

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

**TOM 23 NR-4'96**  
(503–726)

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

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

Maciej KAWALEC (biologia, immunologia i immunoterapia nowotworów – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*),

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

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

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

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

Rada Redakcyjna:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI,

Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEBŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA,

Lech WOJTCZAK

*Adres Redakcji: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, tel. 340 344, fax 340470.*

#### Artykuły nadesłane w 1996 r. recenzowali:

prof. dr hab. Halina AUGUSTYNIAK, prof. dr hab. Jolanta BARAŃSKA, prof. dr hab. Jan BARCISZEWSKI, prof. dr hab. Grzegorz BARTOSZ, prof. dr hab. Szczepan BILIŃSKI, dr Andrzej CIECHANOWICZ, prof. dr hab. Barbara CYBULSKA, prof. dr hab. Jerzy DUSZYŃSKI, dr Jolanta FERTAŁA, prof. dr hab. J. KAWIAK, dr Maciej KAWALEC, prof. dr hab. W. KILARSKI, prof. dr hab. Andrzej KLEIN, prof. dr hab. Leszek KORDYLEWSKI, prof. dr hab. Włodzimierz KOROHODA, prof. dr hab. J. KOWALCZYK, prof. dr hab. Wanda Małgorzata KRAJEWSKA, prof. dr hab. Maria KWIATKOWSKA, prof. dr hab. Jacek KUŹNICKI, prof. dr hab. Stanisław LEWAK, prof. dr hab. Ludwik MALENDOWICZ, prof. dr hab. Stefan MALEPSZY, prof. dr hab. Kazimierz MARCINIAK, prof. dr hab. J. MICHEJDA, prof. dr hab. Stanisław MOSKALEWSKI, prof. dr hab. Olgierd NARKIEWICZ, prof. dr Ryszard OLIŃSKI, prof. dr hab. Maria OLSZEWSKA, prof. dr hab. Regina OSIECKA, prof. dr hab. Zofia OSUCHOWSKA, prof. dr hab. Anna PŁUŻAŃSKA, prof. dr hab. Stanisława STOKŁOSOWA, dr hab. Joanna STROSZNAJDER, doc. dr hab. Józefa STYRNA, prof. dr hab. B. SZUKALSKI, prof. dr hab. Henryk TCHÓRZEWSKI, prof. dr hab. Andrzej TRETYN, prof. dr hab. Jerzy WARCHOŁ, prof. dr hab. Stanisław WIĘCKOWSKI, prof. dr hab. Tadeusz WILUSZ, prof. dr hab. M. ZABEL, dr hab. Zdzisław ŻAK.

*Za tę społecznie wykonaną pracę Redakcja składa serdeczne podziękowanie.*

© Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

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

Ark. wyd. 17,0. Ark. druk. 14,0. Oddano do składu w listopadzie 1996 r. Podpisano do druku w styczniu 1997 r. Druk ukończono w styczniu 1997 r.

## W tym zeszycie • Postępów Biologii Komórki •

- Proces nowotworowy związany jest często z zaburzeniami funkcjonowania cząsteczek adhezyjnych. Przykładem może być rak jelita grubego, o czym pisano w artykule na stronie 705.
- Peptydowe kwasy nukleinowe (PNA) są nową grupą analogów DNA (patrz strona 541), które wydajnie hybrydują z komplementarnymi kwasami nukleinowymi. PNA znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach podstawowych i diagnostyce medycznej oraz stymulują rozważania ewolucyjne.
- Strukturę i funkcje receptorów eikozanoidów omówiono na stronie 553. Przedstawiono udział tych receptorów w mechanizmach przekazywania sygnału i ich oddziaływaniu z różnymi układami wtórnych przekaźników. Strukturę i funkcje receptorów lipoprotein omówiono natomiast na stronie 615. Wspomniano tam o potencjalnej roli receptorów lipoprotein w patogenezie miażdżycy i w chorobie Alzheimera.
- Artykuł o nowych cząsteczkach sygnałowych regulujących wzrost i rozwój roślin (str. 635) nawiązuje do publikacji o hormonie roślinnym, systeminie opisanym w poprzednim zeszycie "Postępów" (1995, t. 23 zeszyt 3, strona 477).
- Warto przejrzeć (strona 683) artykuł o zasadach działania mikroskopu świetlnego trójwymiarowego. Dzięki zastosowaniu ukośnego oświetlenia i widzenia stereoskopowego pozwala on na bezpośrednią obserwację przestrzennej budowy badanego preparatu



## PAMIĘCI DOKTORA MACIEJA KAWALCA

Dr med. Maciej Kawalec odszedł od nas nagle 10 listopada 1996 r. Trudno jest pogodzić się z odejściem dużo młodszego Kolegi redakcyjnego, z którym współpracowaliśmy przez wiele lat. Uczestniczył On między innymi w narodzinach „Postępów Biologii Komórki”.

Doktor M. Kawalec urodził się 24 lutego 1945 r. w Kleczanowie k. Sandomierza. Szkołę średnią ukończył w Warszawie. Studiował na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie, który ukończył w roku 1969. Będąc na 3 roku studiów rozpoczął pracę jako wolontariusz w Zakładzie Histologii i Embriologii AM w Warszawie. Po ukończeniu studiów pracował w Zakładzie Cytofizjologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie jako: asystent, st. asystent, adiunkt. Rozprawę doktorską zatytułowaną „*Zmiany względnej ilości antygenów na powierzchni żywych komórek wywołane nierozpuszczalnymi pochodnymi proteaz*” obronił w 1975 r. Jego główne zainteresowania naukowe po otrzymaniu stopnia doktora medycyny dotyczyły wywołania immunologicznej obrony organizmu przed nowotworem, doświadczalnych problemów przeszczepiania szpiku kostnego, izolowania i oczyszczania ludzkiej prekalikreiny osoczowej.



Był dobrze przygotowany do przedstawienia rozprawy habilitacyjnej, chociaż nie zdecydował się na jej przedstawienie. Łącznie opublikował 38 prac doświadczalnych, wiele artykułów przeglądowych, rozdziały w podręcznikach, takich jak: „*Podstawy cytofizjologii*”, PWN i „*Struktura funkcjonalna komórek i tkanek*” PWN. Był jednym z tłumaczy polskiego wydania „*Podstaw immunologii*” I.M. Roitta, PWN 1977 r. Był doskonałym, bardzo cenionym przez słuchaczy dydaktykiem.

Dr Maciej Kawalec miał też liczne zainteresowania dodatkowe. Od wielu lat zajmował się sadownictwem w swojej miejscowości rodzinnej, w Kleczanowie k. Sandomierza. Był wieloletnim sekretarzem i skarbnikiem Głównego Zarządu Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików oraz skarbnikiem Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Jednym z Jego zainteresowań ostatnich lat była komputeryzacja prac wydawniczych w Centrum Medycznym Kształcenia Podyplomowego. Był pełen twórczych pomysłów, których wiele pozostało nie zrealizowanych. Pozostanie w naszej pamięci jako człowiek nauki i wspaniały przyjaciel.

*Warszawa, w grudniu 1996 roku*

*Jerzy Kawiak*



## NIEKTÓRE ASPEKTY RESTRYKCJI MHC\*

### SOME ASPECTS OF MHC RESTRICTION

Marek JAKÓBISIAK

Zakład Immunologii Instytutu Biostruktury AM w Warszawie

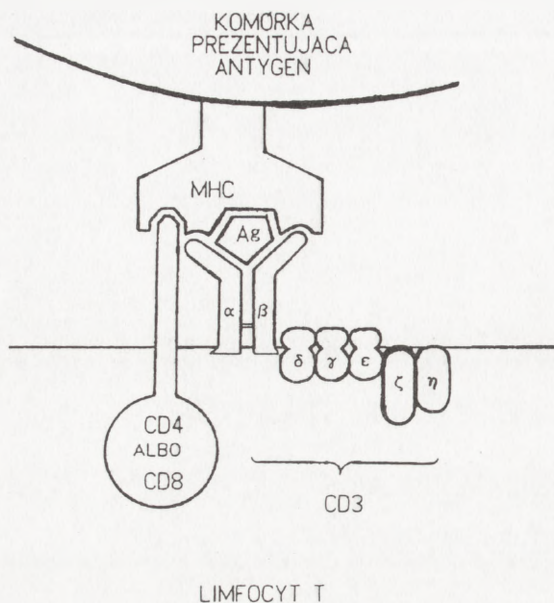
*Streszczenie:* Zinkernagel i Doherty wykazali, że limfocyty T rozpoznają antygeny wirusowe w połączeniu z cząsteczkami MHC w błonie komórkowej. Ta sama zasada odnosi się do rozpoznawania komórek dawcy przez limfocyty T biorcy przeszczepu i komórek nowotworowych przez limfocyty T pacjenta z nowotworem. Także w chorobach z autoagresji limfocyty T pacjenta rozpoznają autoantygeny związane i prezentowane przez cząsteczki MHC. Celem wielu badań jest obecnie ułatwienie rozpoznawania przez limfocyty T komórek zakażonych przez wirusy i komórek nowotworowych. Z drugiej strony podejmowane są próby hamowania reaktywności limfocytów T w stosunku do allogenicznych komórek biorcy przeszczepu i blokowania odpowiedzi limfocytów T na autoantygeny w chorobach autoimmunizacyjnych.

*Summary:* Zinkernagel and Doherty found out that T cells responding to virus-infected cells recognize viral antigens in the context of MHC molecules present in the cell membrane. The same principle applies to recognition of donor cells and tumor cells by the recipients' and tumor patients' T lymphocytes, respectively. Also in autoimmune diseases patients' T cells recognize autoantigens bound and presented by MHC molecules. The object of numerous studies is at present to facilitate T cell recognition of virus-infected and tumor cells. On the other hand many attempts are being undertaken to suppress T cell reactivity against allogeneic cells in graft recipient and to block T cell response to autoantigens in autoimmune diseases.

Pojęcie restrykcji MHC zostało wprowadzone w wyniku odkryć, których dokonali R.M. Zinkernagel i P. C. Doherty w trakcie swoich badań prowadzonych w latach 1973–1975 w *John Curtin School of Medical Research* w Canberra – stolicy Australii. Najważniejsze wyniki tych badań zawarte zostały w dwóch pracach opublikowanych w *Nature* [8, 9]. Restrykcja MHC (*major histocompatibility complex* – główny układ zgodności tkankowej) określa nastawienie limfocytów T na rozpoznawanie

\*Artykuł w związku z nagrodą Nobla 1996 r.





Rysunek 1. Schemat receptora limfocyty T rozpoznającego antygen (Ag); receptor składa się z łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  i połączony jest z białkami CD3. Antygen rozpoznawany jest w połączeniu z cząsteczką MHC komórki prezentującej. Z cząsteczką MHC łączy się również cząsteczka CD4 lub CD8 limfocyty T

antygenów tylko w połączeniu z cząsteczkami MHC w błonie komórki prezentującej antygen (rys. 1).

Okazało się, że pod tym względem receptory limfocytów T zachowują się odmiennie od przeciwciał, które są w stanie rozpoznać zarówno wolne (krążące) antygeny, jak i antygeny obecne w błonie komórkowej.

Odkrycie, którego dokonali Zinkernagel i Doherty, wydaje się pozornie banalne. Wykazali oni, że limfocyty T cytotoksyczne jednego osobnika – zdolne do zabicia komórek zakażonych określonym wirusem – nie są zdolne do zabicia komórek innego osobnika, choćby były one zakażone tym samym wirusem. To, że limfocyty mogą zabijać komórki zakażone przez wirusy, było już wiadomo wcześniej, natomiast jaki jest mechanizm tej cytotoksyczności i jaka jest struktura cząsteczek uczestniczących w rozpoznawaniu przez limfocyty T zakażonych komórek, wyjaśniły dopiero późniejsze badania. Na przykład budowę receptora limfocyty T rozpoznającego antygen wyjaśniły dopiero badania opublikowane w tych samych dniach, w których Komitet Noblowski podjął decyzję przyznania nagrody Zinkernagelowi i Doherty'emu [6].

Badania tegorocznych noblistów stały się przełomem głównie ze względu na drogi poszukiwań, jakie wyznaczyły innym badaczom, a które doprowadziły do wyjaśnienia niektórych niezrozumiałych dotychczas zjawisk związanych z naszą odpornością.

Przede wszystkim pomogły one zrozumieć funkcję cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej, czyli cząsteczek MHC. Cząsteczki MHC człowieka, zwane

cząsteczkami lub antygenami HLA (*human leukocyte antigens*) kodowane są przez geny należące do najbardziej polimorficznych genów człowieka. Niektóre geny HLA, a w efekcie także cząsteczki HLA występują w populacji ludzkiej w ponad stu odmianach. Przed odkryciami Zinkernagela i Doherty'ego nie rozumiano, pod jaką presją rozwinął się i utrzymał w ewolucji człowieka tak wybitny polimorfizm genów HLA. Jediną funkcją cząsteczek HLA, jaką znano, było indukowanie po przeszczepieniu komórek lub tkanek człowieka innemu osobnikowi odpowiedzi transplantacyjnej prowadzącej do odrzucenia przeszczepu. Obecnie wiemy, że ten wybitny polimorfizm HLA rozwinął się pod presją atakujących nasz organizm mikroorganizmów i wywoływanych przez nie chorób. Dzięki temu polimorfizmowi jesteśmy na ogół heterozygotami pod względem genów HLA i dzięki temu mamy większą liczbę różnych cząsteczek HLA na powierzchni naszych komórek, a więc możemy efektywnie prezentować większą liczbę antygenów różnych mikroorganizmów. Tym samym zdolni jesteśmy do skutecznej odpowiedzi i obrony przeciw większej liczbie atakujących nas drobnoustrojów.

W trakcie trwającej tysiące lat ewolucji naszego gatunku okres, gdy jesteśmy w stanie dzięki szczepionkom zapobiegać chorobom zakaźnym lub dzięki antybiotykowi zwalczać te choroby, jest jeszcze bardzo krótki. Przez olbrzymią większość czasu w historii naszego gatunku jedyną obroną człowieka przeciw atakującym go mikroorganizmom były naturalne mechanizmy obronne, jakimi dysponuje nasz układ odpornościowy. Gdy określoną populację ludzką atakował drobnoustrój wywołujący chorobę charakteryzującą się nawet bardzo wysoką śmiertelnością, wtedy na ogół dzięki polimorfizmowi HLA przynajmniej część osobników w danej populacji mogło przeżyć epidemię, gdyż miało cząsteczki HLA zdolne do efektywnej prezentacji antygenów tego drobnoustroju.

Jakich strategii używają wirusy, żeby wymknąć się spod kontroli naszego układu odpornościowego? Podstawową strategią są mutacje ich genów kodujących antygeny. Dzięki tym mutacjom antygeny wirusowe zmieniają się w organizmie zakażonego osobnika w ten sposób, że nie są skutecznie prezentowane jego limfocytom T. Na przykład mutacje powodują, że określony antygen nie pasuje już do rowka w cząsteczce MHC określonego osobnika. Jeden z epitopów antygeny jądrowego EBNA-4 wirusa Epsteina-Barr jest efektywnie prezentowany limfocytom T przez cząsteczkę HLA-A11 inicjując odpowiedź przeciwwirusową. W południowo-wschodniej Azji i na Nowej Gwinei, gdzie cząsteczki te występują u ludzi z dużą częstotliwością, szczepy wirusów Epsteina-Barr zmutowały zmieniając nieznacznie kształt antygeny EBNA-4. W wyniku tej mutacji nie pasuje już on do rowka w cząsteczce HLA-A11 i nie może być już przez nią prezentowany limfocytom T [5]. Inną strategią stosowaną przez niektóre wirusy jest hamowanie ekspresji cząsteczek MHC w zakażonych przez siebie komórkach.

Badania nad sposobem, w jaki limfocyty T rozpoznają antygeny wirusowe, pozwoliły zrozumieć, dlaczego w przypadku niektórych chorób zakaźnych choroba

jest cięższa, gdy zarażamy się od członka bliskiej rodziny niż gdy zarażamy się od osoby zupełnie obcej. W organizmie zakażonego osobnika wirus "adoptuje się" zmieniając w następstwie mutacji antygeny tak, żeby nie pasowały i nie mogły być prezentowane przez jego cząsteczki HLA limfocytom T. Gdy następnie tak zaadoptowany wirus zakaża następnego osobnika – blisko spokrewnionego z poprzednim – wirus nie musi się już adoptować, gdyż obydwaj osobnicy mają takie same albo identyczne cząsteczki HLA. Choroba może więc rozwinąć się szybciej po zakażeniu i może mieć cięższy przebieg.

Dzięki badaniom zapoczątkowanym przez tegorocznych noblistów rozumiemy również głębiej tragedię, która dotknęła Indian amerykańskich w następstwie wtargnięcia na ich ziemie Europejczyków [2]. Spośród około 56 milionów Indian, którzy zmarli w następstwie tych wydarzeń, większość nie zginęła na polu walki, ale zmarła w wyniku epidemii chorób zawleczonych do Ameryk przez Europejczyków. Wykazano dopiero w szczegółowych badaniach cząsteczek HLA u Indian, że polimorfizm HLA jest u nich bardzo niski w porównaniu z polimorfizmem HLA obserwowanym u Europejczyków lub mieszkańców Afryki. W obrębie poszczególnych szczepów Indianie są do siebie bardzo podobni pod względem cząsteczek HLA, tak jakby należeli do jednej rodziny. Jeżeli jednego z członków szczepu zakażał określony wirus, to po "adaptacji" mógł "bezkarnie" rozprzestrzeniać się wśród innych członków danego szczepu wywołując ciężką chorobę.

