Cesarz i wsp. [19] porównali 3 metody pozyskiwania krwi. Po odcięciu pępowiny, dwie pierwsze polegały na aspirowaniu krwi z naczyń pępowinowych strzykawką, a trzecia na przecięciu naczyń pępowinowych i wspomaganie grawitacyjnego spływania krwi wytlaczaniem. Żadna z zastosowanych metod nie wpływała na żywotność komórek jądrzastych, natomiast porcja pobrana trzecią metodą była 2–2,5-krotnie większa niż pierwszą czy drugą.

Kolejnym zagadnieniem jest wybór odpowiedniego antykoagulantu. W zasadzie ani heparyna, ani ACD nie wpływają na żywotność komórek jądrzastych [16], jednak więcej autorów używa heparyny w stężeniu 50 U/ml [19,46,72] niż ACD [16,78]. Turner i wsp. [78] twierdzą, że ACD w stężeniu do 20% nie działa toksycznie na komórki jądrzaste. Jednakże, jak wynika z obserwacji autora, przy pobieraniu krwi pępowinowej metodą pasywną na wstępnie przygotowany roztwór ACD trudno jest

przewidzieć wielkość pobranej próbki i często w przypadku małych porcji zdarza się znaczne przekroczenie 20%, co już ma zdecydowanie negatywny wpływ zarówno na obraz mikroskopowy, jak i na żywotność komórek.

Do dezynfekcji naczyń pępowinowych i łożyska stosowana jest 10% betaina [78] lub 70% etanol [19]. Thierry i wsp. [74] oraz inni autorzy zalecają przetrzymywanie pobranej krwi w temp. 4°C i możliwie najszybszą jej dalszą obróbkę.

Gluckmann i wsp. [32,33,34], Vilmer i wsp. [79] i Broxmeyer i wsp. [15] nie wykonują ani wstępnego rozdziału, ani odpłukiwania krioprotektora z krwi pępowinowej przeznaczonej do transplantacji. Broxmeyer [16] nie stwierdził różnicy w liczbie kolonii komórek progenitorowych wyhodowanych z mrożonej krwi rozdzielanej i nierozdzielanej.

Rodzi to konieczność wprowadzenia do organizmu biorcy kilku do kilkunastu ml DMSO oraz erytrocytów ewentualnie niezgodnych z biorcą. W związku z tym, że wyżej wymienieni autorzy zamrażają krew pępowinową w workach powstają dwa dodatkowe problemy związane z koniecznością przetrzymania rozmrożonego materiału w worku w temperaturze pokojowej:

- możliwość spontanicznego kłaczowania oraz
- narażenie zawartych w materiale komórek krwiotwórczych na dłuższą ekspozycję na 10% DMSO.

Goldmann i wsp. [36] zalecają bądź szybkie rozcieńczenie rozmrożonego materiału 10-krotną objętością podłoża hodowlanego, bądź jego jak najszybsze wprowadzenie do organizmu biorcy. W przypadku worków o pojemności 50–150 ml taka procedura jest niewykonalna. W niektórych ośrodkach materiał zamrażany jest w 10-mililitrowych probówkach, które są sukcesywnie rozmrażane przy łóżku chorego. Spontanicznemu kłaczowaniu można dosyć skutecznie zapobiegać stosując DNA-zę I lub EDTA. Abrams i wsp. [1] oraz Rowley i wsp. [63] stwierdzają, że jednogodzinne przetrzymywanie komórek krwiotwórczych w 10% DMSO w temperaturze pokojowej nie wpływa na liczbę utworzonych kolonii. Berthier i wsp. [6,7,8], Ellis i wsp. [25], Goldmann i wsp. [36] oraz van de Oувeland i wsp. [58] nie stwierdzają wpływu 0,1% roztworu DMSO dodanego do podłoża hodowlanego na ilość utworzonych kolonii. Ellis nie stwierdza ponadto działania toksycznego DNA-zy I w stężeniu 10 IU/ml.

Nie ma danych sugerujących, że kilka do kilkunastu mililitrów DMSO wprowadzone do organizmu biorcy przy okazji podania krwi pępowinowej wpływa na proces odtworzenia krwiotworzenia.

Brobyn [12] twierdzi, że "...DMSO wydaje się być bardzo bezpiecznym lekiem przy podaniu dożylnym". Yellowless i wsp. [83] stwierdzają, że DMSO (użyte do leczenia zapalenia stawów) jest lekiem bezpiecznym, jakkolwiek osobniczo może wywoływać pewne zaburzenia, jednak krótkotrwałe i całkowicie odwracalne.

Podanie nierozdzielonej krwi pępowinowej wiąże się z wprowadzeniem do organizmu biorcy również niewielkiej ilości lizatu erytrocytów oraz erytrocytów nieuszkodzonych. Ma i wsp. [53] twierdzi, że niewielka ilość lizatu nie działa toksycznie na organizm biorcy. Broxmeyer [15] donosi o słabej ekspresji antygenów ABO na erytrocytach krwi pępowinowej, dużo słabszej niż na erytrocytach dorosłego. Gluckmann [33] opisuje przypadek podania biorcy z niskim mianem aglutynin, krwi pępowinowej niezgodnej z biorcą względem układu ABO.

Izolacja komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej. W celu oddzielenia erytrocytów, granulocytów i osocza od pozostałych komórek można zastosować rozdział metodą cytoforezy, wirowania w gradiencie lub sedymentacją. Niewielka objętość krwi pępowinowej wyklucza cytoferęzę.

Foa i wsp. [29], Wagner i wsp. [80], Broxmeyer i wsp. [15,16] oraz Thierry i wsp. [72,73] obserwowali znaczne straty komórek jądrzastych, dochodzące do 80% przy rozdziale krwi pępowinowej na gradiencie ficoll-methrizoat o gęstości 1,077 do 1,079 g/ml, czy po sedymentacji na Plasmogelu. Straty te dla krwi pępowinowej były znacznie wyższe niż dla analogicznie rozdzielanej krwi obwodowej [16]. Charbord i wsp. [20] uzyskali ponad dwukrotnie mniejsze straty (w przeliczeniu na liczbę kolonii) podczas rozdziału na gradiencie Percollu o gęstości 1,080. Autorzy twierdzą, że wirowanie na gradiencie ficollu z methrizoatem wybiórczo eliminuje niektóre frakcje komórek progenitorowych, np. BFU-E.

Lynch i wsp. [52] wykazują bardzo małe straty, sięgające 10% komórek jądrzastych, po sedymentacji krwi pępowinowej na skrobi hydroksyetylowanej (HES). Falkenberg [27] twierdzi, że przeprowadzenie rozdziału fizycznego krwi pępowinowej w czasie do 8 godz. od pobrania nie powoduje strat w liczbie komórek krwiotwórczych.

Ogólnie rzecz biorąc, ciągle nie ma zgodności odnośnie metod izolacji komórek jednojądrzastych (wśród których są komórki macierzyste) z krwi pępowinowej. Oznacza to konieczność kontynuowania badań, gdyż metody takie są niezbędne przy rozszerzeniu wykorzystania krwi pępowinowej np. do terapii genowej.

Krioprezerwacja. Dane odnośnie warunków krioprezerwacji opierają się na wynikach prac porównujących odzysk krwiotwórczych komórek ukierunkowanych zamrożonej krwi pępowinowej, krwi obwodowej i szpiku.

Większość autorów [32,35,53,58,69] wykorzystuje DMSO jako krioprotektor w stężeniu 10% obj., z różnymi modyfikacjami pozostałej części podłoża. Kinetyka obniżania temperatury różni się nieco w zależności od pochodzenia materiału czy autora pracy. Wydaje się, że można przedstawić następującą procedurę na podstawie danych wielu autorów [1,7,10,24,31,69].

Paremetry obniżania temperatury są następujące: 1,5 °C/min do -40°C; 5°C/min do -150°C; przeniesienie materiału do ciekłego azotu lub fazy gazowej ciekłego azotu. Temperatura krystalizacji lodu w granicach -5 do -7°C. Niskanen i wsp. [56] oraz McGann i wsp. [31] sugerują nieco wyższe początkowe tempo schładzania (3-

7°C/min) w odniesieniu do komórek ukierunkowanych szpiku i krwi obwodowej. Cytowani wyżej autorzy stosują do zamrażania urządzenie z elektronicznie programowanym spadkiem temperatury (CRF). Posiadanie CRF nie jest jednak warunkiem koniecznym do zamrażania tego typu materiału. Berthier i wsp. [6,8] stosują metodę dwustopniową; początkowe gwałtowne schładzanie do określonej temperatury (-37°C), przetrzymanie i dalsze schładzanie do temperatury fazy gazowej ciekłego azotu. Przy zastosowaniu zamrażarki na -80°C i pudełka ze styropianu można uzyskać pożądany spadek temperatury (1-3°C/min) bez CRF [22,61,62,70]. Większość autorów przechowuje zamrożony materiał w temperaturze ciekłego azotu (-196°C) lub fazy gazowej ciekłego azotu (ok. -140°C). Ratajczak i wsp. [61] uzyskali dużo lepsze wyniki przechowywania szpiku w temperaturze -80°C.