Prace rozpoczęte przez Zinkernagela i Doherty'ego doprowadziły do powstania nowych koncepcji leczenia niektórych chorób wirusowych. W jednej z terapii genowych AIDS, która już doszła do prób klinicznych, do komórek pacjenta wprowadza się geny kodujące antygeny otoczkowe wirusa HIV odpowiedzialnego za rozwój tej choroby [3]. Dzięki temu komórki pacjenta mogą syntetyzować i prezentować limfocytom T antygeny wirusowe. Co prawda u pacjenta chorego na AIDS jest wiele komórek zakażonych przez wirusy i teoretycznie mogłyby one również efektywnie prezentować limfocytom antygeny wirusowe, ale należy pamiętać, że w zakażonej komórce wirusy mogą również stosować różne strategie hamujące efektywną prezentację, na przykład przez obniżanie ekspresji cząsteczek MHC. Można by zapytać, jaką przewagę może mieć taka terapia nad podawaniem pacjentowi gotowych antygenów wirusowych. Otóż podawanie antygenów gwarantuje po ich fagocytozie przez odpowiednie komórki ich prezentację głównie w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II, natomiast dla aktywacji limfocytów T cytotoksycznych – odgrywających bardzo ważną rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej – dominującą rolę ma prezentacja w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy I. Taką prezentację może zapewnić tylko komórka, która jest zakażona przez wirusy, albo taka, do której wprowadzono, tak jak to się robi we wspomnianej terapii genowej, geny kodujące odpowiednie antygeny wirusowe.

W innej terapii genowej AIDS izoluje się od pacjenta limfocyty T cytotoksyczne i wprowadza się do nich odpowiednie geny, tak żeby same syntetyzowały receptory

rozpoznające zakażone przez wirusy HIV komórki. Tak otrzymane i namnożone limfocyty podaje się ponownie pacjentowi.

W badaniach nad mutacjami używanymi przez wirusy w celu wymknięcia się spod kontroli układu odpornościowego wykazano ostatnio, że niektóre spośród tych mutacji są bardziej subtelne, ale zarazem bardziej groźne dla zakażonego organizmu. Okazało się, że niektóre mutacje zmieniają bardzo nieznacznie kształt prezentowanego antygenu tak, że nadal pasuje on zarówno do rowka w cząsteczce MHC, jak i do rozpoznającego ten kompleks receptora limfocytu T. Ta niewielka jednak zmiana powoduje, że limfocyt T rozpoznający taki kompleks zamiast otrzymać sygnał aktywujący otrzymuje sygnał hamujący aktywację [1]. Mutacje takie nazywa się czasami altruistycznymi. Zmutowany wirus chroni bowiem przed cytotoksycznymi limfocytami T nie tylko zakażoną przez siebie komórkę, ale również komórki zakażone przez wirusy niezmutowane.

Mutacje takie budzą zrozumiałe zainteresowanie, ponieważ myśli się o wykorzystaniu ich do leczenia chorób z autoagresji. Na modelach zwierzęcych reumatoidalnego zapalenia stawów i stwardnienia rozsianego wykazano już, że podawanie nieznacznie zmienionych autoantygenów daje efekt terapeutyczny [4]. Prowadzi się intensywne prace, żeby obserwacje te wykorzystać do terapii chorób autoimmunizacyjnych człowieka [7].

## LITERATURA

- [1] BERTOLETTI A, SETTE A, CHISARI FV, PENNA A, LEVRERO M, DE CARLI M, FIACCADORI F, FERRARI C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T cell receptor antagonists for anti-viral cytotoxic T cells. *Nature* 1994; **369**: 407–410.
- [2] BLACK FL. Why did they die? *Science* 1992; **258**: 1739–1740.
- [3] BRIDGES SH, SARVER N. Gene therapy and immune restoration for HIV disease. *Lancet* 1995; **345**: 427–432.
- [4] BROCKE S, GIJBELS K, ALLEGRETTA M, FERBER I, PIERCY C, BLANKENSTEIN T, MARTIN R, UTZ U, KARIN N, MITCHELL D, VEROMAA T, WAISMAN A, GAUR A, CONLON P, LING N, FAIRCHILD PJ, WRAITH DC, O'GARRA A, FATHMAN CG, STEINMAN L. Treatment of experimental encephalomyelitis with a peptide analogue of myelin basic protein. *Nature* 1996; **379**: 343–346.
- [5] DE CAMPOS-LIMA P-O, GAVIOLI R, ZHANG Q-J, WALLACE LE, DOLCETTI R, ROWE M, RICKINSON AB, MASUCCI MG. HLA-A11 epitope loss isolates of Epstein-Barr virus from a highly A11 population. *Science* 1993; **260**: 98–100.
- [6] GARCIA KC, DEGANO M, STANFIELD RL, BRUNMARK A, JACKSON MR, PETERSON PA, TEYTON L, WILSON IA. An  $\alpha\beta$  T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 1996; **274**: 209–219.
- [7] MARTIN R, MCFARLAND H. Experimental immunotherapies for multiple sclerosis. *Springer Semin Immunopathol* 1996; **18**: 1–24.

- [8] ZINKERNAGEL RM, DOHERTY PC. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogenic system. *Nature* 1974; **248**: 701–702.
- [9] ZINKERNAGEL RM, DOHERTY PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; **251**: 547–548.

*Redaktor prowadzący: Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 10.12.1996 r.*

*Przyjęto: 12.12.1996 r.*

*Adres autora: Instytut Biostruktury AM  
02-004 Warszawa, ul. Chalubińskiego 5*

## WPŁYW CYTOKIN NA HORMONALNĄ REGULACJĘ PROCESÓW ROZRODU

### THE INFLUENCE OF CYTOKINES ON THE HORMONAL REGULATION OF REPRODUCTION PROCESSES

Barbara JANA, Agnieszka STĘPIEŃ

Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, Oddział  
Endokrynologii i Patofizjologii Rozrodu Zwierząt, Olsztyn

*Streszczenie:* Powiązania między układem immunologicznym a neuroendokrynowym są tworzone przez szereg substancji, będących produktami tych systemów (neuropeptydy, hormony, cytokiny). W artykule przedstawiono dane o wpływie cytokin na gruczoły wewnętrznego wydzielania podczas ostrej fazy odpowiedzi. Cytokiny produkowane przez makrofagi, monocyty, a także gruczoły wewnętrznego wydzielania aktywują oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową, stymulują produkcję wazopresyny argininowej, oksytocyny oraz hamują sekrecję prolaktyny i somatostatyny. Wywierają również kompleksowy wpływ na oś podwzgórze-przysadka-gonady. Opisano także udział glikokortykoidów w modulowaniu funkcji układu immunologicznego oraz ich wpływ na mechanizmy obronne organizmu.

*Słowa kluczowe:* ostra faza odpowiedzi, cytokiny, gruczoły wewnętrznego wydzielania

*Summary:* Communications between the immune and endocrine systems are composed by a numerous substances which are secreted by these two systems (neuropeptides, hormones, cytokines). This review presents the involvement of cytokines in regulation of the function of endocrine glands during the acute phase response. Inflammatory cytokines, produced principally by macrophages and monocytes, activate the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, induce arginine vasopressin and oxytocin secretion, and inhibit somatotropin and prolactin synthesis. Cytokines have also complex effect on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. Moreover, the informations about the influence of glucocorticoids on the immune system and their importance for defence mechanisms are given.

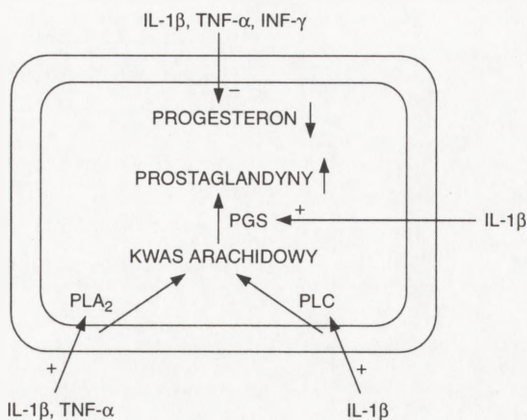
*Key words:* acute phase response, cytokines, endocrine glands

*Wykaz używanych skrótów:* **ACTH** (*Adrenocorticotropic Hormone*) – kortykotropina, **AVP** (*Arginine Vasopressin*) – wazopresyna argininowa, **CRF** (*Corticotropin-Releasing Factor*) – czynnik podwzgórzowy uwalniający kortykotropinę, **FSH** (*Follicle-Stimulating Hormone*) – hormon folikulotropowy, **GH** (*Growth Hormone*) – hormon wzrostu, **GHRH** (*Growth Hormone-Releasing Hormone*) – hormon uwalniający hormon wzrostu, **GnRH** (*Gonadotropine-Releasing Hormone*) – hormon uwalniający

gonadotropiny, **HPA** (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis*) – oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa, **IFN** (*Interferon*) – interferon, **IGF** (*Insulin-like Growth Factor*) – insulinopodobny czynnik wzrostu, **IL** (*Interleukin*) – interleukina, **LH** (*Luteinizing Hormone*) – hormon luteinizujący, **LPS** (*Lipopolysaccharide*) – lipopolisacharyd,  **$\alpha$ -MSH** ( *$\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone*) – hormon melanoformowy  $\alpha$ , **NE** (*Norepinephrine*) – noradrenalina, **NO** (*Nitric Oxide*) – tlenek azotu, **OT** (*Oxytocin*) – oksytocyna, **PG** (*Prostaglandin*) – prostaglandyna, **POMC** (*Proopiomelanocortin*) – proopiomelanokortyna, **PRL** (*Prolactin*) – prolaktyna, **TNF** (*Tumor Necrosis Factor*) – czynnik martwicy nowotworu, **TSH** (*Thyroid-Stimulating Hormone*) – tyreotropina, **VIP** (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*) – naczynioaktywny polipeptyd jelitowy.

## WPLYW CYTOKIN NA GRUCZOŁY WEWNĘTRZNEGO WYDZIELANIA

Aktywujące układ immunologiczny różne procesy patologiczne, takie jak: infekcje bakteryjne, wirusowe, grzybicze, zapalenia, uszkodzenia tkanek, szok endotoksynowy, nowotwory oraz immunologiczne zaburzenia, wywołują uogólnioną reakcję organizmu, określaną jako ostra faza odpowiedzi. Jest ona elementem odporności nieswoistej i obejmuje wiele najwcześniej zachodzących zmian w odpowiedzi na czynnik patogenny. Ostra faza odpowiedzi charakteryzuje się: gorączką, leukocytozą, ujemnym bilansem azotu, zwiększoną przepuszczalnością naczyń krwionośnych, zmianami koncentracji makroelementów i hormonów steroidowych w osoczu oraz gwałtownym wzrostem syntezy białek ostrej fazy, głównie w wątrobie, a także w komórkach śródbłonna i fibroblastach. W ostrych zapaleniach przez hamowanie elastazy i katepsyny G białka ostrej fazy, takie jak np: białko C-reaktywne,  $\alpha$ 1-glikoproteina,  $\alpha$ 1-antytrypsyna i  $\alpha$ 1-antychymotrypsyna działają jako czynniki ochraniające tkanki. Należy podkreślić, iż wymienione metaboliczne i endokrynowe zmiany nie zależą od rodzaju czynnika etiologicznego, który doprowadził do ich powstania [20, 21, 23, 43, 82]. Ostra faza odpowiedzi powodowana jest przez cytokiny, głównie interleukinę-1 (IL-1), interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) i czynnik martwicy nowotworu –  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), będące zasadniczo produktami uaktywnionych makrofagów i monocytów, a także wielu gruczołów dokrewnych. Działają one przez swoje receptory występujące na prawie wszystkich komórkach jądrazystych ssaków. Jednym z najwcześniejszych sygnałów inicjowanych przez receptory dla TNF jest aktywacja sfingomielinazy, która rozkłada sfingomielinę błony komórkowej z wytworzeniem ceramidu aktywizującego z kolei kinazę białkową A i C. Sygnały przekazywane przez receptory dla TNF prowadzą również do aktywacji czynników transkrypcyjnych NF- $\kappa$ B i AP-1. Cytokiny działają tak jak klasyczne hormony, w sposób auto-, para- i endokrynowy. W przeciwieństwie jednak do hormonów, cytokiny wywierają swoje działanie występując w mniejszym stężeniu molowym, a ich działanie jest potęgowane przez szereg innych cytokin, np: IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, białka uniemożliwiające wiązanie IL-1 i TNF- $\alpha$  do receptorów, czynniki



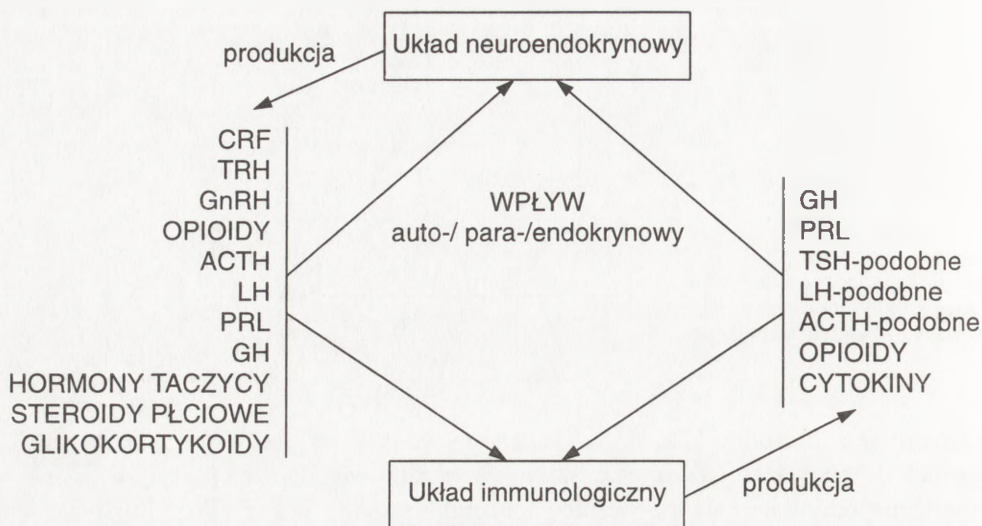
Rys. 1. Kaskadowy sposób sekrecji cytokin: (+) wpływ stymulujący, (-) wpływ hamujący

wzrostu oraz hormony [21, 43]. Kaskadowy sposób produkcji cytokin ilustruje rysunek 1. Najważniejszym czynnikiem zapoczątkowującym endokrynową i metaboliczną odpowiedź na posocznicę lub endotoksemię jest TNF- $\alpha$ . Pojawia się on wcześniej niż inne cytokiny, już nawet w ciągu 15, a maksymalnie 90 min po iniekcji lipopolisacharydów (LPS), będących immunologicznie czynnymi elementami struktury ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. TNF- $\alpha$  indukuje produkcję IL-1 $\beta$  i z kolei każda z nich stymuluje powstawanie IL-6, która na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego hamuje sekrecję cytokin, które przyczyniły się do jej powstania. Rola IL-2 jako stymulatora produkcji TNF- $\alpha$  i IL-1 nie jest jeszcze całkowicie poznana. Sądzi się, iż ta interleukina zmienia sekrecję hormonów, np: kortykoliberyny (CRF) i glikokortykoidów, jeśli występuje w dużych ilościach [29].

Wyniki badań z ostatnich lat wskazują na obustronne powiązania pomiędzy układem immunologicznym a neuroendokrynowym i dają podstawę do przypuszczeń o funkcjonowaniu tzw. sieci immunoendokrynowej. Z jednej strony cytokiny oprócz wpływu na komórki układu immunologicznego oddziałują na układ nerwowy i większość gruczołów dokrewnych, z drugiej zaś, hormony i neuropeptydy, obok działań na gruczoły wewnętrznego wydzielania, wpływają na układ immunologiczny. Hormony i neuropeptydy, działając przez specyficzne receptory znajdujące się na leukocytach, wpływają m.in. na proliferację limfocytów T, aktywność komórek NK, produkcję przeciwciał oraz powstawanie cytokin w fagocytach mononuklearnych [8, 9, 43, 77] (rys. 2).

Praca przedstawia udział cytokin w endokrynowej regulacji czynności gruczołów wewnętrznego wydzielania podczas ostrej fazy odpowiedzi organizmu. Została ona przygotowana na podstawie wyników doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vitro* na tkankach pochodzących głównie od zwierząt laboratoryjnych, w mniejszym stopniu od zwierząt gospodarskich. Wykorzystano także rezultaty nielicznych badań *in vivo*.