Czas przechowania nie ma w zasadzie wpływu na przeżycie komórek. Aird i wsp. [3] sygnalizują o 11-letnim okresie przechowywania ludzkich komórek ukierunkowanych bez utraty żywotności. Stiff i wsp. [70] oraz Ahmed i wsp. [2] zastosowali 5% DMSO i 6% HES uzyskując lepsze wyniki przeżywania nierozdzielanych komórek szpiku niż w samym DMSO. Brockbank i wsp. [13] uzyskali lepszą przeżywalność komórek ludzkiej linii promieloblastycznej KG-1a, kiedy w podłożu zamrażającym oprócz DMSO obecna była niskocząsteczkowa Poliwinylpirolidyna (PVP). Materiał może być przechowywany w próbkach [55] lub w workach [16,32,58,66], dlatego że tworzywo, z którego są wykonywane worki, nie wpływa na tworzenie kolonii przez komórki ukierunkowane [37], a w praktyce klinicznej są one dużo wygodniejsze.

Zamrażając w workach, w objętości 50-150 ml należy się jednak liczyć z pewnymi rozbieżnościami między zadaniem a rzeczywistym spadkiem temperatury przy zamrażaniu i rozmrażaniu [24], które jednak nie mają wpływu na przeżywalność. Proces rozmrażania przeprowadzany jest jak najszybciej, w łaźni wodnej o temp. 37-40°C.

Odzysk komórek jądrzastych po krioprezerwacji waha się w granicach od prawie 100% [22,58] do 75% [25]. Większość autorów odzyskuje około 80% komórek. Odzysk komórek ukierunkowanych w przeliczeniu na liczbę kolonii waha się znacznie, od 90% [4] do 64% [22] dla CFU-GM i BFU-E. Berthier i wsp. [8] donoszą o 70% odzysku CFU-Mk, podczas gdy Fabian i wsp. [26] oraz Ratajczak i wsp. [61] odzysk tych komórek ukierunkowanych oceniają na bardzo słaby. Sensebe i wsp. [65] twierdzą, że komórki podścieliskowe znoszą krioprezerwację gorzej niż komórki krwiotwórcze. Wydaje się, że rozbieżności pomiędzy danymi wielu autorów wynikają z różnych powodów w tym, z różnic w warunkach hodowli oraz ze stosowania różnych czynników stymulujących [27].

Obróbka po krioprezerwacji – usunięcie krioprotektorów. Gdy stężenie komórek przekroczy 10^7 /ml, rozmrożona krew czy szpik, a szczególnie wyizolowane leukocyty narażone są na spontaniczne kłaczkowanie (*cell clumping*). Staje się to regułą, gdy podłoże z krioprotektorem jest usuwane metodą wirowania [7,15,36,-66,70]. Zapobiec temu procesowi można przez natychmiastowe rozcieńczenie odmro-

żonej próbki podłożem hodowlanym w temperaturze 4°C. Schiewe i wsp. [66], Bock i wsp. [10] oraz Fliedner i wsp. [28] za główną przyczynę kłaczkowania uważają produkty rozpadu granulocytów obojętnochłonnych. Granulocyty są bardziej od innych komórek wrażliwe na uszkodzenia mrozeniowe. Schiewe dodatkową rolę przypisuje zniszczonym płytkom krwi. Bock oraz Clark i wsp. [22] stwierdzają w kłaczkach obecność ok. 100% martwych granulocytów i żywych limfocytów. Kłaczkowanie może spowodować utratę 90–95% wszystkich komórek po krioprezerwacji.

Istnieje możliwość zapobieżenia kłaczkowaniu przez usunięcie granulocytów adsorbcją na płytce, pochłanianiem cząsteczek węgliku żelaza [67] czy wirowaniem na gradiencie wielocukrów [7], lecz metody te powodują zbyt duże straty również wśród innych komórek. Stiff i wsp. [70] używając mieszaniny krioprotektorów, tj. 5% DMSO, 6% HES i 2% ludzkiej albuminy surowiczej (HSA), nie zauważyli kłaczkowania po rozmrożeniu. Jak twierdzą, może to być spowodowane lepszym przeżywaniem krioprezerwacji przez granulocyty dodatkowo chronione skrobią hydroksyetylowaną i albuminą. Bock [10] zapobiega kłaczkowaniu chelatowaniem jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} 0,1% roztworem EDTA. Wielu autorów [7,28,50,58] używa w tym celu DNA-zy I w ilości 10–15 tys. IU na 1 ml zamrożonego materiału. Rowley i wsp. [64] zapobiegają kłaczkowaniu zawiesiny szpiku przez dodanie 10% ACD przed mrożeniem i dodatkowych 10% natychmiast po rozmrożeniu.

Jednakże Goldmann [36] twierdzi, że nie ma pewnej metody zapobieżenia kłaczkowaniu. Zniszczone w procesie krioprezerwacji granulocyty uwalniają zawarte w ich ziarnistościach enzymy proteolityczne, które w następstwie uszkodzają własną komórkę oraz otaczające [82]. W celu poprawienia przeżywalności komórek ukierunkowanych i macierzystych szpiku po krioprezerwacji Lin i wsp. [50] dodali do zawiesiny komórek przed mrożeniem leupeptyny – niskocząsteczkowego inhibitora proteinaz, w stężeniu 0,1–1 μM , i uzyskali 1,5-krotny wzrost liczby kolonii.

Łącznie dane te wskazują, że metoda zamrażania krwi pępowinowej ma jeszcze szereg niedoskonałości, często wiąże się z dużymi stratami i wymaga dalszej optymalizacji.

6. ASPEKTY ETYCZNO-MORALNE ORAZ PRAWNE ZWIĄZANE Z TRANSPLANTACJĄ KRWI PĘPOWINOWEJ

W zasadzie nie ma żadnych przeciwwskazań (poza szczególnymi sytuacjami wśród niektórych mniejszości religijnych) odnośnie podawania chorym krwi pępowinowej w zastępstwie szpiku. Moralne zastrzeżenia może raczej budzić przyzwolenie na tracenie tak cennego materiału terapeutycznego. Ściśle jednak związana z

aspektami moralno-etycznymi jest sprawa pobierania krwi pępowinowej w czasie porodu. Newton [55] przestrzega przed stawianiem wielkości porcji pobranej krwi ponad dobrem rodzącego się dziecka.

7. PODSUMOWANIE

Krew pępowinowa wydaje się być doskonałym materiałem zastępującym szpik kostny w odtwarzaniu krwiotworzenia. Jest materiałem bogatszym od szpiku w prymitywne komórki krwiotwórcze i bardzo łatwo dostępnym. Niedogodnością jest ograniczona i niezbyt duża liczba komórek w tym materiale. Do jej pełniejszego użycia niezbędny jest dalszy rozwój technik rozdziału i krioprezerwacji. Istnieją racjonalne przesłanki do tworzenia banków krwi pępowinowej [23,35], które zresztą są już tworzone. Może ona być zarazem znakomitym uzupełnieniem już istniejących rejestrów dawców szpiku kostnego [55].

8. PIŚMIENNICTWO

- [1] ABRAMS RA, POLACEK L, BUCK P. Postcryopreservation growth of human CFU-GM: sequential examination of methodologic factors. *Exp Hematology* 1985; **13**: 1089–1093.
- [2] AHMED T, WUEST D, CIAVARELLA D, AYELLO J, FELDMAN EJ, BIGUZZI S, GULATI S, HUSSAIN F, MITTELMAN A, ASCENSAO JL, ARLIN ZA. Marrow storage techniques: a clinical comparison of refrigeration versus cryopreservation. *Acta Hematologica* 1991; **85**: 173–178.
- [3] AIRD W, LABOPIN M, GORIN NC, ANTIN JH. Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 1992; **9**: 487–490.
- [4] AUERBACH AD, LIU Q, GHOSH R, POLLACK MS, DOUGLAS GW, BROXMEYER HE. Prenatal identification of potential donors for umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia. *Transfusion* 1990; **30**: 682–687.
- [5] BEARDSLEY T. What's bred in bone. *Scientific American* 1994; **3**: 106–107.
- [6] BERTHIER R, KAUFMANN A, SCHWEITZER A, THEVENON D, HOLLARD D. Cryopreservation of human bone marrow cells by a modification of the two-step cooling technique. *Cryobiology* 1983; **20**: 637–643.
- [7] BERTHIER R, DOUADY F, KAUFMANN A, ARIVIEUX A, MICHALLET M, SOTTO JJ, NEWTON IA, LAJMANOVICH A, SCHWEITZER A. Purification and cryopreservation of granulomonocytic colony forming cells (GM-CFC) from the blood of patients with chronic granulocytic leukemia (GLC) for autologous transplantation. *Exp Hematology* 1982, **10**, 578–586.
- [8] BERTHIER R, VALIRON O, TROESCH A, CLEMANCEY-MARCILLE G, SCHWEITZER A, HOLLARD D. Cryopreservation of human megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK): influence of culture conditions. *Cryobiology* 1989; **26**: 265–272.
- [9] BIESECKER LG, EMERSON SG. Interleukin-6 is a component of human umbilical cord serum and stimulates hematopoiesis in embryonic stem cells *in vitro*. *Exp Hematology* 1993; **21**: 774–778.

- [10] BOCK GN, CHESS L, MARDINEY MR. The prevention of clumping of frozen-stored leukocyte populations by EDTA. *Cryobiology* 1972; **9**: 216–218.
- [11] BOGDANIC V, NEMET D, KASTELAN A, LATIN V, PETROVICI M, BRAKLJACIC-SURLAKOVIC L, KERHIN-BRAKLJACIC V, AURER I, KONJA J, MERSIC M, KALENIC S, LABAR B. Umbilical cord blood transplantation in a patient with Philadelphia chromosome – positive chronic myeloid leukemia. *Transplantation* 1993; **56**: 477–479.
- [12] BROBYN RD. The human toxicology of dimethylsulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 1975; **243**: 497–506.
- [13] BROCKBANK KG, SMITH KM. Synergistic interaction of low- molecular-weight Polyvinylpyrrolidones with DMSO during cell cryopreservation. *Transplantation Proc* 1993; **25**: 3185–3187.
- [14] BROSSARD Y, VAN NIFTERIK J, DeLACHAUX V, HUCHET J, CHAVINIE J, FRANCOUAL C, LEMANCEAU G, BENBUMAN M, GEROTA I, TRAINEAU R, ADAM M, GLUCKMAN E, RICHARD P, THIERRY D. Collection of placental blood with a view to hemopoietic reconstitution. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 427–429.
- [15] BROXMEYER HE, KURTZBERG J, GLUCKMAN E, AUERBACH AD, DOUGLAS G, COOPER S, FALKENBURG JH, BARD J, BOYSE EA. Umbilical cord blood hematopoietic stem and repopulating cells in human clinical transplantation. *Blood Cells* 1991; **17**: 313–329.
- [16] BROXMEYER HE, DOUGLAS GW, HANGOC G, COOPER S, BARD J, ENGLISH D, ARNY M, THOMAS L, BOYSE EA. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 3828–3832.
- [17] BROXMEYER HE, HANGOC G, COOPER S, RIBEIRO RC, GRAVES V, YODER M, WAGNER J, VADHAN-RAJ S, BENNINGER L, RUBINSTEIN P, BROUN RE. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4109–4113.
- [18] CARDOSO AA, MA-LIN L, BATARD P, HATZFELD A, BROWN EL, LEVESQUE J-P, SOOKEDO H, PANTERNE B, SANSILVESTRI P, CLARK SC, HATZFELD J. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8707–8711.
- [19] CESARZ R, STASZEWSKI A, WREMBEL-WARGOCKA J, SOBICZEWSKA E, STRUMIŁOWSKA-BRAUN B. Własna metoda pozyskiwania komórek krwi pępowinowej dla celów transplantacji (doniesienie wstępne). w druku 1993.
- [20] CHARBORD P, NEWTON I, SCHAAL JP, HERVE P. The separation of human cord blood by density gradient do not induce a major loss of progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation* 1992, **9**, 109–110.
- [21] CICUTTINI FM, MARTIN M, PETRIE HT, BOYD AW. A novel population of natural killer progenitor cells isolated from human umbilical cord blood. *Immunology* 1993; **151**: 29–37.
- [22] CLARK J, PATI A, McCARTHY D. Successful cryopreservation of human bone marrow does not require a controlled-rate freezer. *Bone Marrow Transplantation* 1991; **7**: 121–125.
- [23] CORLISS J. Umbilical cord blood may be a lifeline for some patients. *J Natl Canc Inst* 1993; **85**: 1107–1108.
- [24] DOUAY L, LOPEZ M, GORIN N-C. A technical bias: Differences in cooling rates prevent ampoules from being a reliable index of stem cell cryopreservation in large volumes. *Cryobiology* 1986; **23**: 296–301.
- [25] ELLIS WM, AITKEN W, DOBROSTANSKI B. The effect of cryopreservation on committed cells (CFU-c's) in humans. *Cryobiology* 1981; **18**: 238–243.
- [26] FABIAN I, DOUER D, WELLS JR, CLINE MJ. Cryopreservation of the human multipotent stem cells. *Exp Hematology* 1982; **10**: 119–122.

- [27] FALKENBURG JH, VAN LUXEMBURG-HEIJS SA, ZIJLMANS JM, FIBBE WE, KLUIN-NELEMANS JC, KANHAI HH, WILLEMZE R. Separation, enrichment and characterisation of human hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood. *Ann Hematol* 1993; **67**: 231–236.
- [28] FLIEDNER TM, KORBLING M, CALVO W, BRUCH C, HERBST E. Cryopreservation of blood mononuclear leukocytes and stem cells suspended in large fluid volume. *Blut* 1977; **35**: 195–202.
- [29] FOA R, CATOVSKY D, LAURIA F. T-Lymphocyte colonies in human cord blood. *Exp Hematology* 1980; **8**: 1139–1145.
- [30] FORESTIER F, DAFFOS F, CATHERINE N, RENARD M, ANDREUX J-P. Developmental hematopoiesis in normal human fetal blood. *Blood* 1991; **11**: 2360–2363.
- [31] McGANN LE, TURNER AR, ALLALUNIS MJ, TURC J-M. Cryopreservation of human peripheral blood stem cells: optimal cooling and warming conditions. *Cryobiology* 1981; **18**: 469–472.
- [32] GLUCKMAN E, BROXMEYER HE, AUERBACH AD, FRIEDMAN HS, DOUGLAS GW, DEVERGIE A, ESPEROU H, THIERRY D, SOCIE G, LEHN P, COOPER S, ENGLISH D, KURTZBERG J, BARD J, BOYSE E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New England J Medicine* 1989, **321**, 1174–1178.
- [33] GLUCKMAN E, DEVERGIE A, BOURDEAU-ESPEROU H, THIERRY D, TRAINEAU R, AUERBACH A, BROXMEYER HE. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 423–425.
- [34] GLUCKMAN E. Fetal and neonatal hemopoietic stem cells: considerations in transplantation. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 421.
- [35] GLUCKMAN E, DEVERGIE A, THIERRY D, ESPEROU-BOURDEAU H, TRAINEAU R, GERROTA J, BROSSARD Y, NIFTERIK J, BENBUNAN M. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplantation* 1992; **9**: 114–117.
- [36] GOLDMAN JM, TH'NG KH, PARK DS, SPIERES AS, LOWENTHAL RM, RUUTU T. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukemia in blast-cell transformation. *Br J Hematol* 1978; **40**: 185–195.
- [37] HERMANOVA E, LAZNICKA M. Effect of plastic cryobags on cell growth in tissue culture. *Cryo-Letters* 1983; **4**: 163–170.
- [38] HOWS JM, BRADLEY BA, MARSH JC, LUFT T, COUTINHO L, TESTA NG, DEXTER M. Growth of human umbilical-cord blood in longterm hemopoietic cultures. *Lancet* 1992; **340**: 73–76.
- [39] HOWS JM, MARSH JC, BRADLEY BA, LUFT T, COUTINHO L, TESTA NG, DEXTER M. Human cord blood: a source of transplantable stem cells? *Bone Marrow Transplantation* 1992; **9**: 105–108.
- [40] JĘDRZEJCZAK WW. Proposal for basic definitions in experimental hematology. *Folia Haematol Leipzig* 1983; **3**: 350–359.
- [41] JĘDRZEJCZAK WW, POJDA Z. Technique of preparation of hemopoietic cells of human fetal liver for transplantation. *Arch Immunol Ther Exper* 1987, **35**, 71–78.
- [42] JĘDRZEJCZAK WW. Komórki macierzyste krwiotworzenia. [w] Ultrastruktura i funkcja komórki, (red.) J. Kawiak, Z. Osuchowska A. Przełęcka. Polskie Wydawnictwo Naukowe 1989.
- [43] KINNBURGH D, RUSSELL NH. Comparative study of CD34+ cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplantation* 1993; **12**: 489–494.
- [44] KIRSHNER JJ, GOLDBERG J. Types of colonies formed by normal human bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood CFUc. *Exp Hematology* 1980; **8**: 1202–1207.