Rys. 2. Schemat wzajemnych zależności między układem immunologicznym a neuroendokrynowym

## PRZENIKANIE CYTOKIN DO PODWZGÓRZA – BARIERA KREW-MÓZG

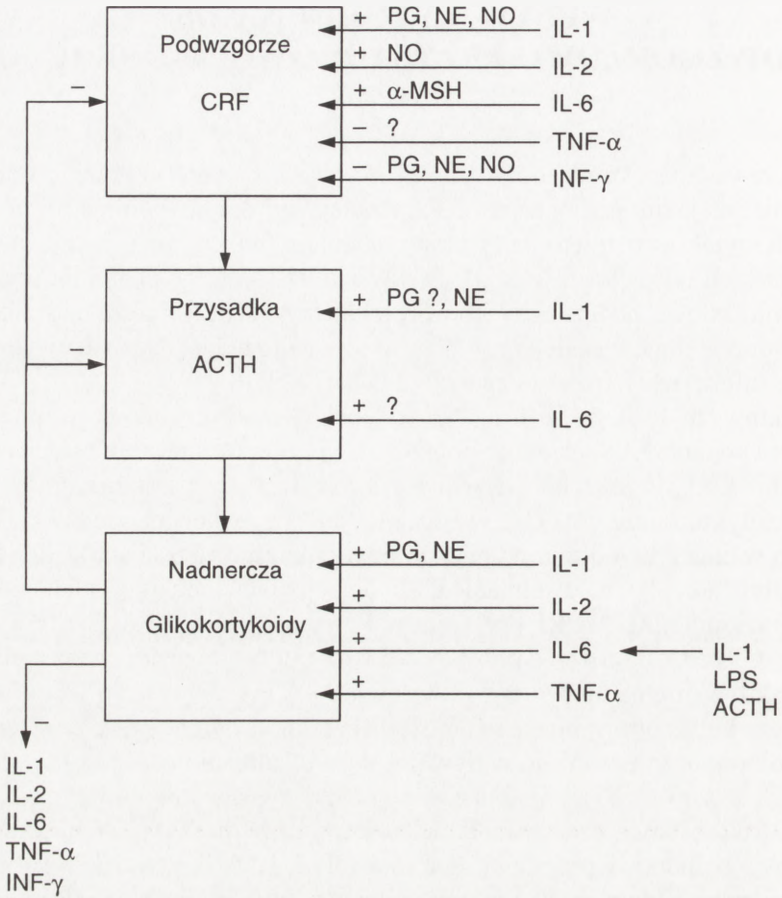
Na funkcjonowanie osi podwzgórzowo-przysadkowej mają wpływ nie tylko cytokiny produkowane w komórkach mózgu (astrocyty, komórki mikrogleju, neurony podwzgórz), lecz także cytokiny pochodzenia obwodowego, docierające do mózgu wraz z krwią [4, 13, 17, 22, 23, 39, 61, 68, 74]. Krążące cytokiny przenikają do mózgu w obrębie narządu naczyniowego blaszki krańcowej (OVLT) oraz wyniosłości pośrodkowej, gdzie jak się obecnie sądzi, bariera krew-mózg nie istnieje [43, 44]. Według Blatteis [10] OVLT może być miejscem, gdzie cytokiny przekazują niesioną informację innym czynnikiem, tzw. drugorzędowym nośnikom. Nie są jeszcze poznane czynniki uwalniane w OLVT. Sugeruje się, że mogą być nimi: cytokiny,  $PGE_2$ , neurotransmitery, np. 5-hydrokstryptamina. Cytokiny dostające się do mózgu, a także prawdopodobnie czynniki pośredniczące w ich wpływie, mogą stymulować produkcję neuropeptydów, podwzgórzowych czynników pobudzających i hamujących, innych interleukin oraz pobudzać neurony dopaminergiczne i adrenergiczne. Wymienione związki oraz interleukiny obecne w wyniosłości pośrodkowej podwzgórz dostając się do krążenia wrotnego mogą oddziaływać na przednią część przysadki mózgowej zmieniając jej aktywność sekrecyjną [23, 43].

## WPLYW CYTOKIN NA OŚ PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWO-NADNERCZOWĄ (HPA)

Przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie: na jakim poziomie osi HPA działają cytokiny? Pomimo uzyskania rozbieżnych wyników przyjęto, iż cytokiny modulują funkcję omawianej osi działając na wszystkich jej piętrach (rys. 3). Efekty ich działania na poziomie podwzgórza są natychmiastowe, podczas gdy ich wpływ na przysadkę i nadnercza jest wolniejszy, ale prawdopodobnie ważniejszy w odpowiedzi na przedłużające się uwalnianie cytokin w infekcjach i rozwoju reakcji zapalnej [23].

Cytokiny (IL-1, IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) pochodzenia obwodowego, powstałe po dożylnym podaniu LPS, działając poprzez swoje receptory w podwzgórzu stymulują uwalnianie CRF do krążenia wrotnego. Następstwem tego jest znaczny wzrost poziomu kortykotropiny (ACTH) w osoczu. Najwyższą koncentrację ACTH obserwowano w ciągu 30–60 min po iniekcji interleukin lub LPS [18, 67, 79]. Cytokiny mają wpływ nie tylko na uwalnianie CRF, lecz również indukują, zależny od dawki, wzrost poziomu mRNA/CRF [79]. Jones i Kennedy [91] wskazują, iż IFN- $\gamma$  hamuje sekrecję CRF. O ile ostry wpływ cytokin na podwzgórze jest oczywisty, o tyle ich oddziaływanie na biosyntezę i uwalnianie ACTH z przysadki jest uzależnione od tego czy kortykotropiny objęte są procesem patologicznym, czy też nie. Stwierdzono zarówno brak bezpośredniego wpływu IL-1 na uwalnianie ACTH z kortykotropów zdrowych szczurów [67], jak i opisywano hamujący bądź pobudzający wpływ IL-1, IL-2, IL-6 na ekspresję genu proopiomelanokortynowego (POMC) w niezmiennych chorobowo komórkach przysadki. Natomiast IL-1, IL-2, IL-6 zwiększały biosyntezę ACTH w mysich komórkach nowotworowych przysadki (linia AtT-20) po 24 godz. lub dłuższym okresie inkubacji [36]. Ostatnie doświadczenia wykazały, że przysadkowy wpływ IL-1 wymaga inicjującego działania CRF. CRF pochodzenia endo- lub egzogenne "uczula" przysadkę na cytokiny, prowadząc do wydzielania ACTH [60]. Bezpośredni wpływ interleukin na przysadkę wiąże się z obecnością w tym gruczole wysoce specyficznych receptorów dla IL-1 i IL-6 [27, 54], poprzez które prowadzą one do zmian w uwalnianiu gonadotropin. Ponadto interleukiny mogą być również produkowane w komórkach przysadki (IL-1 w kortykotropach, IL-6 w komórkach gwiaździstych) w odpowiedzi na infekcje. Tym samym mogą wykazywać parakrynowy wpływ na komórki tego gruczołu, regulując jego funkcje podczas infekcji [23, 37].

Nie są jeszcze poznane molekularne mechanizmy działania cytokin na podwzgórze i przysadkę. W regulacji uwalniania CRF i ACTH wskazywano na udział katecholamin [7, 44] oraz na rolę prostaglandyn [6, 53]. Wydaje się jednak, że prostaglandyny pośredniczą we wpływie cytokin wyłącznie na podwzgórze, chociaż



Rys. 3. Wpływ cytokin na oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową

ACTH i prostaglandyny są równolegle obecne w przysadce [36]. W ciągu ostatnich lat starano się udowodnić zaangażowanie tlenku azotu (NO) w mechanizm wpływu interleukin na oś podwzgórzowo-przysadkową. Stwierdzono, że cytokiny aktywują mRNA dla syntazy tlenku azotu w miejscu powstawania CRF – jądrze przykomorowym i w innych częściach podwzgórza [3, 33, 51], a także w mysich komórkach nowotworowych przysadki (linia AtT-20). Powstający NO z kolei stymuluje uwalnianie CRF i ACTH [55].

Bezpośredni wpływ cytokin na nadnercza jest początkowo powolny – wymaga kilkunastogodzinnego okresu inkubacji i następuje przy udziale prostaglandyn i noradrenaliny [23, 81, 85]. Stwierdzono, iż bezpośrednie działanie cytokin na produkcję glikokortykoidów jest zależne od dawki i wiąże się z udziałem wewnątrz-nadnerczowego systemu CRF/ACTH (zdolność nadnerczy do uwalniania CRF i

białek pochodnych POMC w tym ACTH) [2]. Podobnie do innych gruczołów, nadnercza również mają zdolność produkcji cytokin. IL-1 i TNF- $\alpha$  znajdowano w komórkach chromochłonnych rdzenia i w korze gruczołu, natomiast synteza IL-6 w komórkach strefy kłębkowatej kory nadnerczy była stymulowana przez IL-1, ACTH oraz LPS [30, 32, 73].

Ważnymi substancjami sprawującymi kontrolę w odniesieniu do współzależności immunologiczno-endokrynowych są glikokortykoidy. Działając na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego wpływają one nie tylko na uwalnianie CRF i ACTH, lecz także na produkcję cytokin przez komórki mononuklearne. I tak, glikokortykoidy blokują syntezę IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$ , tym samym ograniczając ich wpływ na oś HPA [36]. Ponadto stymulują populację receptorów typu II dla IL-1. Wiązanie IL-1 z receptorami tej grupy nie prowadzi do przekazania sygnału pobudzenia, na co wskazują badania Akahoski i wsp. [1] oraz Re i wsp. [64]. Niezależnie od udziału glikokortykoidów w modulowaniu prezentowanych zależności, podkreśla się udział hormonu melanoforowego- $\alpha$ , który będąc ważnym czynnikiem przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym blokuje uwalnianie CRF indukowane przez IL-6 [42].

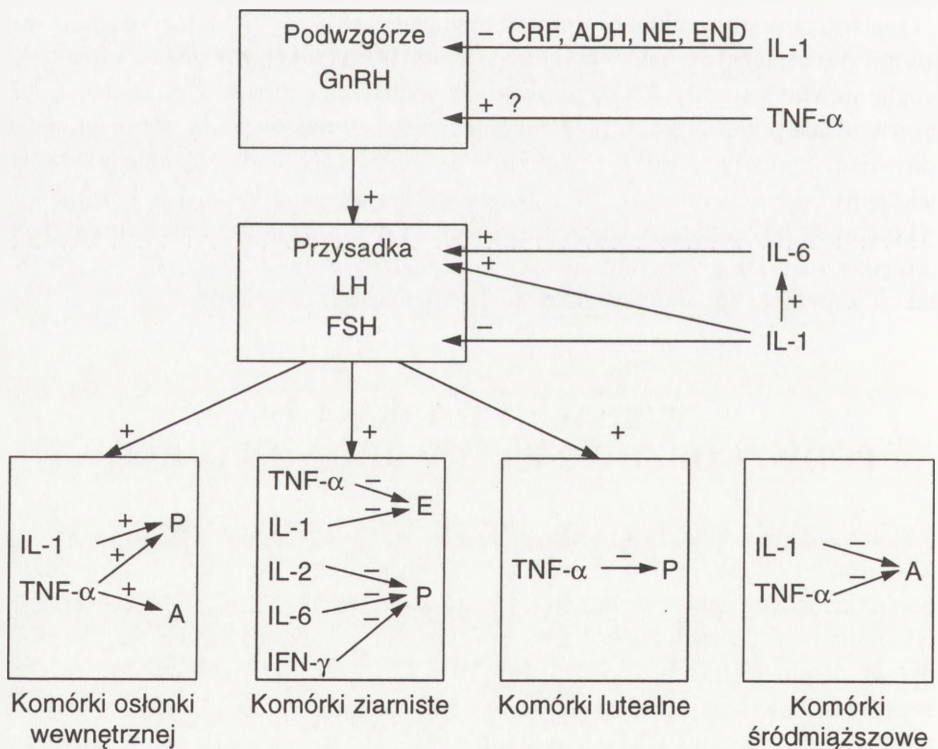
Omawiając wpływ układu immunologicznego na oś HPA należy podkreślić fizjologiczne następstwa, jakie wynikają z dwukierunkowych zależności między tymi układami. Munk i wsp. [47] sugerowali, że wzrastające poziomy glikokortykoidów obserwowane podczas ostrej fazy zapobiegają szerszeniu się stanu zapalnego i gorączkowego, a także pozwalają organizmowi zachować ścisłą kontrolę nad lokalnymi reakcjami odpornościowymi. Obserwacje tych zjawisk u ludzi, jak i wyniki prac wykonanych na szczurach wskazują, że każda dysfunkcja lub zniesienie połączeń pomiędzy osią HPA a systemem immunologicznym może prowadzić do rozwoju reakcji zapalnej, np. reumatoidalnego zapalenia stawów [23].

## WPLYW CYTOKIN NA OŚ PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWO-JAJNIKOWĄ

Stany zapalne narządu rodnego u loszek wywołane podawaniem patogennych kultur bakteryjnych [19] oraz domaciczne infuzje LPS u jałówek prowadzą do obniżenia lub zniesienia przedowulacyjnego wyrzutu LH [56, 57, 58]. Doświadczenia wykonane na szczurach sugerują, iż za obniżenie poziomu LH pod wpływem LPS odpowiedzialne są interleukiny, głównie IL-1. Może ona hamować uwalnianie GnRH bezpośrednio, wiążąc się ze swymi receptorami w podwzgórzu [34]) i/albo pośrednio przez wzrost poziomu CRF, a następnie ACTH, co prowadzi do podwyższenia steroidogenezy w nadnerczach [29]. Uwolniony tą drogą kortyzol tłumi przedowulacyjny wyrzut LH. Endogenne opiaty, wazopresyna argininowa, prostaglandyny

oraz noradrenalina mogą także pośredniczyć w hamującym wpływie IL-1 na sekrecję GnRH [11, 31, 34, 65, 70]. Niejasny pozostaje wpływ TNF- $\alpha$  na uwalnianie GnRH z podwzgórza. Według Mandrup-Poulsen i wsp. [43] jest on stymulujący. Główną cytokiną mającą bezpośredni stymulujący wpływ na produkcję LH jest IL-6 [76]. IL-1 działając pośrednio, poprzez tę interleukinę wywiera również pobudzający wpływ na syntezę LH. Nie określono jednoznacznie, czy IL-1 może hamować produkcję FSH [48] (rys. 4).

Na poziomie jajnika wpływ cytokin jest różny w zależności od typu i stopnia zróżnicowania komórek. Podkreśla się ich rolę w regulacji wzrostu i różnicowania się pęcherzyków jajnikowych, dojrzewaniu ciała żółtego i luteolizie. W komórkach osłonki wewnętrznej, komórkach ziarnistych i śródmiaższowych stwierdzono ekspresję mRNA dla licznych cytokin (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), receptorów dla IL-1 oraz antagonistów tego receptora [12, 28, 43, 80]. IL-1 pobudza sekrecję progesteronu z komórek osłonki wewnętrznej [50], podczas gdy TNF- $\alpha$  ma wpływ zarówno pobudzający [60], jak i hamujący [90]. Natomiast synteza androgenów jest pobudzana przez TNF- $\alpha$  w komórkach osłonki [43], a hamowana przez IL-1 i TNF- $\alpha$



Rys. 4. Wpływ cytokin na oś podwzgórzowo-przysadkowo-jajnikową: E – estrogeny, P – progestageny, A – androgeny

w komórkach śródmiąższowych. W komórkach ziarnistych zarówno IL-1, jak i TNF- $\alpha$  osłabiają stymulujący wpływ gonadotropin na produkcję steroidów płciowych. Odbywa się to prawdopodobnie przez hamowanie ekspresji receptorów LH oraz zakłócenie transdukcji sygnału LH na poziomie cAMP [25, 89]. Ponadto TNF- $\alpha$  hamuje syntezę estrogenów i współdziała z IL-1 w obniżeniu syntezy gestagenów. Badania nad syntezą progesteronu przez komórki ziarniste, pochodzące z małych pęcherzyków świń, wykazały ich podatność na supresyjne działanie IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ , podczas gdy komórki z dużych pęcherzyków były wrażliwe jedynie na IFN- $\gamma$  [43]. TNF- $\alpha$  sprzyja tworzeniu ciała żółtego przez podwyższenie proliferacji i steroidogenezy w komórkach ziarnistych i komórkach osłonki wewnętrznej ulegających luteinizacji. Natomiast działając na dojrzałe komórki lutealne oraz podczas luteolizy TNF- $\alpha$  hamuje uwalnianie gestagenów. Ponadto TNF- $\alpha$  we współdziałaniu z IFN- $\gamma$  wpływa cytotoksycznie na komórki lutealne z bydłych ciałek żółtych, co sugeruje ich istotną rolę w procesie luteolizy [5] (rys. 4). Hormony płciowe mają wpływ na sekrecję cytokin na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego, i tak: estrogeny hamują produkcję IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$  [62, 63, 78], progesteron – IL-2 [62], a androgeny działają supresyjnie na sekrecję IL-1 przez monocyty [43].

## WPLYW CYTOKINY NA OŚ PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWO-JĄDROWĄ

Wpływ cytokin na omawianą oś obejmuje szereg sygnałów pobudzających i hamujących zachodzących na wszystkich jej poziomach.