- [45] KOHLI-KUMAR M, SHAHIDI NT, BROXMEYER HE, MASTERSON M, DELAAT C, SAMBRANO, J MORRIS C, AUERBACH AD, HARRIS R. Haemopoietic stem/progenitor cell transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood. *Br J Hematol* 1993; **85**: 419–422.
- [46] DiLANDRO G, DRESCH C, POIRIER O. Granulomonocyte colony-forming cells in cord blood. *Nouv Rev Fr Hematol* 1980; **22**: 371–382.
- [47] LASKY BC, ASH RC, KERSEY JH, ZANJAJI ED, McCULLOUGH J. Collection of pluripotent hematopoietic stem cells by cytopheresis. *Blood* 1982; **4**: 822–827.
- [48] LEARY AG, OGAWA M. Blast cell colony assay for umbilical cord blood and adult bone marrow progenitors. *Blood* 1987; **69**: 953–956.
- [49] LIL, XIAO M, GRISBY S, WANG WX, WUB, SHEN R-N, BROXMEYER HE. Comparative effects of suppressive cytokines on isolated single CD34+++ stem/progenitor cells from human bone marrow and umbilical cord blood plated with and without serum. *Exp Hematology* 1993; **21**: 1442–1446.
- [50] LIN ML, PANTERNE B, LEVESQUE J-P, HATZFELD A, HATZFELD J. Cryopreservative effect of Leupeptin on early human bone marrow progenitors. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; **28A**: 459–460.
- [51] LIU PI, POON KC, LIU SS, CROOK L. Cryopreservation of human cadaveric bone marrow cells. *Cryobiology* 1980; **17**: 419–423.
- [52] LYNCH DC, KNOTT LJ, RODECK CH, HUHENS ER. Studies of circulating hemopoietic progenitor cells in human fetal blood. *Blood* 1982; **59**: 976–979.
- [53] MA DD, JOHNSON LA, CHAN PM, BIGGS JC. Factors influencing myeloid stem cell (CFU-C) survival after cryopreservation of human marrow and chronic granulocytic leukemia cells. *Cryobiology* 1982; **19**: 1–9.
- [54] NAKAHATA T, OGAWA M. Hemopoietic colony forming cells in umbilical cord blood with extensive capability to generate mono- and multipotent hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 1982; **70**: 1324–1328.
- [55] NEWTON I, CHARBORD P, SCHAAL JP, HERVE P. Toward cord blood banking: density separation and cryopreservation of cord blood progenitors. *Exp Hematology* 1993; **21**: 671–674.
- [56] NISKANEN E, PIRSCH G. Effect of cooling rate on human and murine hemopoietic precursor cell recovery. *Cryobiology* 1983; **20**: 401–406.
- [57] OLSON AO, LEVINE RF, MAZUR EM, WRIGHT DG, SALVADO AJ. Megakaryocytes and megakaryocyte progenitors in human cord blood. *Am J Pediat Hematology* 1992; **14**: 241–247.
- [58] VAN de OUVELAND F, de WITTE T, GEERDING P, HAANEN C. Enrichment and cryopreservation of bone marrow progenitor cells for autologous reinfusion. *Cryobiology* 1982; **19**: 292–298.
- [59] PAPAIOGIANNAKIS N, JOHNSEN SA. Distinct mitogens reveal different mechanisms of suppressor activity in human cord blood. *J Clin Lab Immunol* 1988; **26**: 37–41.
- [60] PRINDULL G, BEN-ISHAY Z, EBELL W, BERGHOLZ M, DIRK T, PRINDULL B. CFU-F circulating in cord blood. *Blut* 1987; **54**: 351–359.
- [61] RATAJCZAK MZ, KUCZYŃSKI WI, RATAJCZAK J. The influence of different cryopreservation procedures on the proliferative potential of human bone marrow progenitor cells. Transplantological implications. (w druku)
- [62] ROSENFELD CS, GREMBA C, SHADDUCK RK, ZEIGLER ZR, NEMUNAJTIS J. Engraftment with peripheral blood stem cells using noncontrolled-rate cryopreservation: comparison with autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematology* 1994; **22**: 290–294.
- [63] ROWLEY SD, ANDERSON GL. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplantation* 1993; **11**: 389–393.

- [64] ROWLEY SD, BENSINGER WI, GOOLEY TA, BUCKER CD. Effect of cell concentration on bone marrow and peripheral blood stem cell cryopreservation. *Blood* 1984; **83**: 2731–2736.
- [65] SENSEBE L, CHARBORD P, BERTHOU C, ABGRALL JF, AUTRAND C, BRIERE J. Effect of cryopreservation on the adherent layer of human long-term bone marrow cultures: study of cell phenotypes. *Leukemia* 1992; **6**: 459–462.
- [66] SHEIWE MW, PUSZTAI-MARKOS Zs, ESSERS U, SEELIS R, RAU G, KORBER C, STURNER KH, JUNG H, LIEDTKE B. Cryopreservation of human lymphocytes and stem cells (CFU-c) in large units for cancer therapy – A report based on data of more than 400 frozen units. *Cryobiology* 1981; **18**: 344–356.
- [67] SHLUNK T, RUBER E, SCHLEYER M. Survival of human bone marrow progenitor cells after freezing: improved detection in the colony-forming assay. *Cryobiology* 1981; **18**: 111–118.
- [68] SHLAFER M. Drugs that modify cellular responses to low temperature (Cryoprotectants): a pharmacological perspective of preserving biological systems by freezing. *Federation Proc* 1977; **36**: 2590–2594.
- [69] SKURZAK H, RYBARSKA M, SAWADRO-ROCHOWSKA M, ILNICKI K. Zastosowanie izolowanych limfocytów przechowywanych w głębokim zamrożeniu do badań nad immunologią nowotworów człowieka. *Probl Techn Med* 1977; **8**: 351–357.
- [70] STIFF PJ, MURGO AJ, ZAROULIS CG, DeRISIMF, CLARKSON BD. Unfractionated human marrow cell cryopreservation using DMSO and HES. *Cryobiology* 1983; **20**: 17–24.
- [71] TAVASSOLI M. Embryonic and fetal hemopoiesis. *Blood Cells* 1991; **1**: 269–281.
- [72] THIERRY D, HERVATIN F, TRAINEAU R, BROSSARD Y, STARK R, BENBUNAN N, GLUCKMAN E. Hematopoietic progenitor cells in cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 1992; **9**: 101–105.
- [73] THIERRY D, TRAINEAU R, ADAM M, DELACHAUX V, BROSSARD Y, RICHARD P, GEROTTA R, DEVERGIE A, BENBUNAN M, GLUCKMAN E. Hematopoietic stem cell potential from umbilical cord blood. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 439–440.
- [74] THIERRY D, TRAINEAU R, ADAM M, vanNIFTERICK V, BROSSARD Y, GEROTTA A, RICHARD P, DEVERGIE A, BENBUNAN M, GLUCKMAN E. Study on the hematopoietic stem cells from the umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplantation* 1992; **9**: 123.
- [75] TOURAINE J-L, GRISCELLI C, BETUEL H, DURANDY A, BETAND B, SONILLET G. Chimerism following fetal liver transplantation: cell cooperation despite HLA mismatch. *Birth Defects* 1983; **19**: 143–148.
- [76] TOURAINE J-L. In utero transplantation of stem cells in humans. *Nouv Rev Fr Hematol* 1990; **32**: 441–444.
- [77] TOURAINE J-L. In utero transplantation of fetal liver stem cells in humans. *Blood Cells* 1991; **17**: 379–387.
- [78] TURNER CW, LUZINS J, HUTCHESON C. A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Transplantation* 1992; **10**: 89–91.
- [79] VILMER E, STERKERS G, RAHIMY C, ELJON J, BROYART A, LESCOEUR B, GEROTA J, LOCHE M, TIERCY JM, BLOT P. HLA - mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia. *Transplantation* 1992; **53**: 1155–1157.
- [80] WAGNER JE, BROXMEYER HE, BYRD RL, ZEHNBAUER B, SCHMECKPEPER B, SHAH N, GRIFFIN C, EMANUEL PD, ZUCKERMAN KS, COOPER S, CAROW C, BIAS W, SANTOS GW. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood* 1992; **79**: 1874–1881.
- [81] WILLIAMS SF, BITRAN JD, RICHARDS JM, DeCHRISTOPHER PJ, BARKER E, CO-NANT J, GOLOMB HM, ORLINA AR. Peripheral blood derived stem cell collections for use in autologous transplantation after high dose chemotherapy: an alternative approach. *Bone Marrow Transplantation* 1990; **5**: 129–133.

- [82] YANG H, ARNAUD F, McGANN LE. Cryoinjury in human granulocytes and cytoplasts. *Cryobiology* 1992; **29**: 500–510.
- [83] YELLOWLEES P, GREENFIELD C, McINTYRE N. DMSO-induced toxicity. *Lancet* 1980: 1004–1006.
- [84] ZANDER AR, LYDING J, BIELACK S. Transplantation with blood stem cells. *Blood Cells* 1991; **17**: 301–309.

Otrzymano: 30.09.1994 r.

Przyjęto: 04.10.1994 r.

Adresy autorów: Bank Tkanek Zakładu Genetyki Centrum Zdrowia Dziecka

Warszawa, Al. Dzieci Polskich;

Zakład Immunologii Centralnego Szpitala Klinicznego WAM

Warszawa, ul. Szaserw 128

BIAŁKA G – NAGRODA NOBLA 1994

G PROTEINS – THE NOBEL PRIZE FOR 1994

Jolanta BARAŃSKA

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie

Streszczenie: Rodzina heterotrimerycznych regulatorowych białek wiążących nukleotydy guanylowe, zwanych powszechnie białkami G, odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów przez plazmalemę komórek eukariotycznych. W artykule opisano odkrycie białek G uhonorowane nagrodą Nobla w roku 1994 oraz współczesne poglądy dotyczące udziału podjednostek białek G w sprzężeniu między receptorem a białkiem efektorowym.