Komórki Sertoliego i Leydiga wykazują zdolność do syntezy IL-1 i TNF- $\alpha$  oraz mają specyficzne receptory dla cytokin [45, 46, 83]. TNF- $\alpha$  działając na komórki Sertoliego w sposób para- i endokrynowy blokuje stymulowaną gonadotropinami syntezę inhibiny. Tym samym obniża ujemne sprzężenie zwrotne tego czynnika na sekrecję FSH [46]. IL-1 i TNF- $\alpha$  hamują sekrecję testosteronu stymulowaną gonadotropinami w komórkach Leydiga w doświadczeniach *in vitro*, natomiast działanie IL-2 było zależne od obecności w medium CRF i IGF-1 [14, 40, 87]. Badania *in vivo*, w których szczurom podawano IL-1, dostarczyły odmiennych wyników; nie obserwowano w osoczu zmian stężenia LH, FSH i testosteronu [43].

Należy podkreślić, iż hamujące wpływy cytokin na steroidogenezę jajnikową i jądrową stymulowaną gonadotropinami mogłyby przyczyniać się do powstawania niepłodności, obserwowanej w stanach zapalnych narządu rodno. Jakkolwiek przypuszczenie to wymaga potwierdzenia.

## WPŁYW CYTOKIN NA SEKRECJĘ PROLAKTYNY (PRL)

Wyniki doświadczeń *in vitro* wskazują na hamujący wpływ IL-1 na sekrecję PRL. IL-1 stymuluje uwalnianie dopaminy z podwzgórza oraz hamuje sekrecję VIP i TSH, tj. czynników zaangażowanych w uwalnianie PRL [72]. Natomiast IL-6 wykazywała stymulujące działanie na sekrecję PRL ze szczurzych komórek przysadki [76, 88]. Z kolei w badaniach *in vivo* IL-1, TNF- $\alpha$  oraz IFN- $\gamma$  nieznacznie zwiększały stężenie PRL we krwi gryzoni [31, 70]. Niejasna pozostaje nadal rola cytokin w regulacji procesów pozostających pod kontrolą PRL, np: laktacji, obniżenia produkcji GnRH, steroidów płciowych oraz niepłodności. Prowadzone w ostatnich latach badania nad rolą endotoksyny *Escherichia coli* w etiopatogenezie bezmleczności poporodowej u loch wykazały, że IL-1 uczestniczy w hamującym wpływie endotoksyny na produkcję i uwalnianie PRL z przysadki [75].

## WPŁYW CYTOKIN NA SEKRECJĘ SOMATOTROPINY (GH)

Cytokiny, takie jak IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 działając na poziomie podwzgórza stymulują uwalnianie somatostatyny [69, 70]. Ponadto Scarborough i wsp. [69] oraz Koika i wsp. [38] stwierdzili, że IL-1 działając poprzez prostaglandyny pobudza w nieznacznym stopniu sekrecję GHRH. Z kolei GHRH stymuluje uwalnianie GH przy udziale IFN- $\gamma$  [31]. W warunkach *in vitro* bezpośredni stymulujący wpływ na uwalnianie hormonu wzrostu ma IL-6 [76], podczas gdy pobudzające bądź hamujące działanie IL-1 i TNF- $\alpha$  uzależnione jest od ilości tych interleukin w medium: duże dawki hamują zaś niskie pobudzają uwalnianie GH [52, 86]. W badaniach *in vivo* prowadzonych na szczurach wzrost poziomu GH obserwowano po zastosowaniu małych dawek IL-1 i TNF- $\alpha$ , zaś obniżenie po podaniu dużych ilości cytokin [41, 59]. Z kolei koncentracje GH nie były zmienione u ludzi z chorobą nowotworową, a podwyższone u pacjentów ze stanami zapalnymi lub eksperymentalnie wywołaną endotoksemią [70].

Przedstawione dane pozwalają przypuszczać, iż różnorodne stany stresowe, w tym długotrwałe infekcje, mogą być szczególnie niekorzystne dla somatycznego wzrostu młodych osobników.

## WPŁYW CYTOKIN NA SEKRECJĘ WAZOPRESYNY ARGININOWEJ (AVP) I OKSYTOCYNINY (OT)

Istnieją rozbieżne wyniki na temat bezpośredniego wpływu IL-1 na sekrecję AVP [31]. Interleukina ta działając poprzez NE lub angiotensynę II w badaniach *in vitro*, jak i podana dożylnie szczurom, prowadziła do wzrostu koncentracji AVP

[49]. Nie jest jeszcze określone znaczenie wzrastających pod wpływem cytokin poziomów AVP w procesach patologicznych. Sugeruje się udział tego hormonu w przywracaniu właściwego ciśnienia krwi obniżonego w następstwie septycznego szoku.

Stymulujący wpływ IL-1 na uwalnianie przysadkowej OT odbywa się także za pośrednictwem NE i angiotensyny II. Działanie IL-1 bezpośrednio pobudzające sekrecję OT wykazano w badaniach przeprowadzonych na izolowanych i elektrycznie stymulowanych szczurzych komórkach tylnej części przysadki mózgowej [16]. IL-1 podnosiła koncentrację OT w osoczu szczurów, czego nie obserwowano w przypadku IL-6 [49]. Nieznane pozostają również wpływy cytokin na procesy kontrolowane przez OT-osmoregulację, oddawanie mleka u laktujących samic, kurczliwość mięśniówki macicy przy zapładnianiu samic oraz w czasie porodu.

## PODSUMOWANIE

Podczas ostrej fazy odpowiedzi, krążące lub lokalnie produkowane cytokiny działając w sposób auto-, para- i endokrynowy wpływają na aktywność komórek wydzielniczych, zmieniając znacznie stężenie uwalnianych przez nie hormonów. Prozapalne cytokiny, głównie IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 aktywują oś HPA, stymulują produkcję AVP i OT oraz hamują sekrecję PRL i GH. Wywierają także kompleksowy wpływ na oś podwzgorze-przysadka-gonady. Długotrwały wzrost syntezy cytokin podczas ostrej fazy odpowiedzi może prowadzić do rozwoju różnych stanów patologicznych, np. niepłodności, zahamowania laktacji, opóźnienia wzrostu. Należałoby zatem dokładnie określić wpływ podwyższonych poziomów cytokin na przebieg procesów regulowanych przez dane hormony i neuropeptydy.

## LITERATURA

- [1] AKAHOSHI T, OPPENHEIM JJ, MATSUSHIMA K. Induction of high affinity interleukin 1 receptor on human peripheral blood lymphocytes by glucocorticoid hormones. *J Exp Med* 1988; **167**: 924–936.
- [2] ANDREIS PG, NERI G, BELLONI AS, MAZZOCCHI G, KASPRZAK A, NUSSDORFER GG. Interleukin-1 beta enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology* 1991; **129**: 53–56.
- [3] ARÉVALO R, SANCHEZ F, ALONSO JR, CARRETERO J, VAZQUEZ R, AIJON J. NADPH-diaphorase activity in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Brain Res Bull* 1992; **28**: 599–603.
- [4] BANKS WA, ORTIZ L, PLOTKIN SR, KASTIN AJ. Human interleukin-1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; **259**: 988–996.



- [5] BENYO DF, PATE JL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992; **130**: 854–860.
- [6] BERNARDINI R, CALOGERO AM, MAUCERI G, CHROUSOS GP. Rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion *in vitro* is stimulated by interleukin-1 in an eicosanoid-dependent manner. *Life Sci* 1990; **47**: 1601–1607.
- [7] BESEDOVSKY HO, DEL REY A. Immunoneuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Front Neuroendocrinol* 1992; **13**: 61–94.
- [8] BLALOCK JE. A molecular basis for bidirectional communications between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; **69**: 1–32.
- [9] BLALOCK JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994; **15**: 504–511.
- [10] BLATTEIS CM. Role of the OLVT in the response to circulating pyrogens. *Prog Brain Res* 1992; **91**: 409–412.
- [11] BONAVERA JJ, KALRA SP, KALRA PS. Evidence that luteinizing hormone suppression in response to inhibitory neuropeptides beta endorphin, interleukin-1 beta, and neuropeptide K may involve excitatory amino acids. *Endocrinology* 1993; **133**: 178–182.
- [12] BRANNSTROM M, NORMAN RJ. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Human Reprod* 1993; **8**: 1762–1775.
- [13] BREDER CD, DINARELLO CA, SAPIER CB. Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Sciences* 1988; **240**: 321–324.
- [14] CALKINS JH, SIGEL MM, NANKIN HR, LIN T. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Endocrinology* 1988; **123**: 1605–1610.
- [15] 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.
- [16] CHRISTENSEN JD, HANSEN EW, FJALLAND B. Influence of interleukin-1 $\beta$  on the secretion of oxytocin and vasopressin from the isolated rat neurohypophysis. *Pharmacol Toxicol* 1990; **67**: 81–83.
- [17] COCEANI F, LEES J, DINARELLO CA. Occurrence of interleukin-1 in cerebrospinal fluid of the conscious cat. *Brain Res* 1988; **446**: 245–250.
- [18] COULIE PG, CAYPHAS S, VINK A, KYTENHOVE C, VAN SNICK J. Interleukin 6-HP1-related hybridoma and plasmocytoma growth factors induced by lipopolysaccharide *in vivo*. *Eur J Immunol* 1987; **17**: 1217–1221.
- [19] DE WINTER PJJ, VERDONCK M, DE KRUIF A, DEVRISSE LA, FUKUOKA M, YASUDA K, TAI S, TAKAKURA K, MORI T. Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cell. *Endocrinology* 1989; **124**: 884–890.
- [20] DINARELLO CA. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N Engl J Med* 1984; **311**: 1413–1418.
- [21] FLAD HD, LOPPNOW H, RIETSCHER ET, ULMER AJ. Agonists and antagonists for lipopolysaccharide-induced cytokines. *Immunobiol* 1993; **187**: 303–316.
- [22] FONTANA A, KRISTENSEN F, DUBS R, GEMSA D, WEBER E. Production of prostaglandin E and interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cells. *J Immunol* 1982; **129**: 2413–2419.
- [23] GAILLARD RC. Neuroendocrine-immune system interactions. The immune-hypothalamo-pituitary adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 1994; **5**: 303–309.
- [24] GIULIAN D, BAKER TJ, SHIH LCN, LACHMAN LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by amoeboid microglia. *J Exp Med* 1986; **164**: 594–604.
- [25] GOTTSCHALL PE, KATSUURA G, HOFFMAN ST, ARIMURA A. Interleukin-1: an inhibitor of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat cell. *FASEB J* 1988; **2**: 92–96.
- [26] HAESEBROUCK. Endometritis and vaginal discharge in the sow. *Anim Reprod Sci* 1992; **28**: 51–58.

- [27] HAOUR FG, BAN EM, MILON GM, BARON D, FILLION GM. Brain interleukin-1 receptors: characterization and modulation after lipopolysaccharide injection. *Prog Neuroendocr Immunol* 1990; **3**: 196–204.
- [28] HURWITZ A, LEUKIDES J, RICCIARELLI E, BOTERO L, KATZ E, MCALLISTER JM, ET AL. Human intraovarian interleukin-1 (IL-1) system: highly compartmentalized and hormonally dependent regulation of the genes encoding IL-1, its receptor, and its receptor antagonist. *J Clin Invest* 1992; **89**: 1446–1754.
- [29] IMURA H, FUKATA J. Endocrine-paracrine interaction in communication between the immune and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammation. *Eur J Endocrinol* 1994; **130**: 32–37.
- [30] JÄÄTTELA M, ILVESMÄKI V, VOUTILAINEN R, STENMAN UH, SAKSELA E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotrophin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991; **128**: 623–629.
- [31] JONES TH, KENNEDY RI. Cytokines and hypothalamus-pituitary function. *Cytokine* 1993; **5**: 531–538.
- [32] JUDD AM, MACLEOD RM. Adrenocorticopropin increases interleukin-6 release from rat adrenal zona glomerulosa cells. *Endocrinology* 1992; **130**: 1245–1254.
- [33] KARANTH S, LYSON K, MCCANN SM. Role of nitric oxide in interleukin-2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **90**: 3383–3387.
- [34] KARLA PS, FUENTES M, SAHU A, KALRA SP. Endogenous opioid peptides mediate the interleukin-1-induced inhibition of the release of luteinizing hormone (LH)–releasing hormone and LH. *Endocrinology* 1990; **127**: 2381–2386.
- [35] KATSUURA G, ARIMURA A, KOVES K, GOTTSCHAL PE. Involvement of organum vasculosum of laminae terminalis and preoptic area in interleukin-1 beta-induced ACTH release. *Anim J Physiol* 1990; **258**: 162–171.
- [36] KEHRER P, TURNILL D, DAYER JM, MULLER AF, GAILLARD RC. Human recombinant interleukin-1 beta and alpha, but not recombinant tumor necrosis factor alpha, stimulate ACTH release from rat anterior pituitary cells *in vitro* in a prostaglandin E<sub>2</sub> and cAMP independent manner. *Neuroendocrinology* 1988; **48**: 160–166.
- [37] KOENIG JI. Presence of cytokines in the hypothalamic-pituitary axis. *Neuroendocr Immunol* 1991; **4**: 143–153.
- [38] KOIKA F, HURWITZ A, BEN-SHLOMO E, ADASHI EY, YANAGISHITA M. Receptor-mediated stimulatory effect of IL-1 on hyaluronic acid and proteoglycan biosynthesis by cultured rat ovarian cells: role for heterologous cell-cell interactions. *Endocrinology* 1993; **133**: 2391–2394.
- [39] LIBERMAN AP, PITHA MP, SHIN HS, SHIN ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocyte stimulated with lipopolysaccharide or neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 348–352.
- [40] LIN T, WANG D, NAGPAL ML, CHANG W, CALKINS JH. Down-regulation of Leydig cell insulin-like growth factor-1 gene expression by interleukin-1. *Endocrinology* 1992; **130**: 1217–1224.
- [41] LUMPKIN MD. Regulation of growth hormone and prolactin secretion by interleukin-1. [w] Genazzani Ar, Nappi G, Petraglia F, Martignoni E [red.] Stress and related disorders from adaptation to dysfunction. Parthenon, Park Ridge 1990: 17–30.
- [42] LYSON K, MCCANN SM. Alpha-melanocyte-stimulating hormone abolishes IL-1- and IL-6-induced corticotropin-releasing factor from the hypothalamus *in vitro*. *Neuroendocrinology* 1993; **58**: 191–195.

- [43] MANDRUP-POULSEN T, NERUP J, REIMERS JI, POCIOT F, ANDERSON HU, KARLSON A, BJERRE U, BERGHOLDT R. Cytokines and the endocrine system. I. The immunoen-docrine network. *Eur J Endocrinol* 1995; **133**: 660–671.
- [44] MATTA SG, SINGT J, NEWTON R, SHARP BM. The adrenocorticotropin response to interleukin-1 beta instilled into the rat median eminence depends on the local release of catecholamines. *Endocrinology* 1990; **127**: 2175–2182.
- [45] MAUDUIT C, HARTMANN DJ, CHAUVIN MA, REVOL A, MORERA AM, BENAHMED M. Tumor necrosis factor inhibits gonadotropin action in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Endocrinology* 1991; **129**: 2933–2940.
- [46] MAUDUIT C, JASPAR JM, PONCELET E, CHARLET C REVOL A, FRANCHIMONT P. ET AL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonizes follicle-stimulating hormone action in cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 1993; **133**: 69–76.
- [47] MUNK A, GUYRE PM, HOLBROOK NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984; **5**: 25–44.
- [48] MURATA T, YING SY. Effects of interleukin-1 beta on secretion of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) by cultured rat pituitary cells. *Life Sci* 1991; **49**: 447–453.
- [49] NAITO Y, FUKATA J, SHINDO K, EBISUI O, MURAKAMI N, TOMINAGA T. ET AL. Effects of interleukins on plasma arginine vasopressin and oxytocin levels in conscious, freely moving rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **174**: 1189–1195.
- [50] NAKAMURA Y, KATO H, TERANOVA PF. Interleukin-1 increases thecal progesterone production of preovulatory follicles in cyclic hamsters. *Biol Reprod* 1990; **43**: 169–173.
- [51] NAPPI RE, RIVEST S. Ovulatory cycle influences the stimulatory effect of stress on the expression of corticotropin-releasing factor receptor messenger ribonucleic acid in the paraven-tricular nucleus of the female rat hypothalamus. *Endocrinology* 1995; **136**: 4073–4084.
- [52] NASH AD, BRANDON MR, BELLO PA. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on growth hormone and interleukin 6 mRNA in ovine pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992; **84**: 31–37.
- [53] NAVARRA P, TSAGARAKIS S, FARIA MS, RESS LH, BESSER GM, GROSSMAN AB. Interleukin-1 and 6 stimulate the release of corticotropin-releasing hormone-41 from rat hypothalamus *in vitro* via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. *Endocrinology* 1990; **128**: 37–44.
- [54] OCHIMICHI M, HIROTA Y, KOIKE K ET AL. Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1992; **55**: 199–203.
- [55] OTHA K, HIRATA Y, IMAI T, MARUMO F. Interleukin-1 beta induces nitric oxide production by a mouse pituitary tumor cell line (AtT20/D16). *J Endocrinol* 1993; **138**: 429–435.
- [56] PETER AT, BOSU WTK, DEDECKER RJ. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of *Escherichia coli* endotoxin. *Am J Vet Res* 1989; **3**: 368–373.
- [57] PETER AT, SIMON JE, LUKER CW, BOSU WTK. Site of action for endotoxin-induced cortisol release in the suppression of preovulatory luteinizing hormone surges. *Theriogenology* 1990; **3**: 637–643.
- [58] PETER AT, MALVEN PV, SHAFTOE S, BOSU WTK. Quantification of circulating beta-endorphin and white blood cells in heifers after intrauterine administration of *Escherichia coli* endotoxin. *Theriogenology* 1991; **6**: 1009–1014.
- [59] PAYNE LC, OBAL JRF, OPP MR, KRUEGER JM. Stimulation and inhibition of growth hormone secretion by interleukin-1: the involvement of growth hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 1990; **56**: 193–200.
- [60] PAYNE LC, WEIGENT DA, BLALOCK JE. Induction of pituitary sensitivity to interleukin-1: a new function for corticotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **198**: 480–484.