Słowa kluczowe: białka G, GTP, GDP, przekazywanie informacji.

Summary: Family of heterotrimeric guanine nucleotide-binding regulatory proteins, commonly termed G proteins, plays an essential role in transducing signals across the plasma membrane in eukaryotic cells. The discovery of G protein, honoured by the Nobel prize for 1994, and current views of G protein subunits mediated receptor-effector coupling are described.

Key words: G proteins, GTP, GDP, signal transduction.

1. WSTĘP

Hormony, neurotransmitery, sygnały świetlne, substancje zapachowe czy bodźce czuciowe działają specyficznie na receptory i wywołują serię zdarzeń w komórce prowadzącą do określonych efektów biologicznych. Białka receptorowe znajdują się w plazmalemie komórek i ulegają zmianom konformacyjnym po związaniu z agonistą. Receptory nie działają jednak bezpośrednio na określone efekторы, jak np. kanały jonowe czy enzymy syntetyzujące wtórne przekaźniki informacji. Substancjami znajdującymi się pomiędzy nimi są tzw. białka G. Pełnią one rolę przekaźników, przeno-

sząc sygnał poprzez błonę komórkową od zmienionego konformacyjnie receptora do efektora i są regulowane przez nukleotydy guanylowe: GTP – "włączający" i GDP – "wyłączający" system informacji.

W poniższym artykule zawarto krótką charakterystykę białek G, dotyczącą ich struktury, właściwości i działania, i opisano, jak doszło do ich odkrycia. Czytelników zainteresowanych tematem autorka odsyła do licznych artykułów przeglądowych [5,7,10–13,25].

2. ODKRYCIE BIAŁEK G – NAGRODA NOBLA '94

Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny przyznano w 1994 r. dwóm Amerykanom – Martinowi Rodbellowi z Państwowego Instytutu Zdrowia w Research Triangle Park w Północnej Karolinie i Alfredowi Gilmanowi z Centrum Medycznego w Dallas w Teksasie – za odkrycie białek G i ich roli w przewodzeniu sygnałów. Odkrycie to stanowi jeden z milowych kroków w kierunku poznania i zrozumienia procesów przekazywania informacji w komórce i słusznie zostało uhonorowane najwyższym wyróżnieniem.

W 1971 r. Martin Rodbell pierwszy dowiódł, że stymulacja cyklicznej adenylanowej w izolowanych błonach komórek wątroby szczura wymaga nie tylko obecności hormonów, lecz także nukleotydów guanylowych, głównie GTP [26]. Odkrycie to zostało następnie potwierdzone przez innych badaczy, którzy wykazali, że nukleotydy guanylowe modulują powinowactwo β -adrenergicznych receptorów do działających na nie agonistów [9,14].

W opublikowanym w 1992 r. artykule przeglądowym omawiającym działanie białek G. Rodbell przedstawia swoje 20-letnie badania w tym zakresie [25]. Pisze, jak w latach siedemdziesiątych zafascynowany teorią cybernetyki zdecydował się wykorzystać ją w analizie procesów zachodzących w komórce, na którą działa sygnał. Receptory nazwał dyskryminatorami, a enzymy, których aktywność zmieniała się w wyniku działania na komórkę hormonu, – wzmacniaczami. Dodatkowo jednak, drogą dedukcji, postulował istnienie trzeciego niezależnego składnika, który nazwał przełącznikiem (z ang.: *transducer*), sprzęgającego informację pomiędzy receptorem a wzmacniaczem. A zatem, pomiędzy sygnałem pierwotnym dochodzącym do komórki z przestrzeni pozakomórkowych a sygnałem wtórnym, przetworzonym w komórce, przepływ informacji zachodziłby dzięki trzem niezależnym składnikom błony komórkowej. Proponowane przez Rodbella nazewnictwo przyjęło się, choć nikt obecnie nie nazywa receptora dyskryminatorem, a wzmacniacz nazywany jest efekтором. Dalsze badania prowadzone w latach osiemdziesiątych przez drugiego noblistę – Alfreda Gilmana dowiodły, że drugim składnikiem w tym systemie informacji, owym przełącznikiem jest białko regulatorowe wiążące i hydrolizujące GTP.

W końcu lat siedemdziesiątych Gilman wraz ze współpracownikami [27,28] badali aktywność cyklazy adenylanowej w ekstraktach plazmalemy komórek chłoniaika S49 traktowanych detergentami. Stwierdzili, że aktywność tego enzymu zanikała po podgrzaniu, a była przywracana, gdy nieaktywny, podgrzany preparat mieszało z natywnym, niepodgrzewanym preparatem uzyskanym ze zmutowanych komórek (tzw. cyc), nie mających aktywności tego enzymu [27]. Badacze wnioskowali [27,28], że albo enzym składa się z dwóch aktywności – katalitycznej i regulatorowej, albo że na aktywność enzymu składają się dwa białka: jedno termolabilne, które mają tylko komórki cyc, i drugie – termostabilne, występujące w podgrzanych ekstraktach błon chłoniaika i mające właściwości regulatorowe. Białko termostabilne zostało w roku 1980 oczyszczone do homogenności [23]. Wykazano także, że wiąże ono GTP i w takiej formie aktywuje cyklazę adenylanową. W roku 1985 Gilman i wsp. [16] dysponowali już nie tylko oczyszczonym do homogenności preparatem tego białka, ale także oczyszczoną cyklazą adenylanową i receptorem β -adrenergicznym. Używając zrekonstruowany układ pęcherzyków liposomalnych, zawierających zmieszane w określonych proporcjach fosfolipidy i trzy powyższe białka, badacze wykazali słuszność hipotetycznych rozważań Rodbella. Istotnie, gdy na układ działał sygnał, dla uzyskania aktywności cyklazy adenylanowej (określonej zwiększoną produkcją cyklicznego AMP) konieczna była obecność trzech białek: receptora, przekaźnika i wzmacniacza (efektora), zwiększającego natężenie sygnału. Aktywność efektora (cyklazy adenylanowej) była stymulowana obecnością GTP, a białko pełniące funkcje przekaźnika nazwane zostało białkiem G [23].

Dalsze badania Rodbella [24] i Gilmana [6,8,18], a także innych badaczy [21,30] poszły w kierunku poznania struktury, właściwości i funkcji białka G w systemie przekazywania informacji w komórce.

3. CHARAKTERYSTYKA BIAŁEK G

3.1. STRUKTURA BIAŁEK G

Białka G wchodzi w skład dużej nadrodziny białek wiążących GTP. Między innymi należą do niej czynniki translacyjne oraz tzw "małe" białka o masie cząsteczkowej 20–25 kDa [3,33]. Do tych ostatnich należą produkty protoonkogenów *ras*, genów *rac*, *rap* i *rho*, a również ARF (kofaktor dla toksyn cholery katalizujący ADP-rybozylację białka G_s). Białka G różnią się jednak zasadniczo od wszystkich pozostałych białek tej nadrodziny. Są one mianowicie heterotrimerami, składającymi się z trzech różnych podjednostek: α (masa cząsteczkowa = 39–46 kDa), β (37 kDa) i γ (8 kDa) [12,13]. Inne białka tej nadrodziny nie wiążą się z podjednostkami $\beta\gamma$ ani innymi homologicznymi i nie tworzą struktur oligomerycznych. Ponadto, w odróżnieniu od białek G nie mają aktywności GTPazy [10].

Na rysunku 1 przedstawiono budowę białka G. Podjednostki β i γ tworzą stały kompleks, podczas gdy podjednostka α ma zdolność oddysocjowania i wiązania się z powrotem z kompleksem $\beta\gamma$, tworząc znowu trimer. Podjednostka α ma pojedynczą domenę wiążącą nukleotydy guanylowe: GTP i GDP. Z przyłączonym GDP przylega ściśle do kompleksu $\beta\gamma$ i stanowi formę nieaktywną, podczas gdy forma aktywna zawiera GTP. Podjednostka α może ponadto hydrolizować związany z jej cząsteczką GTP, jest więc enzymem o właściwościach GTP-azy. Zatem, przejście formy nieaktywnej białka G w aktywną zachodzi z udziałem GTP, który wymienia GDP związany do podjednostki α . Natomiast forma aktywna staje się nieaktywną, gdy GTP ulega hydrolizie do GDP i P_i [5,12,13,25].