- [61] PLATA-SALAMAN CR. Immunoregulations in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 1991; **15**: 185–215.
- [62] POLAN ML, LOUKIDES J, NELSON P, CARDING S, DIAMOND M, WALSH A, AT AL. Progesterone and estradiol modulate interleukin-1 messenger ribonucleic acid levels in cultured human peripheral monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**: 1200–1206.
- [63] POTTRATZ ST, BELLIDO T, MOCHARLA H, CRABB D, MONOLAGAS SC.  $17\beta$ -estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1994; **93**: 944–950.
- [64] RE F, MUZIO M, DE ROSSI N, POLENTARUTTI N, GIRI JG, MANTOVANI A, ET AL. The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med* 1994; **179**: 739–743.
- [65] RIVEST S, LEE S, ATTARDI R, RIVIER C. The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin- $1\beta$  alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect of LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. *Endocrinology* 1993; **133**: 2424–2430.
- [66] ROBY KF, TERRANOVA PF. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  *in vitro* on steroidogenesis of healthy and atretic follicles of the rat: theca as a target. *Endocrinology* 1990; **126**: 2711–2718.
- [67] SAPOLSKY R, RIVIER C, YAMAMOTO G, PLOTSKY P, VALE W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin releasing factor. *Sciences* 1987; **238**: 522–524.
- [68] SAPHIER D, OVADIA H. Selective facilitation of putative corticotropin-releasing factor-secreting neurons by interleukin-1. *Neurosci Lett* 1990; **114**: 283–288.
- [69] SCARBOROUGH DE, LEE SI, DINARELLO CA, REICHLIN S. Interleukin- $1\beta$  stimulates somatostatin biosynthesis in primary cultures of fetal rat brain. *Endocrinology* 1989; **124**: 549–551.
- [70] SCARBOROUGH DE. Cytokine modulation of pituitary hormone secretion. *Ann NY Acad Sci* 1990; **594**: 169–187.
- [71] SCARBOROUGH DE. Somatostatin regulation by cytokines. *Metabolism* 1990; **39**: 108–111.
- [72] SCHEITINI G, FLORIO T, MEUCCI O, LANDOLFI E, GRIMALDI M, LOMBARDI G. ET AL. Interleukin- $1\beta$  modulation of prolactin secretion from the rat anterior pituitary cells: Involvement of adenylate cyclase activity and calcium mobilization. *Endocrinology* 1990; **126**: 1435–1441.
- [73] SCHÖBITZ B, VAN DEN DOBBELSTEEN M, HOLSBOER F, SUTANTO S, DE KLOET ER. Regulation of interleukin-6 gene expression in the rat. *Endocrinology* 1993; **132**: 1569–1576.
- [74] SÉBIRE G, EMILIE D, WALLON C, HÉRY C, DEVERGANE O, DELFRAISSY JF, ET AL. *In vitro* production of IL-6, IL- $1\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  by human embryonic microglial and neural cells. *J Immunol* 1993; **150**: 1517–1523
- [75] SMITH BB, MARTINEAU G, BISAILLON A. Mammary glands and lactation problems. [w] Leman AD i wsp.[red.] Diseases of swine, Ames, Iowa State Univ. Press 1992: 40–59.
- [76] SPANGELO BL, JUDD AM, ISAKSON PC, MACLEOD RM. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release *in vitro*. *Endocrinology* 1989; **125**: 575–577.
- [77] SPANGELO BL, MACLEOD RM. The role of immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab* 1990; **1**: 408–412.
- [78] STOCK JL, CODERRE JA, MCDONALD B, ROSENWASSER LJ. Effects of estrogen *in vivo* and *in vitro* on spontaneous interleukin-1 release by monocytes from postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **68**: 364–368.
- [79] SUDA T, TOZAWA F, USHIYAMA T, SUMITOMO T, YAMADA M, DEMURA H. Interleukin-1 stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in rat hypothalamus. *Endocrinology* 1990; **126**: 1223–1228.

- [80] TERRANOVA PF, SANCHO-TELLO M, HUNTER VJ. Tumor necrosis factor-alpha and ovarian function. [w:] Adashi EY, Leung PCK [red.] *Comprehensive endocrinology: the ovary*. New York: Raven Press 1993: 393–394.
- [81] TOMINAGA T, FUKATA J, NAITO Y, USUI T, MURAKAMI N, FUKUSHIMA M. ET AL. Prostaglandin-dependent *in vitro* stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology* 1991; **128**: 526–531.
- [82] VIRKAMÄKI A, YKI-JÄRVINEN H. Role of prostaglandins in mediating alterations in glucose metabolism during acute endotoxemia in the rat. *Endocrinology* 1995; **136**: 1701–1706.
- [83] WANG D, NAGPAL ML, CALKINS JH, CHANG W, SIGEL MM, LIN T. Interleukin-1 $\beta$  induces interleukin-1 $\alpha$  messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* 1991; **129**: 2862–2866.
- [84] WEIGENT DA, BLABOLK JE. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev* 1987; **100**: 79–108.
- [85] WINTER JSD, GOW KW, PERRY YS, GREENBERG AH. A stimulatory effect of interleukin-1 on adrenocortical cortisol secretion mediated by prostaglandins. *Endocrinology* 1990; **127**: 1904–1909.
- [86] WOLTON PE, CRONIN MJ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits growth hormone secretion from cultured pituitary cells. *Endocrinology* 1989; **125**: 925–929.
- [87] XIONG Y, HALES DB. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993; **132**: 2438–2444.
- [88] YAMAGUCHI M, MATSUZAKI N, HIROTA K, MIYAKE A, TANIZAWA O. Interleukin 6 possibly induced interleukin 1 $\beta$  in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1990; **122**: 201–205.
- [89] YASUDA K, KUKUOKA M, FUJIWARA M, MORI T. Effects of interferon on the steroidogenic functions and proliferation of immature porcine granulosa cells in culture. *Biol Reprod* 1992; **47**: 931–936.
- [90] ZACHOW RJ, TASH JS, TERRANOVA PF. Tumor necrosis factor- $\alpha$  attenuation of luteinizing hormone-stimulated androstenedione production by ovarian theca-interstitial cells: inhibition at loci within the adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent signaling pathway. *Endocrinology* 1993; **133**: 2269–2276.

Redaktor prowadzący: Maciej Zabel

Otrzymano: 29.04.1996 r.

Przyjęto: 02.09.1996 r.

Adres autora: Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk, ul Prawocheńskiego 5, 10-718 Olsztyn 5.

## AKWAPORYNOWE KANAŁY WODNE KOMÓREK ZWIERZĘCYCH I ROŚLINNYCH\*

### AQUAPORIN WATER CHANNELS OF ANIMAL AND PLANT CELLS\*

ZYGMUNT HEJNOWICZ

Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski, Katowice

*Streszczenie:* Akwaporyny są integralnymi białkami błon plazmatycznych (rodziny MIP) tworzącymi kanały selektywne dla wody. Zostały zidentyfikowane za pomocą translacji ich mRNA w oocytach *Xenopus*. Występują obficie w błonach plazmatycznych wielu komórek zwierzęcych i roślinnych, u tych ostatnich również w tonoplaście. Odkrycie akwaporynowych kanałów wodnych zmienia poglądy na transport wody przez błony plazmatyczne.

*Słowa kluczowe:* akwaporyny, białka typu MIP, kanały wodne, komórki roślinne, komórki zwierzęce, plazmalema, tonoplast, transport wody.

*Summary.* Aquaporins form water-selective channels. Their molecular and functional identity has now been established by the cloning of the genes encoding them and by swelling assays with *Xenopus* oocytes injected with aquaporin mRNA. More than a dozen of aquaporin water channels in animals and plants are known. A new element is added to the mechanism of selective water permeability of aquaporin channels – the occurrence of water lining the channel leaving a lumen whose diameter is only slightly larger than that of water molecule.

*Key words:* aquaporin, MIP proteins, water channels, plant cells, animal cells, cell membrane, tonoplast, water transport.

## WSTĘP

Do niedawna sądzono, że transport wody do komórki lub z komórki dokonuje się na zasadzie dyfuzji przez dwuwarstwę lipidową [85] oraz kotransportu z innymi cząstkami przez specyficzne dla nich kanały [75, 87]. Wiadomo było, że szybkość i energia aktywacji przenikania wody przez błony plazmatyczne dla wielu komórek

\*Autor dziękuje Prof. dr A. Sieversowi (Uniwersytet Boński) za pomoc w zebraniu literatury do artykułu. – Dedicated to Andreas Sievers on the occasion of his retirement.

są podobne do szybkości i energii aktywacji przenikania wody ( $42\text{--}63 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ) przez sztuczne błony lipidowe. Stwierdzono jednak, że w przypadku niektórych komórek, szybkość przenikania wody w warunkach gradientu osmotycznego jest znacznie większa niż przez błony lipidowe [69, 80], a energia aktywacji ( $17 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ) jest podobna do energii dla auto-dyfuzji wody. Stwierdzono również, że zdolność do łatwego transportu wody przez błonę plazmatyczną jest hamowana odwracalnie przez związki rtęci [29, 46, 52, 54, 61, 86]. Wyciągnięto więc wniosek, że cząsteczki wody mogą przekraczać błonę plazmatyczną przenikając przez niektóre białka integralne błony, a w szczególności przez kanały dla jonów [18, 19, 43, 45]. Eksperymentalnie wyjaśniono, że woda może przechodzić przez błonę plazmatyczną nawet wbrew gradientowi potencjału wodnego, na zasadzie kotransportu z aktywnym transportem jonów [87]. Te miejsca błony, w których woda przenika inaczej niż na zasadzie dyfuzji przez dwuwarstwą lipidową, nazywano od dawna kanałami wodnymi (należałoby dodać – niespecyficznymi dla wody). Ze względu jednak na szczególne właściwości wody, o czym będzie mowa w dalszej części, nie spodziewano się istnienia kanałów selektywnych dla wody. Okazało się jednak, że takie kanały istnieją, a białka, które je tworzą, nazwano akwaporynami [artykuły przeglądowe 1, 2, 11, 12, 39]. Termin *akwaporyna* stanowi polski odpowiednik angielskiego *aquaporin*.

Akwaporyny należą do rodziny bardzo konserwatywnych polipeptydów błonowych podobnych do MIP (ang. *Major Intrinsic Protein*) wyizolowanego poraż pierwszy z soczewki oka ssaków, gdzie MIP stanowi 50% wszystkich białek błonowych. Wkrótce okazało się, że białka podobne do MIP występują w błonach plazmatycznych wszystkich komórek zwierząt, roślin oraz bakterii. Rodzina MIP obejmuje ponad 20 białek, a wiele z nich to akwaporyny.

## IDENTYFIKACJA AKWAPORYN JAKO SELEKTYWNYCH KANAŁÓW WODNYCH

Sytuacja przed trzema laty była następująca: z jednej strony dobrze znano szereg białek typu MIP, ich DNA i mRNA, z drugiej zaś wykazano, że błony niektórych typów komórek, jak np. erytrocytów lub epitelu proksymalnych kanalików nerkowych zawierających te białka, charakteryzuje przepływ wody o znacznie niższej energii aktywacji niż dla dyfuzji przez podwójną warstwę lipidową. Ten łatwiejszy przepływ ulegał odwracalnemu hamowaniu związkami rtęci (np. kwas p-chloro-rtęciowo-benzosulfonowy lub  $\text{HgCl}_2$ ) [29, 46, 52, 54, 61, 86]. Po zadziałaniu tymi związkami pozostawał tylko przepływ wody o cechach dyfuzji. Przypuszczano, że przynajmniej niektóre z białek typu MIP funkcjonują jako kanały wodne. Potwierdzenie tej hipotezy nie było jednak wtedy jeszcze możliwe. W 1992 r. do oocytów *Xenopus laevis* stanowiących modelowy obiekt dla badania translacji zaczęto wprowadzać mRNA

kodujące różne białka typu MIP [62]. Kontrolne oocyty przeniesione do roztworu hypotonicznego bardzo wolno powiększają objętość, z czego wynika, że ich błona cechuje się niską przepuszczalnością dla wody. Po ekspresji niektórych białek typu MIP w oocytach, (w tym CHIP28 z erytrocytów), przepuszczalność błony oocytów wzrastała wielokrotnie w ciągu kilku minut, co łatwo było zauważyć na podstawie szybkiego powiększania się ich objętości i pękania. Wzrost przepuszczalności błony komórkowej można było odwracalnie zahamować związkami rtęciowymi. W obecności chlorku rtęci (w koncentracji przyżyciowej  $<1$  mM) objętość oocytów, w których zachodziła biosynteza białka typu MIP, nie wzrastała szybciej niż w oocytach kontrolnych, ale przemycie oocytów roztworem merkaptoetanolu przywracało zdolność szybkiego pobierania wody. Wzrostowi przepuszczalności plazmalemy dla wody nie towarzyszył wzrost przepuszczalności dla innych substancji rozpuszczonych [4, 50, 62], z czego wyciągnięto wniosek, że chodzi o kanały selektywne dla wody.

Ujmując rzecz ściśle, eksperyment z oocytami wskazał jedynie na możliwość funkcjonowania w błonie komórkowej niektórych białek typu MIP jako selektywnych kanałów wodnych, ale nie wykazał, że tak jest. Sceptycy mogli podejrzewać, że chodzi nie o akwaporyny, ale o białka, które regulują istniejące w błonie kanały wodne. Potrzebne były dodatkowe eksperymenty. Jeszcze przed ekspresją białek rodziny MPI w oocytach wiadomo było, że w czasie eliminowania białek z błon erytrocytów najtrudniej usunąć CHIP28. Można było otrzymać pęcherzyki erytrocytów, w których 98% białek stanowił CHIP28. Doświadczenia z przenoszeniem takich pęcherzyków do środowiska hypotonicznego wykazały, że pęcherzyki bardzo szybko powiększają swoją objętość i pękają, z czego wynika, że charakteryzują się dużą przepuszczalnością dla wody [79]. Jeżeli jednak podziałano na nie chlorkiem rtęci, to ta duża przepuszczalność dla wody ulegała zahamowaniu. Wynika stąd, że CHIP28 jest selektywnym kanałem wodnym, a nie białkiem regulującym takie kanały. Przeprowadzono również eksperymenty z liposomami rekonstruowanymi w obecności pęcherzyków otrzymanych z rozbicia erytrocytów, z których usunięto białka błonowe z wyjątkiem CHIP28. Liposomy z wbudowanym CHIP28 charakteryzowały się 50-krotnie większą osmotyczną przepuszczalnością dla wody niż kontrolne [88]. Również oczyszczony CHIP28 wbudowany w dużej ilości w sztuczne błony lipidowe powodował ich dużą przepuszczalność osmotyczną dla wody [81].

Ekspresja w oocytach *Xenopus* wykazała akwaporynowe właściwości następujących białek rodziny MIP:

CHIP28 (akronim dla *channel forming integral protein*, 28 kDa) [62];

WCH-CD (akronim dla *water channel in the collecting duct of kidney*) [20];

TIP (akronim dla *tonoplast intrinsic protein*, białka izolowanego z *Arabidopsis thaliana* – modelowej rośliny dla biologii molekularnej roślin) [50];

RD28 (akronim dla integralnego białka plazmalemy *A. thaliana*) [13]; kilku plazmalemowych białek *A. thaliana* [36].



Samo MIP okazało się być akwaporyną. Wbudowane do sztucznej błony lipidowej powoduje wzrost elektrycznej przewodności błony [17], co kwalifikuje je do kanału jonowego. Jednak MIP tworzone w oocytach zwiększało silnie przepuszczalność błony dla wody bez zwiększania jej przewodności elektrycznej [55].

Niektóre białka rodziny MIP pełnią inne funkcje, np. białko (GlpF) przenosi glicerol u *E. coli*, inne występuje w koneksonie włókna soczewki oka, jeszcze inne to nodulina soi. Transporter glicerolu (GlpF) tworzony w oocytach nie powodował zdolności do szybkiego pęcznienia, co wskazuje, że nie jest on kanałem wodnym [51].