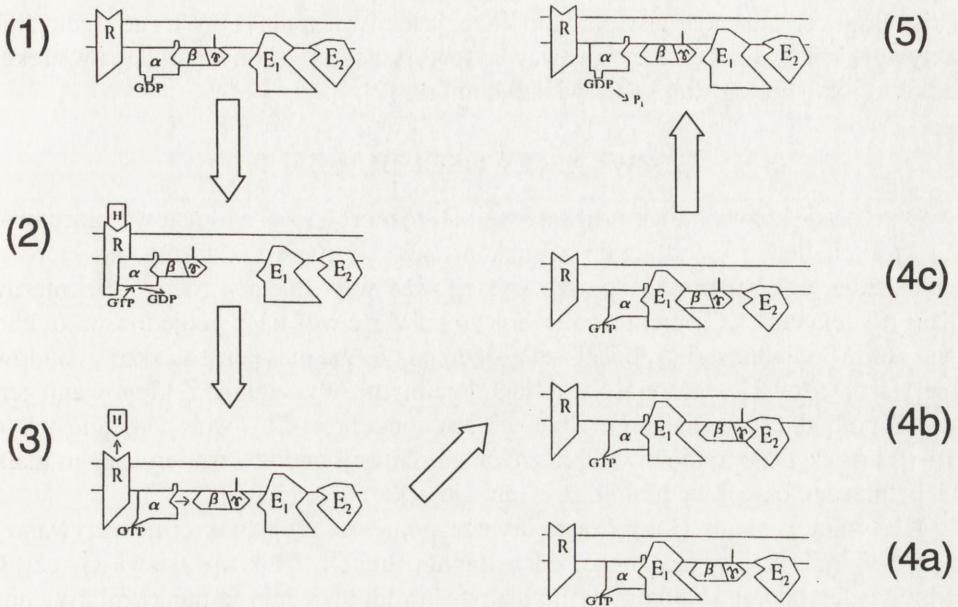
W pewnych typach białek G, ich podjednostki α zawierają specjalną domenę, która ulega modyfikacji przez toksyny bakteryjne [8,10,12,13,17]. Toksyna cholery katalizuje przeniesienie ADP-rybozy z NAD na specyficzną resztę argininy w niektórych białkach G. Powoduje to blokadę aktywności GTPazy i pozbawia podjednostkę α zdolności hydrolizy GTP, co prowadzi do długotrwałej nadaktywacji systemu [17]. Z kolei toksyny krztuśca powodują ADP-rybozylację specyficjnej reszty cysteiny tej podjednostki, uniemożliwiając oddziaływanie białka G z receptorem i hamując przez to jego działanie [8].

Białko G jest związane z plazmalemą komórek. Uważa się, że zakotwiczenie trimery w dwuwarstwie lipidowej błony może być ułatwione przez prenylację podjednostki γ i mirystylację podjednostki α [6,12]. Grupy: prenylowa bądź mirystylowa dołączone do polipeptydów utrzymują podjednostki w hydrofobowej warstwie błony komórkowej.

3.2. DZIAŁANIE BIAŁEK G

Na rysunku 1 przedstawiono udział białka G w procesie przekazywania informacji w komórce. Białko G ulega aktywacji, gdy na receptor działa określony sygnał. Wiąże się wtedy z receptorem [12,13] (choć niektórzy badacze sądzą, że trimer białka G jest połączony w postaci kompleksu z receptorem wolnym od agonisty [25]). Przejście trimery w postać aktywną jest związane z uwolnieniem GDP, a przyłączeniem GTP. Powoduje to dysocjację trimery na podjednostkę α ze związanym do niej GTP oraz na kompleks podjednostek $\beta\gamma$ [11–13,25]. Obecnie uważa się [12,25], że nie tylko α , lecz także kompleks $\beta\gamma$ mogą w pewnych typach białek G oddziaływać na białka efektorowe (patrz poniżej). Podjednostka α może działać na jeden efektor, a $\beta\gamma$ na inny, mogą jednak także działać synergicznie lub przeciwstawnie na ten sam efektor. Dzięki aktywności GTPazowej następuje szybka hydroliza GTP i reasocjacja podjednostek, co tworzy z powrotem trimeryczną postać białka G nieaktywnego.

Mechanizm przekazywania informacji przez białka G jest zatem podobny bez względu na rodzaj receptora i działającego na receptor agonistę, a różnice dotyczą jedynie zaangażowania lub nie kompleksu podjednostek $\beta\gamma$ i sposobu aktywacji efektora przez podjednostkę α i kompleks $\beta\gamma$. Należy jednak zaznaczyć, że białka G



Rys. 1. Budowa i działanie białka G: (1) Białko G występuje jako trimer składający się z podjednostek α , β i γ ; do podjednostki α przyłączony jest GDP, receptor (R) jest niezwiązany z agonistą, a efekторы (E_1) i (E_2) są nieaktywne; (2) po przyłączeniu hormonu (H) następuje zmiana konformacyjna receptora, do którego przyłącza się trimer białka G; GDP zostaje odłączony, a do podjednostki α przyłącza się GTP, powoduje to dalsze zmiany konformacyjne kompleksu, a mianowicie: (3) zmniejszenie powinowactwa między receptorem a hormonem i odłączenie hormonu oraz zmniejszenie powinowactwa między podjednostkami α a kompleksem $\beta\gamma$, co prowadzi do ich dysocjacji; (4) podjednostka α przyłącza się do białka efektorowego (E_1) regulując jego funkcje, podczas gdy podjednostki $\beta\gamma$ są bądź nie aktywne (4a), bądź w innych systemach (4b) aktywują inny efektor (E_2) lub działają na ten sam efektor (4c), na który działa podjednostka α ; (5) podjednostka α ma właściwości GTPazy, hydroliza GTP prowadzi do powstania GDP, co powoduje przejście formy aktywnej w nieaktywną oraz powrotną reasocjację podjednostek białka G (1)

oddziałują jedynie z receptorami mającymi siedem domen transmembranowych, należących do jednej rodziny strukturalnej [5]. Natomiast receptory, na które działają np. czynniki wzrostu, mające w swojej strukturze kinazę tyrozynową, nie współdziałają z białkami G [4]. Nie przeszkadza to jednak, że białka G otrzymują i przekazują sygnały od więcej niż 200 typów i podtypów receptorów, na które działa co najmniej kilkadziesiąt różnych rodzajów agonistów [5].

Sygnał od białka G przechodzi na określony efektor. Białka G działają stymulująco lub hamująco na cyklazę adenylnową [32], stymulująco na fosfodiesterazę cGMP [31], fosfolipazę C typu β , fosfolipazę A_2 i D [7], a także regulują funkcje licznych kanałów jonowych w błonie komórkowej [12]. W wyniku działania efektorów w komórce pojawiają się wtórne przekaźniki informacji, jak np. cAMP, trisfosfoinozytol

i diacyloglicerol, a także następuje mobilizacja jonów wapnia [1]. Wtórne przekaźniki aktywują kinazy białkowe, prowadząc do fosforylacji określonych białek i w efekcie do określonej biologicznej odpowiedzi komórki [2].

3.3 WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK G

Wydaje się oczywiste, że przy tak wielkiej różnorodności agonistów i receptorów od których białka G odbierają sygnał, a także licznych efektorów, na które go przekazują, one same także muszą występować w postaciach różnych izomerów. Klasyfikacja białek G opiera się zasadniczo na właściwościach podjednostki α , choć wszystkie podjednostki: α , β i γ różnią się między sobą masą cząsteczkową, budową pierwszorzędową i właściwościami funkcjonalnymi. Wydzielono i sklonowano geny wielu podjednostek białka G. Znanych jest co najmniej 21 form podjednostek α , 4 – β i 6 – γ . Daje to możliwość licznych kombinacji budowy trimerycznego białka G, pełniącego określone biologiczne funkcje w komórce [5,12].

Klasyfikacja białek G jest często myląca, ponieważ niejednokrotnie nazywano je w chwili odkrycia w zależności od pełnionej funkcji. I tak np. nazwa G_s czy G_i odpowiadała dawniej białkom stymulującym lub odpowiednio hamującym aktywność cykazy adenylnowej, podczas gdy nazwa G_o obejmowała wszystkie inne białka G [10,25].

Bliższe poznanie strukturalnych i funkcjonalnych właściwości podjednostek α białka G, a szczególnie sekwencji aminokwasów, pozwoliło na ich podział na 4 podstawowe typy. Tabela 1 przedstawia zaliczone do nich, podane przykładowo podjednostki α . W tabeli znajdują się informacje dotyczące masy cząsteczkowej, wrażliwości na działanie toksyn bakteryjnych oraz typowe efekторы, na które działają poszczególne podjednostki α . Powyższy podział oparty jest na klasyfikacji podanej przez Heplera i Gilmana [12], obejmującej wszystkie znane podjednostki α i znacznie bardziej szczegółowy opis ich właściwości.

Do pierwszego typu G_s należą podjednostki α : α_s oraz α_{olf} . Są one aktywowane przez hormony β -adrenergiczne i glukagon (α_s) oraz substancje zapachowe (α_{olf}). Wszystkie aktywują cyklazę adenylnową, a więc zwiększają syntezę cAMP, a α_s działa ponadto stymulująco na kanał wapniowy w komórkach mięśni szkieletowych [15], a hamująco na kanał sodowy w komórkach mięśnia serca [29].

W następnym typie – G_i znajdują się podjednostki α_i występujące w 4 podtypach. Z nich tylko α_3 jest podjednostką hamującą cyklazę adenylnową [12]. Enzym ten jest także hamowany przez podjednostkę α_2 , występującą głównie w mózgu. Podjednostki α tego typu są zasadniczo pobudzane przez agonistów działających na receptory muskarynowe i α -adrenergiczne, za wyjątkiem α_1 stymulowanej przez światło. Ta ostatnia występuje w pręcikach siatkówki oka, jest związana z rodopsyną i aktywuje fosfodiesterazę cGMP [31]. Do typu G_i należą także podjednostki α_o . Występują one obficie w mózgu, gdzie stanowią więcej niż 1% wszystkich białek błon. Wydaje się, że właśnie to białko aktywuje fosfolipazę A_2 [7,12].

TABELA I. Właściwości podjednostek α białek G

Typy	Masa cząsteczko- wa (kDa)	Wrażliwość na toksyny bakteryjne	Efektor
G_s			
α_s	44,2	toksyna cholery	↑ cyklaza adenylanowa ↑ kanały Ca ²⁺ ↓ kanały Na ⁺
α_{olf}	44,7	toksyna cholery	↑ cyklaza adenylanowa
G_i			
α_1	40,3	toksyna krztuśca	↑ kanały K ⁺
α_2	40,5	jw.	↓ kanały Ca ²⁺
α_3	40,5	jw.	↓ cyklaza adenylanowa
α_{OA}	40,0	jw.	↑ fosfolipaza C (?)
α_{OB}	40,1	jw.	↑ fosfolipaza A ₂ (?)
α_{t1}	40,0	toksyna krztuśca i cholery	↑ fosfodiesteraza cGMP
α_{t2}	40,1	toksyna krztuśca i cholery	↑ fosfodiesteraza cGMP
α_z	40,9		↓ cyklaza adenylanowa
G_q			
α_q	42,0		↑ fosfolipaza C typu $\beta_1, \beta_2, \beta_3$
α_{11}	42,0		↑ fosfolipaza C typu β_1, β_2 i β_3
α_{14}	41,5		↑ fosfolipaza C typu β_1, β_2 i β_3
α_{16}	43,0		↑ fosfolipaza C typu β_1, β_2 i β_3
α_{15}	43,5		(?)
G₁₂			
α_{12}	44,0		(?)
α_{13}	44,0		(?)

Obydwa wymienione typy podjednostek α – G_s i G_i są czułe na toksynę cholery, a niektóre na toksynę krztuśca. Następny jednak typ podjednostek α – G_q, do którego należą $\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}$ i α_{16} , a także ostatni czwarty typ G₁₂, zawierają podjednostki α nieczułe na obie toksyny. Wymienione w Tabeli 1 podjednostki typu G_q są aktywowane przez agonistów działających na receptory muskarynowe i stymulują fosfolipazę C typu β , hydrolizującą fosfitydyloinozytolo-(4,5)bisfosforan, prowadząc do powstania wtórnych przekaźników informacji – trisfosfoinozytoli i diacyloglicerolu [1,2,4,12,31]. W ostatniej grupie G₁₂ znajdują się podjednostki α_{12} i α_{13} . Są one wszechobecne, ale dotychczas nie wiadomo, jaki agonista powoduje ich aktywację i na jaki efektor działają [12].

Kompleks podjednostek $\beta\gamma$ był przez długi czas uważany jedynie za część trimery ułatwiająca połączenie z błoną i receptorem. Obecnie jednak uważa się, że kompleks ten także oddziałuje na określone efekторы [12,25]. I tak np. cyklaza adenylanowa w

mózgu typ I, stymulowana przez podjednostkę α_s jest hamowana przez kompleks $\beta\gamma$, natomiast typ II i IV cykazy jest aktywowany przez ten kompleks (ale tylko w obecności α_s) [32]. Przykład ten demonstruje wzajemne współdziałanie podjednostki α białka G z kompleksem podjednostek $\beta\gamma$, działających synergicznie lub przeciwnie na ten sam efektor. Ponadto, kompleks stymuluje fosfolipazę C w granulocytach, fosfolipazę A_2 w mózgu i reguluje kanał potasowy w komórkach mięśnia sercowego [12].

Powyższe przykłady sygnalizują złożoność procesów przekazywania informacji w komórce. Z pewnością nie wyczerpują jednak ogromu wzajemnych współzależności pomiędzy poszczególnymi składnikami systemu, w którym to rodzina heterotrimerycznych białek wiążących i hydrolizujących GTP odgrywa tak ważną rolę.

4. UWAGI KOŃCOWE

Odkrycie białek G zapoczątkowało badania w różnych kierunkach wiedzy, w tym medycyny. Okazało się bowiem, że patogenezę cholery czy krztuśca można wytłumaczyć działaniem tych toksyn na funkcjonowanie białek G. Przypuszcza się, że zaburzenia w strukturze i funkcji białek G mogą powodować zmiany nowotworowe i leżeć u podstaw chorób endokrynnych.

Na koniec należy zwrócić uwagę na ostatnie prace Rodbella z lat dziewięćdziesiątych [19,20]. Są one zgodne z coraz częściej pojawiającymi się w literaturze danymi, że procesy zachodzące w żywej komórce przebiegają inaczej niż badane w sztucznych układach pęcherzyków liposomalnych czy ekstraktach błon. Rodbell uważa [25] i podobnego zdania są inni autorzy [22], że białka G mogą występować w kompleksach z białkami cytoszkieletu. Przypuszczają, że białka receptorowe, białka G i efekторы są w plazmalemie komórek znacznie bardziej statyczne, niż sądzono uprzednio. Autorzy sugerują [22,25], że wzajemne oddziaływanie tych substancji nie odbywa się na zasadzie przypadkowych kolizji łatwo poruszających się białek w płynnej mozaikowej strukturze błony, ale jest subtelnie modulowane przez białka cytoszkieletu, z którymi współdziałają.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BARAŃSKA J. Rozpad fosfolipidów a przekazywanie informacji w komórce [w] Monografie, Warszawa Pol. Tow. Biochem 1992: 1–36.
- [2] BARAŃSKA J, KACZMAREK L, SKANGIEL-KRAMSKA J. Kaskada procesów biochemicznych po pobudzeniu neuronu. [w] Mechanizmy plastyczności mózgu. Kossut M, [red] Warszawa: PWN 1994: 148–158.
- [3] BARBACID M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 779–828.

- [4] BERRIDGE MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993; **361**: 315–325.
- [5] BIRNBAUMER L, ABRAMOWITZ J, BROWN AM. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1031**: 163–224.
- [6] BUSS JE, MUMBY SM, CASEY PJ, GILMAN AG, SEFTON BM. Myristoylated α subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 7493–7497.
- [7] COCKCROFT S. G-protein-regulated phospholipases C, D and A_2 - mediated signalling in neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1113**: 135–160.
- [8] CASEY PJ, GRAZIANO MP, GILMAN AG. G protein $\beta\gamma$ subunits from bovine brain and retina equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of α subunits by pertussis toxin but differential interactions with $G_{s\alpha}$. *Biochemistry* 1989; **28**: 611–616.
- [9] CASSEL D, SELINGER Z. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1976; **452**: 538–551.
- [10] FREISSMUTH M, CASEY PJ, GILMAN AG. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J* 1989; **3**: 2125–2131.
- [11] GILMAN AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 1987; **56**: 615–649.
- [12] HEPLER JR, GILMAN AG. G proteins. *TIBS* 1992; **17**: 383–387.
- [13] KWIATKOWSKA J. Białka G jako "uniwersalny łącznik" w transmisji sygnałów z receptorów błonowych na ich efekторы. *Post Biochem* 1988; **34**: 123–130.
- [14] MAGUIRE ME, VAN ARSDALE PM, GILMAN AG. An agonist-specific effect of guanine nucleotides on binding to the β -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 1976; **12**: 335–339.
- [15] MATTERA R, GRAZIANO MP, YATANI A, GRAF R, CODINA J, GILMAN AG, BIRNBAUMER L, BROWN AM. Bacterial synthesizes splice variants of the α subunit of the G protein G_s activate both adenylyl cyclase and dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Science* 1989; **243**: 804–807.
- [16] MAY DC, ROSS EM, GILMAN AG, SMIGEL MD. Reconstitution of catecholamine-stimulated adenylyl cyclase activity using three purified proteins. *J Biol Chem* 1985; **260**: 15829–15833.
- [17] MOSS J, VAUGHAN M. Activation of cholera toxin by ADP- ribosylation factors 20-kDa guanine nucleotide binding proteins. *Curr Top Regul* 1992; **32**: 49–73.
- [18] MUMBY SM, PANG I, GILMAN AG, STENWEISS PC. Chromatographic resolution and immunologic identification of the α_{40} and α_{41} subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins from bovine brain. *J Biol Chem* 1988; **263**: 2020–2026.
- [19] NAKAMURA SI, RODBELL M. Octyl glucoside extracts GTP-binding regulatory proteins from rat brain 'synaptoneurosomes' as large, polydisperse structures devoid of $\beta\gamma$ complex and sensitive to disaggregation by guanine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 6413–6417.
- [20] NAKAMURA SJ, RODBELL M. Glucagon induces disaggregation of polymer-like structure of the α subunit of the stimulatory G protein in liver membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 7150–7154.
- [21] NEER EJ, LOK JM, WOLF LG. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1984; **259**: 14222–14229.
- [22] NEUBIG RR. Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J* 1994; **8**: 6413–6417.
- [23] NORTHUP JK, STERWEISS PC, SMIGEL MD, SCHLEIFER LS, ROSS EM, GILMAN AG. Purification of the regulatory component of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci* 1980; **77**: 6516–6520.
- [24] RODBELL M. Programmable messengers: A new theory of hormone action. *Trends Biochem Sci* 1985; **10**: 461–464.