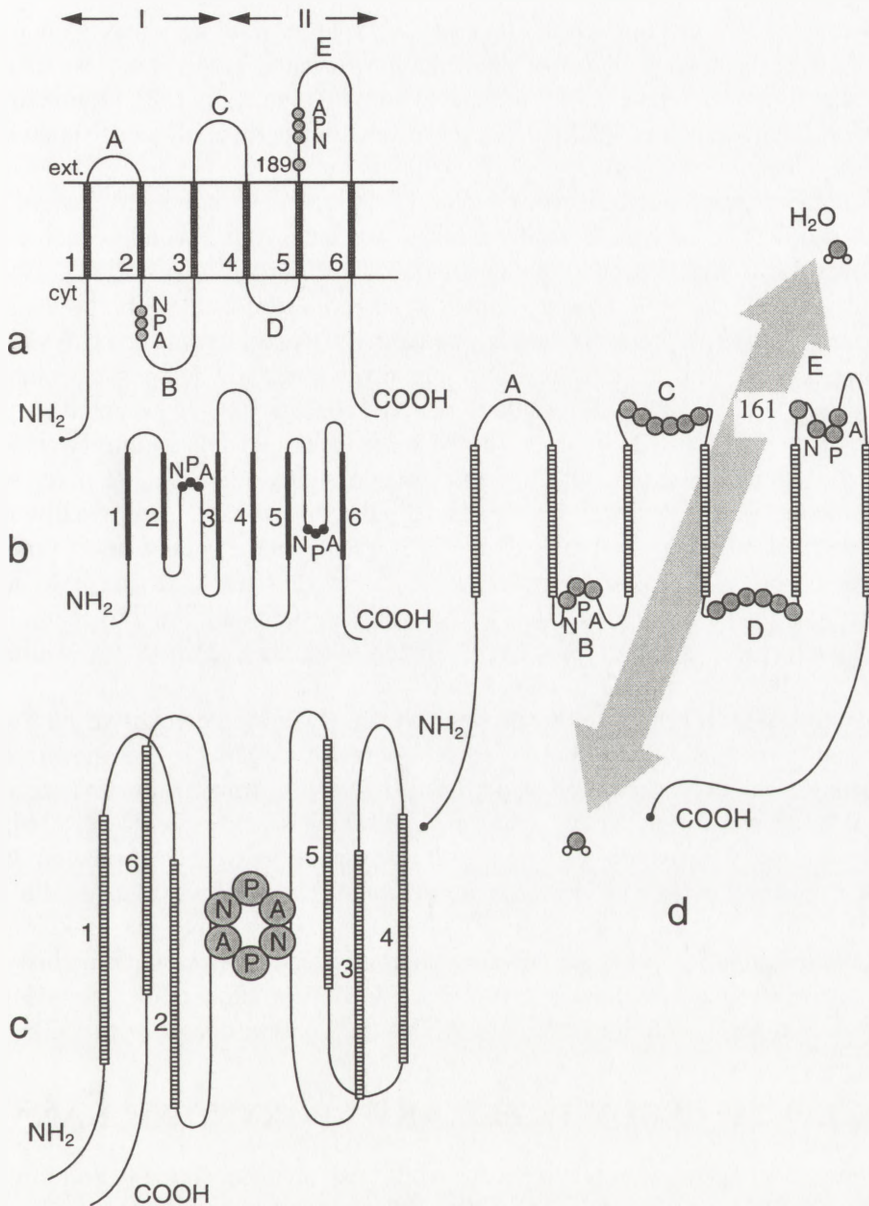
Liczba poznanych akwaporyn szybko rośnie. W 1994 r. przyjęto konwencję uproszczonego numerycznego nazewnictwa akwaporyn ssaków w formie skrótu AQP z dodatkiem numeru rezerwując zero dla MIP, jedynek dla CHIP28 oraz dwójkę dla WCH-CD (tab. 1). Należy zaznaczyć, że nazewnictwo akwaporyn roślinnych jest akronimowe.

TABELA 1. Akwaporyny ssaków

Nazwa numeryczna	Nazwa akronymowa	Występowanie
AQP1	CHIP28 i mutanty	eryocyty, nerka, splot naczyńwłokowy, oko, układ płciowy męski, wątroba, pęcherz moczowy, naczynia włosowate, żyłki
AQP2	WCH-CD, WCH2	nerkowe kanaliki zbiorcze (regulowane przez wazopresynę)
AQP3	AQP-CD (podobny do GLIP)	nerkowe kanaliki zbiorcze (GLIP funkcjonuje jako transporter)
AQP4	MIWC	mózg, rdzeń kręgowy, nerka, płuca (niewrażliwa na związki rtęci)
AQP5		gruczoły ślinowe i łzowe, płuca

## STRUKTURA MOLEKULARNA AKWAPORYN

28 kDa, łańcuch polipeptydu akwaporyny, zawiera ponad 260 reszt aminokwasowych tworzących 6 transbłonowych domen (rys. 1a). Łańcuch ten składa się z dwu podobnych do siebie połówek. Mają one po trzy przenikające przez błonę, ułożone w odwrotnych kierunkach domeny, dzięki czemu akwaporyna ma zbliżone właściwości po obu stronach błony. Domeny wewnątrz błony powiązane są pięcioma hydrofilnymi pętlami. Oba końce łańcucha znajdują się po stronie cytoplazmatycznej [6, 64]. We wszystkich akwaporynach w pętlach B i E każdej z połówek występuje trójka aminokwasów Asn- Pro-Ala (NPA). Pętla A i C znajdują się na powierzchni ekstracytozowej (zewnątrznej w przypadku błony komórkowej, ale wewnętrznej w przypadku pęcherzyków) [6, 65, 73]. W przypadku AQP1 pętla B i E uczestniczą w tworzeniu kanału wodnego. W związku z tym zaproponowano



**Rys. 1.** Struktura akwaporyn, zaznaczono: sześć domen (1–6) tkwiących w błonie, pięć hydrofilnych pętli (A–E), oba końce łańcucha, wewnętrzną (cyt) i zewnętrzną (ext) stronę błony, dwie połówki łańcucha (I i II), grupy NPA, cysteinę w położeniu 189 w AQP1 (a), względnie 181 w AQP2 (d); a – ogólna struktura na przykładzie AQP1 (specyfika AQP1 zaznaczona jedynie cysteiną wrażliwą na związki rtęci w pozycji 189); b – przejście od a do c pokazujące wpuklenie pętli B i E; c – model typu klepsydry; d – struktura AQP2 z zaznaczeniem udziału pętli C i D w tworzeniu kanału symbolizowanego obustronną strzałką (a–c na podstawie [2], d – na podstawie [6])

trójwymiarowy model typu klepsydry (rys. 1b), w którym sekwencje NPA w pętłach B i E tworzą pierścień otoczony domenami wewnątrzblonowymi. Jest to model dobrze ugruntowany badaniami z umiejscowionymi mutacjami [33]. Odmiennej model zaproponowano dla AQP2 [6], w którym również pętle C i D są ściśle związane z funkcją kanału wodnego (rys. 1c).

AQP1 tworzy homotetramery w błonie [72], ale każdy monomer zawiera jeden kanał wodny [78]. Badania krystalograficzne aktywnej AQP1 wbudowanej w błonę lipidową potwierdzają jego funkcjonowanie w formie tetramerów [81].

Jedną z cech akwaporynowego kanału wodnego jest uleganie zablokowaniu pod wpływem związków rtęci, na zasadzie reakcji wszystko albo nic [54]. Wykazano, że miejscem docelowego działania wspomnianych związków jest reszta cysteinowa (w pozycji 189 w przypadku AQP1, oraz w pozycji 181 w przypadku AQP2) w pętli E w pobliżu NPA (rys. 1). Ta reszta nie należy do ściśle konserwatywnych i nie występuje w obu połówkach. Substytucja cysteiny 189 w AQP1 przez serynę nie zmienia akwaporynowej właściwości białka, ale znosi jego wrażliwość na związki rtęci. Podobnie w przypadku AQP2, zastąpienie cysteiny przez inne aminokwasy w pozycji 181 znosi wrażliwość na związki rtęci. Można było jednak przywrócić częściowo tę wrażliwość podstawiając cysteinę w kilku innych miejscach [6]. Zastąpienie cysteiny 189 w AQP1 przez takie aminokwasy, jak walina lub tryptofan, unieczynnia AQP1 jako kanał wodny [63].

Spośród akwaporyn tworzonych w oocytach, dwie są niewrażliwe na związki rtęci: jedna roślinna RD28 [13] i jedna zwierzęca AQP4 [26], ponieważ RD28 nie ma cysteiny w pobliżu NPA w pętli E [90]. Należy jednak zauważyć, że AQP3 jest wrażliwa na związki rtęci, choć nie ma takiej reszty cysteinowej [16].

Mutacja ludzkiej AQP1, polegająca na zastąpieniu histydyny w pozycji 209 na alaninę, powoduje znaczne zmniejszenie przepuszczalności osmotycznej dla wody [4]. Punktowe mutacje ludzkiej AQP2 powodują, że przestaje ona funkcjonować jako kanał wodny i pojawia się poważna choroba nerek [14]. Zastąpienie histydyny w pozycji 201 przez prolinę w przypadku AQP4 powoduje zanik zdolności funkcjonowania tego białka jako kanału wodnego w teście oocytowym [32].

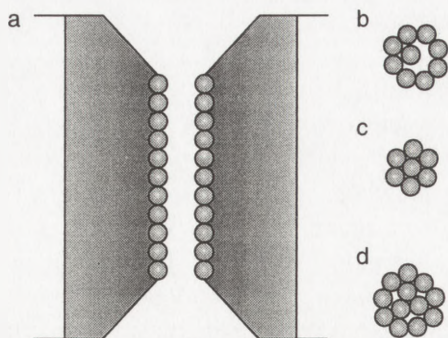
## **PRZEPIY WODY PRZEZ AKWAPORYNOWE KANAŁY**

Istnienie kanałów selektywnych dla wody jest obecnie dobrze ugruntowanym faktem. Stale jednak można spotkać się z dużymi wątpliwościami tych biofizyków, którzy dobrze znają właściwości wody, ale nie znają osiągnięć biologii molekularnej w zakresie akwaporyn. Należy wyjaśnić, skąd te wątpliwości się biorą i jak je można usunąć.

Cząsteczki wody są powiązane ze sobą wiązaniami wodorowymi. Przez podwójną warstwę lipidową błony mogą przedrzeć się tylko te, które w drganiach termicznych nabyły dostatecznie dużo energii kinetycznej, aby wyrwać się spomiędzy innych

cząsteczek wody i przebić się przez tę fizyczną barierę. Energia aktywacji dla przepływu wody przez akwaporynę jest podobna do energii aktywacji autodyfuzji wody. Wskazuje to, że cząsteczki wody przechodzą przez kanał akwaporyny wysłany wodą. Wątpliwości co do istnienia kanałów selektywnych dla wody pojawiają się właśnie w związku z występowaniem warstwy cząsteczek wody wyścielającej kanał, bowiem musi to być warstwa nieruchoma. Cząsteczki wody położone bliżej osi kanału muszą oddziaływać z tą warstwą wiązaniami wodorowymi, to zaś musi mieć wpływ na szybkość ich przesuwania się w gradiencie ciśnienia hydrostatycznego (gradient taki może być generowany osmotycznie wg modelu Vegard-Mauro dla osmozy [18]). Dopiero przy odpowiednio dużej średnicy kanału, maksymalna prędkość cząsteczek wody (na osi kanału) może osiągać wartość umożliwiającą dostatecznie szybki przepływ wody. Szerokie kanały nie mogą być jednak selektywne dla wody. Małe cząsteczki wody mogą przenikać przez białka, które funkcjonują jako kanały, transportery albo pompy dla innych większych cząsteczek. Stąd też wydawało się, że nie jest możliwe istnienie selektywnych kanałów wodnych, możliwe jest jednak istnienie niespecyficznych kanałów wodnych.

Rozważmy model kanału wyścielonego wodą (rys. 2) taki, że średnica  $D_k$  jego wolnej części otoczonej nieruchomą wyściółką wodną (którą to część dalej będziemy nazywali kanalikiem), spełnia nierówność  $D_w < D_k < 2 D_w$ , gdzie  $D_w$  jest średnicą  $H_2O$ . W kanaliku znajduje się jeden szereg cząsteczek wody, o średnicy mniejszej od jego światła. Z faktu, że cząsteczki wody ( $D_w = 2,8 \times 10^{-10}$  m) przechodzą, natomiast cząsteczki mocznika ( $D = 4 \times 10^{-10}$  m) nie przechodzą przez akwaporyny wynika:  $2,8 \times 10^{-10}$  m  $< D_k < 4 \times 10^{-10}$  m [45]. Cząsteczki wody znajdujące się w kanaliku, mając dostatecznie dużo w nim miejsca mogą stale zmieniać wiązania wodorowe z cząsteczkami wody wyścielającymi kanalik i być dzięki temu bardzo ruchliwe. Gdy istnieje różnica potencjału wodnego po obu stronach błony, te ruchliwe cząsteczki wody mogą się szybko przesuwać, jedna za drugą, wzdłuż kanalika zgodnie z gradientem potencjału, dając szybki przepływ wody. Nie jest to jednak przepływ lepki – spełniający równanie Poiseuille'go. Można przewidzieć, że zarówno zmniejszenie kanalika (poniżej  $D_w$ ), jak i zwiększenie (do ok.  $2D_w$ ) spowoduje wzrost oporu dla przepływu wody przez błonę; w pierwszym przypadku kanał zostaje zamknięty, w drugim przypadku zostaje zatknięty przez drugą warstwę (szereg) gęsto ułożonych cząsteczek wody. Z porównania przepuszczalności błony mającej akwaporynowe kanały w warunkach bez gradientu osmotycznego i z gradientem wynika, że 5–11 cząsteczek wody przenika jedna za drugą przez kanalik, z czego wnioskujemy, że długość kanalika jest ponad 5 razy większa niż jego średnica [54, 87]. Wspomniany warunek  $D_w < D_k < 2D_w$  musi być spełniony wzdłuż całego kanalika. Na tym właśnie polega unikalność selektywnych kanałów wodnych. Teorię transportu przez kanały tak wąskie, że dwie cząsteczki wody nie mogą przezeń przejść jedna obok drugiej, podali Levit [41], Moura i inni [54].



Rys. 2. Schemat akwaporynowego kanału wodnego wyścielonego związaną wodą; a – na przekroju poprzecznym przez błonę, a osiowym przez kanał; b–d na przekroju stykającym do powierzchni błony, a poprzecznym do kanału; b – w przypadku gdy kanał spełnia warunek  $D_w < D_k < 2 D_w$ , (patrz tekst); c – w przypadku  $D_k = D_w$ , d – w przypadku  $D_k = 2 D_w$

Teoria ta nie uwzględnia jednak efektów wynikających z wiązań wodorowych między cząsteczkami wody.

Jest sprawą interesującą, że transporter mocznika nie przewodzi wody [59]. Być może, jest to związane z niewielkim powiększeniem średnicy kanalika powodującym jego zapychanie się wodą, choć taka możliwość nie była dotychczas rozważana w piśmiennictwie. Prawdopodobnie, na tej samej podstawie należy szukać wyjaśnienia kontrowersyjnej różnicy między właściwościami AQP3 i GLIP, które mają podobną sekwencję aminokwasów, a jednak AQP3 jest akwaporyną z niewielką przepuszczalnością dla mocznika i glicerolu [16, 31], zaś GLIP jest transporterem glicerolu (występującym w nerce szczura) nie przepuszczalnym dla wody [44].

Nasuwa się pytanie, dlaczego akwaporyny nie przenoszą protonu, który w roztworze występuje jako jon hydroniowy ( $H_3O^+$ ), o rozmiarach tylko nieco większych niż  $H_2O$ ? Należy wziąć pod uwagę to, że obdarzona ładunkiem cząsteczka  $H_3O^+$  oddziałuje znacznie silniej z nieruchomą warstwą wody w kanale.

Ostatnie badania wskazały, że AQP1 i AQP2 są w pewnym stopniu przepuszczalne dla glicerolu choć nie są przepuszczalne dla mocznika [3, 4]. Warto w związku z tym faktem wziąć pod uwagę, że skoro  $D_w < D_k < 2D_w$ , to średnica całego kanału akwaporynowego (łącznie z wyściółką wodną) jest dostatecznie duża, aby przeprowadzić glicerol.

## ROZMIESZCZENIE I FUNKCJA AKWAPORYN U ZWIERZĄT

### AQP1

Występuje stale w nerce, a mianowicie w proksymalnej części nefronu i w zstępującym odcinku cienkiego ramienia pętli Henlego. Nabłonek tych części jest wysoce przepuszczalny dla wody. Wiadomo, że przez korę nerki przepływa duża objętość filtratu na jednostkę czasu oraz że ponad 85% tej objętości jest w nefronie reabsorbowane jako czysta woda. W komórkach nabłonka AQP1 występuje zarówno w luminalnej, jak i bazolateralnej części błony komórkowej (czyli po bokach i

w tyle względem światła kanalika), dostarczając kanałów dla readsorbcji wody i zagęszczania filtratu w wymienionej części nefronu [56, 69]. AQP1 należy do raczej rzadkich białek, które w transporcie wewnątrzkomórkowym trafiają do wszystkich części błony komórkowej, niezależnie od polarności komórki. Tak zachowuje się AQP1 w nabłonkach zarówno w nerce, jak i poza nią (z nielicznymi wyjątkami) [9]. AQP1 nie występuje jednak w cienkich i grubych odcinkach wstępujących ramion pętli Henlego oraz w nerkowych kanalikach zbiorczych. Jej obecność stwierdzono w naczyniach włosowatych tętniczo-tętnicznych i tętniczo-żylnych nerki [69].