- [25] RODBELL M. The role of GTP-binding proteins in signal transduction: from the sublimely simple to the conceptually complex. *Curr Top Regul* 1992; **32**: 1–49.
- [26] RODBELL M, BIRNBAUMER L, POHL SL, KRAUS HMJ. The glukagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glukagon action. *J Biol Chem* 1971; **246**: 1877–1882.
- [27] ROSS EM, GILMAN AG. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* 1977; **252**: 6966–6969.
- [28] ROSS EM, HOWLETT AC, FERGUSON KM, GILMAN AG. Reconstitution of hormone-sensitive adenylyl cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J Biol Chem* 1978; **253**: 6401–6412.
- [29] SCHUBERT B, VAN DONGEN AMJ, KIRSCH GE, BROWN AM. β -adrenergic inhibition of cardiac sodium channels by dual G proteins pathways. *Science* 1989; **245**: 516–519.
- [30] STERNWEIS PC, ROBISHAW JD. Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 1984; **256**: 11517–11526.
- [31] STRYER L. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 1986; **9**: 87–119.
- [32] TANG WJ, GILMAN AG. Adenylyl cyclases. *Cell* 1992; **70**: 869–872
- [33] YAMAMOTO K, KONDO j, HISHIDA T, TERANISHI Y, TAKAI Y. Purification and characterization of a GTP-binding protein with a molecular weight of 20.000 in bovine brain membranes. Identification as the *rho* gene product. *J Biol Chem* 1988; **263**: 9926–9932.

Otrzymano: 04.11.1994 r.

Przyjęto: 09.11.1994 r.

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

Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej postanowił przyznać nagrodę naukową w roku 1994 za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w latach 1992–1994 w czasopiśmie figurującym w Current Content. Wysokość nagrody w 1994 r. wyniesie 6 000 000 zł.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada 1994 r. pod adresem Fundacji.

*Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa
tel. 340 344, fax 340470*

Komunikat Redakcji "Postępów Biologii Komórki"

Redakcja "Postępów Biologii Komórki" pragnie kontynuować porządkowanie polskich mian z zakresu biologii komórki, a w szczególności miana dotyczące: morfologii komórek i ich funkcji oraz biologii molekularnej. W związku z tym prosimy o nadsyłanie na adres Redakcji propozycji mian do końca listopada każdego roku, aby można opublikować je w zeszycie 1 następnego roku. Wszystkie uwagi do propozycji, które nadejdą do Redakcji do końca września będą opublikowane w zeszycie 4 wraz z propozycją ostateczną mian. Po kilku latach na tej podstawie będzie można opublikować suplement "Postępów" zawierający przyjęte miana.

Układ nadsyłanych propozycji:

proponowane miano (nazwa) w j. polskim	odpowiednik w j. angielskim i synonimy	definicja, bliższy opis miana
----------------------------------------------	----------------------------------------------	-------------------------------------

Redakcja

NR 1

W tym Zeszycie Postępów Biologii Komórki	1
HRABEC E., PŁUCIENNICZAK A.: Heterogenność histonów H 1 ssaków	3
MAŁUSZYŃSKA J.: Chromosom B – pasożyt czy funkcjonalny składnik genomu?	15
KILIAŃSKA Z.: Matriks jądrowa. I. Izolowanie, skład chemiczny i ultrastruktura	27
KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E., TARNAWSKI R., GRABOWSKA-BOCHENEK R.: Trombocyty a miażdżycza	43
WCISŁO G., SZWECH P.: Czynniki pobudzający kolonie-1 (CSF-1) – właściwości i zastosowanie kliniczne	53
GRABOWSKA-BOCHENEK R., ADAMCZAK M.: Fizjologiczna regulacja aktywności endoteliny: typy receptorów i przenoszenie sygnału	69
KAMIŃSKI T., PRZAŁA J.: Czynniki wzrostowe w jajniku	79
WITT M.: Sekwencje alfoidalne jako element struktury centromeru	93

NR 2

W tym Zeszycie Postępów Komórki	97
Od Redakcji	98
LEGOCKI A. B.: Nowe zdobycze genetyki i biologii molekularnej podstawą rozwoju biotechnologii roślin	99
STEC W. J.: Dlaczego należy promować nowoczesne biotechnologie?	105
WITT M., JARUZELSKA J.: Molekularne metody diagnostyki płci i ich zastosowanie w medycynie i diagnostyce	121
SZYMCZYK P., KILIAŃSKA Z.: Matriks jądrowa. II. Skład białkowy – specyficzność białek matriks jądrowej	133
NIEMIĘRKO A.: Oocyty i przedimplantacyjny zarodek ludzki	165
RATAJCZAK M. Z., SKÓRSKI T.: Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej	177
FILIPECKI M. K., MALEPSZY S.: Regulatory transkrypcji u roślin wyższych	197
GREGORASZCZUK E.: Aktualne poglądy na regulację hormonalną ciała żółtego	209
KOPEĆ-SZLĘZAK J.: Współdziałanie makrofagów wątroby z hepatocytami i nieparenchymalnymi komórkami wątroby	227
Z Kroniki	239

NR 3

W tym Zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	241
Komunikaty	242
WÓJCIK C.: Inhibitory kinaz zależnych od cyklin – Nowe geny przeciwnowotworowe	243
ŚPIEWLA E. J.: Oscylacyjny charakter zmian podstawowych właściwości komórek roślinnych	249
WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA E.: Transpozony i ich ewolucyjne znaczenie	263
KORDOWIAK A. M., TRZOS R.: Cytoprotekcyjne działanie prostaglandyn (na poziomie narządu, komórki oraz w układach <i>in vitro</i>)	275
TRZOS R., KORDOWIAK A. M.: Pochodne wanadu jako czynnik normalizujący kliniczne objawy cukrzycy	293
ROŻYŃKOWA D.: Genetyczne regulacje apoptozy – programowanej śmierci komórek	303
TRETYN A.: Transport jonów wapnia przez błony eukariotyczne.	
I. Kanały wapniowe	319
Sprawozdanie z działalności Zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za okres: grudzień 1990 – maj 1994	341

NR 4

W tym Zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	349
Komunikaty	350
JANITZ M., KURPISZ M.: Rola czynników parakrynowych w męskim układzie rozrodczym	351
SZCZEPANIAK A.: Kompleks cytochrom b6f – struktura i funkcja	375
RUREK M.: Redagowanie transferowych RNA organelli	391
SAWICKI B.: Wytwarzanie peptydów regulacyjnych w komórkach parafolikularnych (C) tarczycy	395
ZAGOŹDŻON R., GOŁĄB J.: Terapia genowa w leczeniu nowotworów	409
KMITA H., MICHEJDA J.: Poryna mitochondrialna – kanał VDAC	431
ILNICKI K., WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W.: Przeszczepianie komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej u człowieka – alternatywa dla przeszczepień szpiku kostnego	461
BARAŃSKA J.: Białka G – nagroda Nobla 1994	479

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 przysyłać 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.

Nadesłanie tekstu pracy, poprawionego po recenzjach, na dyskietce przyspieszy publikację,

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 nadbitek, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać streszczenie (do 150 słów) oraz słowa kluczowe – 3 do 10 słów zgodnych z terminami w Medical Subject Headings (Index Medicus), o ile słowa te są tam zawarte. Streszczenie i słowa kluczowe powinny być przedstawione także w języku angielskim. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rysunków, a jedynie zaznaczyć ółwkiem 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 zapożyczane z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmięnionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji.

Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

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

TREŚĆ

W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •	349
Komunikaty	350
JANITZ M., KURPISZ M.: Rola czynników parakrynowych w męskim układzie rozrodczym	351
SZCZEPANIAK A.: Kompleks cytochrom b6f – struktura i funkcja	375
RUREK M.: Redagowanie transferowych RNA organelli	391
SAWICKI B.: Wytwarzanie peptydów regulacyjnych w komórkach parafolikularnych (C) tarczycy	395
ZAGOŹDŻON R., GOŁĄB J.: Terapia genowa w leczeniu nowotworów	409
KMITA H., MICHEJDA J.: Poryna mitochondrialna – kanał VDAC	431
ILNICKI K., WIKTOR-JĘDRZEJCZAK W.: Przeszczepianie komórek krwiotwórczych krwi pępowinowej u człowieka – alternatywa dla przeszczepień szpiku kostnego	461
BARAŃSKA J.: Białka G – nagroda Nobla 1994	479

**Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI**

Prenumerata na rok 1995

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1995 na konto:

FUNDACJA POSTĘPÓW BIOLOGII KOMÓRKI, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A., IV O/Warszawa 501132-40006576-2701-3-1110.

Cena prenumeraty rocznika (4 zeszyty + ew. 2 suplementy) na rok 1995:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 400 000 zł,

a dla odbiorców indywidualnych 160 000 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 501132-40006576-2701-3-1110.

Price per year 40 dollars USA.

Indeks 369705