AQP1 występuje obficie w innych typach nabłonka i śródbłonka ssaków, gdzie pełni główną rolę w przepuszczalności błon plazmatycznych dla wody, a mianowicie:

- i. w splocie naczyniówkowym ośrodkowego układu nerwowego [25, 57];
- ii. w błonach komórek bezokienkowych śródbłonka naczyń włosowatych, ale nie występuje w komórkach okienkowych [56];
- iii. w nabłonku tylnym rogówki i przednim soczewki, nabłonku ciała rzęskowego i tęczówki, czyli w warstwach regulujących uwodnienie (od której zależy przezroczystość) rogówki i soczewki, ale nie występuje we włóknach soczewki [74];
- iv. w cholangiocytach (wyspecjalizowanych hepatocytach zawierających między sobą kanalik żółciowy) zrazika wątroby i w pęcherzyku żółciowym [65], ale nie w zwykłych hepatocytach [91];
- v. w ściankach naczyń włosowatych, żyłek i włosowatych naczyń limfatycznych, gdzie reguluje płyn międzykomórkowy (interstycjalny). Płyn ten opuszcza naczynia w części proksymalnej sieci wskutek ciśnienia hydrostatycznego i jest na powrót wciągany osmotycznie do sieci w części dystalnej [57];
- vi. w naczyniach włosowatych kontaktujących się z oskrzelikami i pęcherzykami płucnymi [25, 57] oraz w endotelium płucnym [70];
- vii. w mezenchymie otaczającej rozwijającą się kość [7];
- viii. w przewodzie najądrza [8].

Matrycowy RNA (mRNA) kodujący AQP1 znaleziono w różnych tkankach wysoce przepuszczalnych dla wody [7, 24].

Należy zaznaczyć jednak, że AQP1 nie występuje we wszystkich epitelach przepuszczalnych dla wody, np. nie występuje w nabłonku jelita, w ścianie żołądka, w gruczołach łzowych i ślinowych i w strukturach regulujących osmotyczne ciśnienie w mózgu [57]. Zamiast AQP1 występują tam inne akwaporyny albo mniej specyficzne kanały wodne.

W epitelu pęcherza moczowego żaby, charakteryzującego się dużą przenikalnością dla wody, stwierdzono występowanie białka reagującego z poliklonalnymi przeciwciałami dla AQP1 z erytrocytów człowieka [10]. Nie stwierdzono różnic między pęcherzami kontrolnymi i traktowanymi wazopresyną, z czego wynika, że AQP1-podobne białko występuje stale w pęcherzu i nie jest włączane do błony w antydiuretycznej reakcji.

Jedyny dostrzeżony dotąd przypadek regulacji fizjologicznej AQP1 (w komórkach z ekspresją tej akwaporyny) dotyczy angiotensyny II (peptyd silnie podnoszący ciśnienie krwi). Wpływa ona na poziom AQP1 i jego mRNA w kulturze transformowanych komórek z proksymalnych kanalików nefronu [34].

### AQP2

Jest to główna akwaporyna nerki regulowana wazopresyną (antydiuretyczny hormon) o dużym znaczeniu dla równowagi wodnej w organizmie. Jej fizjologiczne znaczenie przejawia się choćby w schorzeniu *nephrogenic diabetes insipidus* powodowanym mutacją AQP2 dającą niewłaściwą strukturę drugorzędową białka [14, 80] lub indukowanym litem [49]. Występuje w nerce w cienkich i grubych odcinkach wstępujących ramion pętli Henlego oraz w nerkowych kanalikach zbiorczych [20, 31, 39, 57]. W kanalikach niepobudzonych wazopresyną, AQP2 występuje stale w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach komórek nabłonka [58], ale brak jej w błonie komórkowej tych komórek. Przepuszczalność nabłonka takich kanalików dla wody jest mała, mimo że przepuszczalność bazolateralnych części błony komórek nabłonka jest wysoka ze względu na występowanie w tych częściach AQP3 (patrz niżej).

Wazopresyna stymuluje egzocytozalne wbudowywanie pęcherzyków zawierających AQP2 do błony luminalnej, zwiększając przepuszczalność nabłonka dla wody [58]. Ponieważ stymuluje ona również endocytozę, istnieje dynamiczny stan błony luminalnej ze względu na zawartość AQP2 [23, 38]. Wazopresyna działa za pośrednictwem kinaz zależnych od cyklicznego AMP stymulując egzocytozę i w konsekwencji endocytozę. Stymuluje fosforylację AQP2 choć proces ten w izolowanych pęcherzykach nie zmienia ich przepuszczalności dla wody [2, 37, 40].

### AQP3 i AQP4

AQP3 jest w pewnym stopniu przepuszczalna dla mocznika i glicerolu, nie jest to więc kanał całkiem selektywny dla wody [16, 31]. AQP4 jest akwaporyną niewrażliwą na związki rtęci [26]. Obie akwaporyny są stałymi składnikami bazolateralnej części błony w nerkowych kanalikach zbiorczych, ale brak ich w błonie luminalnej [31]. AQP3 występuje również poza nerką, a mianowicie w okrężnicy, płucach, wątrobie, trzustce, śledzionie i prostaty [31]. AQP4 najobficiej występuje w mózgu (w różnych jego częściach) i rdzeniu i jak się wydaje, pełni ważną rolę w regulacji osmotycznej płynu mózgowo-rdzeniowego [32]. Akwaporyna podobna

do AQP4 z mózgu szczura występuje w żołądku człowieka w komórkach nabłonka wydzielających protony i pepsynogen [53].

## AQP5

cDNA dla AQP5 sklonowano z gruczołów ślinowych szczura. Jego mRNA znaleziono w gruczołach ślinowych i łzowych, w nabłonku rogówki i w płucach [65]. Sekwencja aminokwasowa AQP5 wskazuje na dość duże różnice w porównaniu z AQP1 i AQP3 oraz na znaczne podobieństwo do AQP2. W obu akwaporynach, w pętli D znajduje się miejsce ulegające fosforylacji pod wpływem c-AMP kinazy. Ponieważ wydzielanie śliny i łez jest regulowane przez autonomiczny system nerwowy, nasuwa się przypuszczenie, że AQP5 jest regulowana hormonalnie z udziałem układu cAMP [65]. Przypuszcza się, że AQP5 jest antygenem w auto-immunologicznej destrukcji gruczołów ślinowych i łzowych w chorobie polegającej na upośledzeniu wydzielania śliny i łez [65].

## ROZMIESZCZENIE I FUNKCJA AKWAPORYN ROŚLINNYCH

Jak już wspomiano, akwaporyny roślinne występują zarówno w plazmalemie, jak i tonoplastcie. Tonoplastowe białko  $\gamma$ -TIP z *Arabidopsis thaliana* udało się odtworzyć w oocytach i w ten sposób zidentyfikować jako akwaporynę [50]. Wcześniej wiadomo było, że  $\gamma$ -TIP występuje we wszystkich komórkach siewki *A. thaliana* [30]. Dokładniejsze badania, w których gen dla  $\gamma$ -TIP połączono z markerowym genem  $\beta$ -glikuronidazy [42] (w celu wykorzystania barwnych reakcji dla tego enzymu) wykazały, że  $\gamma$ -TIP ulega szczególnie intensywnej ekspresji w komórkach strefy elongacyjnej korzenia, w wydłużającym się hypokotylu siewki oraz w miększu protoksylemowym łodygi i ogonków liściowych. Jego ekspresji nie stwierdzono w merystemach oraz w dojrzałych liścieniach *A. thaliana*. Na tej podstawie wnioskuje się, że tworzenie  $\gamma$ -TIP jest skorelowane ze wzrostem objętości wakuol komórek.

Homologiem  $\gamma$ -TIP, ale występującym w plazmalemie *A. thaliana*, jest RD28. Ekspresja tego białka w oocytach *Xenopus* wykazała jego akwaporynowy charakter [13]. Jak już wspomniano, RD28 jest niewrażliwe na związki ręciowe i nie ma cysteiny w pobliżu motywu NPA w pętli E. Przy pomocy przeciwciał stwierdzono, że RD28 występuje we wszystkich organach *A. thaliana* z wyjątkiem nasion [13]. Wcześniejsze badania nad mRNA dla RD28 [90] wskazywały, że transkrypcja tego RNA zachodzi intensywnie w roślinach *A. thaliana* poddanych stresowi wodnemu, ale jest niezauważalna w roślinach nie poddanych temu stresowi. Badania Danielsa i innych [13] wykazały jednak obfite występowanie RD28 również w plazmalemie roślin nie poddanych stresowi wodnemu. Prawdopodobnie RD28 ma długi okres trwania i może się nagromadzać w błonach, a różnice w wynikach spowodowane były różnym wiekiem fizjologicznym badanych roślin.



U roślin woda przepływa przez błony plazmatyczne (plazmalemę i tonoplast), głównie w transporcie symplastowo-transkomórkowym do i od ksylemu w korzeniach i liściach [68]. Dzięki występowaniu RD28 w plazmalemie oraz TIP w tonoplastach komórek miękiszowych transport wody może dokonywać się znacznie sprawniej.

Na podstawie sekwencji aminokwasów na obu końcach wyróżniono dwie grupy akwaporyn *A. thaliana* PIP1 i PIP2 [36]. Kammerloher i inni [36] sklonowali cDNA z korzeni *A. thaliana* dla trzech genów PIP1 i dwóch PIP2, a następnie dokonali ich ekspresji w komórkach ssaków. Stosując selekcję immunologiczną stwierdzili, że białka PIP1 występują wyłącznie w plazmalemie, gdzie stanowią około 1% białka, zaś PIP2 głównie w plazmalemie. Metodą wstrzykiwania mRNA do oocytów *Xenopus* wykazali akwaporynowy charakter tych białek. Jedno z białek PIP1 jest identyczne z białkiem *A. thaliana* tworzonym przez gen *AthH2*, który jest uruchamiany w czasie indukcji kwitnienia wywoływanej niebieskim światłem. Białko *AthH2*, występuje szczególnie obficie w wydłużających się i różnicujących się komórkach korzenia, pochwy wiązkowej, nitki pręcikowej i łuszczyzny oraz w dojrzałych komórkach szparkowych [35]. Występowanie tego białka jest więc podobne do występowania  $\gamma$ -TIP, z którym *AthH2* wykazuje wysoki stopień homologii.

Stosując przeciwciała znakowane złotem stwierdzono, że akwaporyny PIP1 zlokalizowane są w plazmalemie komórek mezofilu *A. thaliana*. Szczególnie gęste znakowanie znaleziono w plazmalemasomach, które są sfałdowanymi wypustkami plazmalemy skierowanymi do wnętrza komórki [67]. Odkrycie to wskazuje, że plazmalemasomy nie są artefaktami (jak podejrzewano) i objaśnia funkcję tych subkomórkowych struktur.

Białka homologiczne do PIP1 funkcjonujące jako akwaporyny opisano w tytoniu [60] oraz u *Mesembryanthemum* [89].

Wprawdzie plazmalemowa akwaporyna *A. thaliana* nie jest wrażliwa na związki rtęciowe, to jednak plazmalemowa akwaporyna *Chara* (nie badana za pomocą ekspresji w oocytach) jest na nie wrażliwa. U *Chara* 3/4 strumienia wody płynie przez kanały wodne, a tylko 1/4 przechodzi dyfuzyjnie przez błonę [28]. Podobnie wygląda sytuacja w miękiszu hypokotylu słonecznika, gdzie osmotycznie wymuszany szybki przepływ wody przez plazmalemę i tonoplast przejawia się w łatwo mierzalnej, szybkiej zmianie długości segmentu hypokotyła pozbawionego epidermy [27]. Ten szybki przepływ wody jest wrażliwy na  $HgCl_2$ . Hamujące działanie tego związku można znieść przy pomocy merkaptoetanolu, ale tylko wtedy, gdy plazmalema po zablokowaniu kanałów nie uległa wcześniej turgorowemu przyciśnięciu do ściany komórkowej. Przyciśnięcie zmienia konformację zablokowanego rtęcią kanału powodując nieodwracalność zahamowania [27].

Znaczenie akwaporyn w komórkach roślinnych polega na tym, że:

1) zmniejszają opory dla transportu wody drogą, na której woda przekracza błony, a jest to istotna droga w przypadku korzeni i liści [5, 12, 68, 76];

2) transportowi wody przez błony nie towarzyszy kotransport cząsteczek rozpuszczonych w wodzie, co zmienia dotychczasowe modele transportu przez błony komórkowe u roślin [28, 76].

Przewidując udział akwaporyn w symplastowo-transkomórkowym transporcie wody w związku z jej pobieraniem przez korzenie, badano wpływ  $\text{HgCl}_2$  na przepuszczalność hydrauliczną ( $L_p$ ) systemu korzeniowego pomidora [47]. Dodatek  $\text{HgCl}_2$  do pożywki (w koncentracji 0,5 mM) powodował gwałtowny spadek szybkości przepływu wody przez system korzeniowy oraz spadek  $L_p$  bez zmiany szybkości pobierania jonów potasu. Taki wpływ  $\text{HgCl}_2$  wskazuje na udział akwaporyn w pobieraniu wody przez korzenie. Można przypuszczać, że akwaporyny stanowią główny filtr oczyszczający wodę z substancji znajdujących się w roztworze, z którym kontaktuje się korzeń. Łatwo również domyślać się, że taki łatwo przenikliwy filtr jest szczególnie ważny w procesie odwrotnej osmozy zachodzącej w czasie intensywnej transpiracji, zwłaszcza u namorzynów (mangrove), których korzenie kontaktują się z silnie zasoloną wodą.

Nie wiadomo, czy u roślin działają mechanizmy regulacji przepływu wody przez akwaporyny działające na innej zasadzie niż regulacja ilości akwaporyn (ekspresja odpowiednich genów i wycofywanie istniejących akwaporyn). Istnieją prace wskazujące, że przepuszczalność błon plazmatycznych komórek roślinnych może się zmieniać odwracalnie pod wpływem różnych czynników, takich jak: tlen, dwutlenek węgla, azydek, chloroform [21, 22], kwas abscysynowy [48 i literatura tam cytowana] oraz szereg innych czynników chemicznych [77 i literatura tam cytowana]. Należy mieć jednak na uwadze, że:

(i) w przepuszczalności błon dla wody mogą odgrywać rolę nie tylko specyficzne kanały utworzone z akwaporyn, ale również mniej specyficzne kanały;

(ii) pomiary przepuszczalności błon dla wody mogą być obciążone błędem wynikającym z wpływu badanych czynników na właściwości ściany komórkowej.

Interpretacja wyników przedstawionych we wspomnianych pracach nie jest więc prosta; niekoniecznie świadczą one o regulacji kanałów wodnych, nawet tych niespecyficznych.

Wayne i Tazawa [83, 84] stwierdzili, że przewodnictwo wodne komórek międzywęzli *Nitellopsis* maleje w odwracalny sposób pod wpływem kwasu p-chloro-ręciowofenylsulfonowego oraz cytochalazyn. Wpływ związku ręci może wskazywać, że w grę wchodzi akwaporyny, podczas gdy wpływ cytochalazyny można by interpretować na zasadzie jakiegoś oddziaływania mikrofilamentów aktynowych na akwaporyny. Badania własne autora nie potwierdziły tego przypuszczenia w przypadku miększu hypokotylu słonecznika (dane nie publikowane).

## LITERATURA

- [1] AGRE P, SASAKI S, CHRISPPEELS MJ. Aquaporins: A family of water channel proteins. *Am J Physiol* 1993; **265**: F461.
- [2] AGRE P, BROWN D, NIELSEN S. Aquaporin water channels: unanswered questions and unresolved controversies. *Cur Opin Cell Biol* 1995; **7**: 472–483.
- [3] ABRAMI L, TACNET F, RIPOCHE P. Evidence for a glycerol pathway through aquaporin 1 (CHIP28) channels. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 1995; **430**: 447–458.
- [4] ABRAMI L, BERTHONAUD V, DEEN PMT, ROUSSELET G, TACNET F, RIPOCHE P. Glycerol permeability of mutant aquaporin 1 and other AQP-MIP proteins: inhibition studies. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 1996; **431**: 408–414
- [5] BACIC G, RATKOVIC S. NMR studies of radial exchange and distribution of water in maize roots: the relevance of modelling of exchange kinetics. *J Exp Bot* 1987; **38**: 1284–1297.
- (6) BAILQ, FUSHIMI K, SASAKI S, MARUMO F. Structure of aquaporin-2 vasopresin water channel. *J Biol Chem* 1996; **96**: 5171–5176.
- [7] BONDY C, CHIN E, SMITH BI, PRESTON GM, AGRE P. Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water-channel protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4500–4504.
- [8] BROWN D, VERBAVATZ JM, VALENTI B, LUI B, SABOLIC I. Localization of the CHIP28 water channels in reabsorptive segments of the rat male reproductive ducts. *Eur J Cell Biol* 1993; **61**: 264–273.
- [9] BROWN D, KATSURA T, KAWASHIMA M, VERKMAN AS, SABOLIC I. Cellular distribution of the aquaporins: a family of water channel proteins. *Histochem Cell Biol* 1995; **104**: 1–9.
- [10] CALAMITA G, GRAZIA MOLA M, GOUNON P, JOUVE M, BOURGUET J, SVELTO M. Aquaporin-CHIP-related protein in frog urinary bladder: localization by confocal microscopy. *J Mem Biol* 1995; **143**: 267–271.
- [11] CHRISPPEELS MJ, AGRE P. Aquaporins: water channel protein of plants and animal cells. *TIBS* 1994; **105**: 421–425.
- [12] CHRISPPEELS MJ, MAUREL. Aquaporins: the molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiol* 1994; **105**: 9–13.
- [13] DANIELS MJ, MIRKOV TE, CHRISPPEELS MJ. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiol* 1994; **106**: 1325–1333.
- [14] DEEN PMT, VERDIJK MAJ, KNOERS NVAM, WIERINGA B, MONNENS LAH, VAN OS CH, VAN OOST BA. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopresin-dependent concentration of urine. *Science* 1994; **264**: 92–95.
- [15] ECHEVARRIA M, FRINDT G, PRESTON GM. Expression of multiple water channel activities in *Xenopus* oocytes injected with mRNA from rat kidney. *J Gen Physiol* 1993; **101**: 827–841.
- [16] ECHEVARRIA M, WINDHAGER EE, TATE SS, FRINDT G. Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting ducts of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10997–11001.
- [17] EHRINGGR, ZAMPHIGI GA, HONWITZ J, NOK D, HALL JE. Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes. *J Gen Physiol* 1990; **96**: 631–664.
- [18] FINKELSTEIN A. Water movement through lipid bilayers, pores, and plasma membranes. Theory and reality. (w) Distinguished Lecture. Series of the Society of General Physiologists. New York, John & Sons Wiley, 1987: 1–228.

- [19] FISHBARG J, KUANG K, VERA JC, ARANT S, SILVERSTEIN SC, LOIKE J, ROSEN OM. Glucose transporter serve as water channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3244–3247.
- [20] FUSHIMI K, UTCHIDA S, HARA Y, HIRATA Y, MARUMO F, SASAKI S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 1993; **361**: 549–552.
- [21] GLINKA Z, REINHOLD L. Rapid changes in permeability of cell membranes to water brought about by carbon dioxide and oxygen. *Plant Physiol* 1962; **37**: 481–486.
- [22] GLINKA Z, REINHOLD L. Reversible changes in the hydraulic permeability of plant cell membranes. *Plant Physiol* 1964; **39**: 1043–1050.
- [23] HARRIS HW, ZEIDEL ML, JO IH, HAMMOND TG. Characterization of purified endosomes containing the antidiuretic hormone-sensitive water channel from rat renal papilla. *J Biol Chem* 1994; **269**: 11993–12000.
- [24] HASEGAVA H, ZHANG R, DOHRMAN A, VERKMAN AS. Tissue-specific expression of mRNA encoding rat kidney water channel CHIP28 by *in situ* hybridization. *Am J Physiol* 1993; **264**: C237–C245.
- [25] HASEGAVA H, LIAN SC, FINKBEINER WE, VERKMAN AS. Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by *in situ* hybridization and antibody staining. *Am J Physiol* 1994a; **266**: C893–903.
- [26] HASEGAVA H, MA T, SKACH W, MATTHAY MA, VERKMAN AS. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem* 1994b; **269**: 5492–5500.
- [27] HEJNOWICZ Z, SIEVERS A. Reversible closure of water channels in parenchymatic cells of sunflower hypocotyl depends on turgor status of the cells. *J Plant Physiol* 1996; **147**: 516–520.
- [28] HENZLER T, STEUDLE E. Reversible closing of water channels in *Chara* internodes provides evidence for a composite transport model of the plasma membrane. *J Exp Bot* 1995; **46**: 199–209.
- [29] HOCH BS, GOFRIEN PC, LINZER D, FUSCO MJ, LEVINE SD. Mercurial reagents inhibit flow through ADH-induced water channels in toad bladder. *Am J Physiol* 1989; **256**: F948–F953.
- [30] HOFTE H, HUBBARD L, REIZER J, LUDEVID D, HERMAN EM, CHRISPPEELS MJ. Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 1992; **99**: 561–570.
- [31] ISHIBASHI K, SASAKI S, FUSHIMI K, UCHIDA S, KUVAHARA M, SAITO H, FERUKAVA T, NAKAJIMA K, YAMAGUCHI Y, GOJOBORI T, MANUMO F. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 6269–6273.
- [32] JUNG JS, BHAT RV, PRESTON GM, GUGGINO WB, BARABAN, JM, AGRE P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994a; **91**: 13052–13056.
- [33] JUNG JS, PRESTON GM, SMITH BL, GUGGINO WB, AGRE P. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP: the hourglass model. *J Biol Chem* 1994b; **269**: 14648–14654.
- [34] JUNG FF, TANG S-S, SABOLIC I, VERBAVATZ J-M, DIAMANT D, BROWN D, INGELFINGER R. Angiotensin II (ANGII) upregulates CHOP28 expression in immortalized, transformed rat proximal tubule cells (RPTC). *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**: 274a.
- [35] KALDENHOFF R, KOLLING A, MEYERS J, KARMANN U, RUPPEL G, RICHTER G. The blue light-responsive *AthH2* gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J* 1995; **7**: 87–95.

- [36] KAMMERLOHER W, FISHER U, PIECHOTTKA GP, SCHAFFNERN AR. Water channel in the plasma membrane cloned by immunoselection from a mammalian expression system. *Plant J* 1994; **6**: 187–199.
- [37] KATSURA T, VERBAVATZ J-M, FARINAS J, MA T, AUSIELLO DA, VERKMAN AS, BROWN D. Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK<sub>1</sub> epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7212–7216.
- [38] KATSURA T, AUSIELLO DA, BROWN D. Direct demonstration of aquaporin-2 water channel recycling in stably transfected LLC-PK<sub>1</sub> epithelial cells. *Amer J Physiol-Renal Fl Elect* 1996; **39**: F548–554.
- [39] KNEPPER MA. The aquaporin family of molecular water channels. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1994; **91**: 6255–6258.
- [40] LANDE MB, JO I, ZEIDEL ML, SOMERS M, HARRIS HW. Phosphorylation of aquaporin-2 does not alter the membrane water permeability of rat papillary water-channel-containing vesicles. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5552–5558.
- [41] LEVIT DG. A new theory of transport for cell membrane pores. I. General theory and application to red cell. *Biochim Biophys Acta* 1974; **373**: 115–131.
- [42] LUDEVID D, HOFTE H, HIMELBLAU E, CHRISPEELS MJ. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein  $\gamma$ -TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiol*. 1992; **100**: 1633–1639.
- [43] LÜTTGE U, HIGINBOTHAM N. Transport in Plants. Heidelberg, Springer-Verlag 1979; (patz str.) 101–102.
- [44] MA T, FRIGERI A, HASEGAWA H, VERKMAN AS. Cloning of a water channel homolog expressed in brain meningeal cells and kidney collecting duct that functions as a stilbene sensitive glycerol transporter. *J Biol Chem* 1994; **269**: 21845–21849.
- [45] MACEY R.I. Transport of water and urea in red blood cells. *Am J Physiol* 1984; **246**: C195–203.
- [46] MACEY RI, FARMER REL. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 1970; **221**: 104–106.
- [47] MAGGIO A, JOLY RJ. Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems. *Plant Physiol* 1995; **109**: 331–335.
- [48] MARKHART AH, FISCUS EL, NAYLOR AW, KRAMER PJ. Effect of abscisic acid on root hydraulic conductivity. *Plant Physiol* 1979; **64**: 611–614.
- [49] MARPLES D, CHRISTENSEN S, CHRISTENSEN EI, NIELSEN S. Lithium-induced down regulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1838–1845.
- [50] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER JI, CHRISPEELS M. The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 1993; **12**: 2241–2247.
- [51] MAUREL C, REIZER J, SCHROEDER JI, CHRISPEELS M, SAIER MH JR. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator GlpF in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1994; **269**: 11869–11872.
- [52] MEYER MM, VERKMAN AS. Evidence for water-channels in renal proximal tubule cell membranes. *J Membr Biol* 1987; **96**: 107–119.
- [53] MISAKA T, ABE K, IWABUCHI K, KUSAKABE Y, ICHINOSE K, MIKI K, EMORI Y, ARAI S. A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secretory cells of human stomach. *FEBS Letter* 1996; **381**: 208–213.
- [54] MOURA TF, MACEY RI, CHIEN DY, KARAN D, SANTOS H. Thermodynamics of all-or-none water channel closure in red cells. *J Mem Biol* 1984; **81**: 105–111.
- [55] MULDER SM, PRESTON GM, DEEN PMT, GUGGINO WB, VAN OS CH, AGRE P. Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *J Biol Chem* 1995; **270**: 9010–9016.

- [56] NIELSEN S, SMITH BL, CHRISTENSEN EI, KNEPPER MA, AGRE P. CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 1993a; **120**: 371–383.
- [57] NIELSEN S, SMITH BL, CHRISTENSEN EI, AGRE P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and absorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993b; **90**: 7275–7279.
- [58] NIELSEN S, CHOU C-L, MARPLES D, CHRISTENSEN ER, KISHORE BK, KNEPPER MA. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1013–1017.
- [59] OLIVES B, NEAU P, BAILLY P, HEGIGER MA, ROUSSELET G, CARTRON JP, RIPOCHE P. Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 31649–31652.
- [60] OPPERMAN CH, TAYLOR CG, CONKLING MA. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. *Science* 1994; **263**: 221–223.
- [61] PRATZ J, RIPOCHE P, CORMAN B. Evidence for proteic water pathways in the luminal membrane of kidney proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1986; **856**: 259–266.
- [62] PRESTON GM, CARROLL TP, GUGGINO WB, AGRE P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 1992; **256**: 385–387.
- [63] PRESTON GM, JUNG JS, GUGGINO WB, AGRE P. The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem* 1993; **268**: 17–20.
- [64] PRESTON GM, JUNG JS, GUGGINO WB, AGRE P. Membrane topology of aquaporin CHIP. Analysis of functional epitope-scanning mutants by vectorial proteolysis. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1668–1673.
- [65] RAINA S, PRESTON GM, GUGGINO WB, AGRE P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1908–1912.
- [66] ROBERTS SK, YANO M, UENO Y, PHAM L, ALPINI G, AGRE P, LARUSSO NF. Cholangiocytes express the aquaporin CHIP and transport water via a channel-mediated mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 13009–13013.
- [67] ROMBERGER JA, HEJNOWICZ Z, HILL JF. Plant Structure: Function and Development. Berlin-Budapest, Springer-Verlag 1993.
- [68] ROBINSON DG, SIEBER H, KAMMERLOHER W, SCHAFFNER AR. PIP1 aquaporins are concentrated in plasmalemmasomes of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *Plant Physiol* 1996; **111**: 645–649.
- [69] SABOLICI I, VALENTI G, VERBAVATZ JM, VAN HOEK AN, VERKMAN AS, AUSIELLO DA, BROWN D. Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney. *Am J Physiol* 1992; **263**: C1225–1233.
- [70] SCHNITZER JE, OH P. Aquaporin -1 in plasma membrane and caveolae provides mercury-sensitive water channels across lung endothelium. *Am J Physiol- Heart Circ Phy* 1996; **39**: H416–420.
- [71] SIDEL VW, SOLOMON AK. Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *J Gen Physiol* 1957; **41**: 243–257.
- [72] SMITH BL, AGRE P. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J Biol Chem* 1991; **266**: 6407–6415.
- [73] SMITH BL, PRESTON GM, SPRING FA, ANSTEE DJ, AGRE P. Human red cell aquaporin CHIP: 1. Molecular characterization of ABH and Colton blood group antigens. *J Clin Invest* 1994; **94**: 1043–1049.
- [74] STAMER WD, SNYDER RW, SMITH BL, AGRE P, REGAN JW. Localization of aquaporin CHIP in the human eye: implications in the pathogenesis of glaucoma and other disorders of ocular fluid balance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; **35**: 3867–3872.

- [75] STEUDLE E. Water transport across roots. W: Structure and Function of Roots, F. Baluska i in. (red) 1995; 197–208.
- [76] STEUDLE E, HENZLER T. Water channels in plants: do basic concepts of water transport change? *J Exp Bot* 1995; **46**: 1067–1076.
- [77] STUART DM. Reduction of water permeability in potato tuber slices by cyanide, ammonia, 2,4-dinitrophenol, and oligomycin and cytidine 5-triphosphate. *Plant Physiol* 1973; **51**: 485–488.
- [78] VAN HOEK AN, HOM ML, LUTHIENS LH, DE JONG MD, DEMPSTER JA, VAN OS CH. Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation. *J Cell Biol* 1991; **266**: 16633–16635.
- [79] VAN HOEK AN, VERKMAN AS. Functional reconstitution of the isolated erythrocyte water channel CHIP28. *J Biol Chem* 1992; **267**: 18267–18269.
- [80] VAN-LIEBURG AF, VERDIJK MA, KNOERS VV, VAN-ESSEN AJ, OROESMANS W, MALLMANN R, MONNENS LA, VAN OOS BA, VAN OS CH, DEEN PM. Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin-2 water channel gene. *Am J Hum Genet* 1994; **55**: 648–652.
- [81] WALZ T, SMITH BL, ZEIDEL ML, ENGEL A, AGRE P. Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1583–1586.
- [82] WARTIOVAARA V, COLLANDER T. Permeabilitätstheorien. Protoplasmatologia Vol. II C8d., Wien, Springer Verlag, 1960.
- [83] WAYNE R, TAZAWA M. The actin cytoskeleton and polar water permeability in characean cells. *Protoplasma* 1988; Suppl. **2**: 116–130.
- [84] WAYNE R, TAZAWA M. Nature of water channels in the internodal cells of *Nitellopsis*. *J Mem Biol* 1990; **116**: 31–39.
- [85] WIŚNIEWSKA A, SUCZYŃSKI WK. Bariera hydrofobowa błon lipidowych. Wpływ cholesterolu i nienasyconych łańcuchów alkilowych lipidów na transport cząsteczek polarnych. *Post Biol Kom* 1995; **22**: 59–72.
- [86] WITTEMBURY G, CARPI-MEDINA P, GONZALES E, LINARES H. Effect of para-chloro-mercuribenzenesulphonic acids and temperature on cell water osmotic permeability of proximal straight tubules. *Biochim Biophys Acta* 1984; **775**: 365–373.
- [87] ZEUTHEN T. Molecular mechanisms for passive and active transport of water. *Intern Rev Cytol* 1995; **160**: 99–161.
- [88] ZEIDEL ML, AMBUDKAR SV, SMITH BL, AGRE P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 1992; **31**: 7436–7440.
- [89] YAMADA S, KATSUHARA M, KELLY WB, MICHALOWSKI CB, BOHNERT HJ. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 1995; **7**: 1129–1142.
- [90] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, KOIZUMI M, URAO S, SHINOZAKI K. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane-channel protein. *Plant Cell Physiol* 1992; **33**: 217–224.
- [91] YANO M, MARINELLI RA, ROBERTS SK, BALAN V, PHAM L, TARARAS JE, DE GROEN PC, LARUSSO NF. Rat hepatocytes transport water mainly via non-channel-mediated pathway. *J Biol Chem* 1996; **271**: 6702–6707.

Redaktor prowadzący: Maria Olszewska

Otrzymano: 27.05.1996 r.

Przyjęto: 22.07.1996 r.

Adres autora: Katedra Biofizyki i Biologii Komórki, Uniwersytet Śląski,  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice.

## NOWE ZASTOSOWANIA PEPTYDOWYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH

### NEW APPLICATIONS OF PEPTIDE NUCLEIC ACIDS

Cezary ŻEKANOWSKI

Zakład Genetyki Instytutu Matki i Dziecka

*Streszczenie:* Peptydowe kwasy nukleinowe (PNA) są nową grupą analogów DNA, zbudowanych z achiralnych i nienaładowanych podjednostek N-(2-aminoetylo)glicynowych. PNA hybrydują wydajnie z komplementarnymi kwasami nukleinowymi, hamując *in vitro* transkrypcję i translację. PNA są odporne na działanie proteaz i nukleaz obecnych w osoczu i wyciągach komórkowych. PNA znajdują coraz szersze zastosowanie w badaniach podstawowych, diagnostyce medycznej oraz stymulują rozważania ewolucyjne.

*Słowa kluczowe:* analogi DNA, peptydowe kwasy nukleinowe (PNA), związki antisensowne.

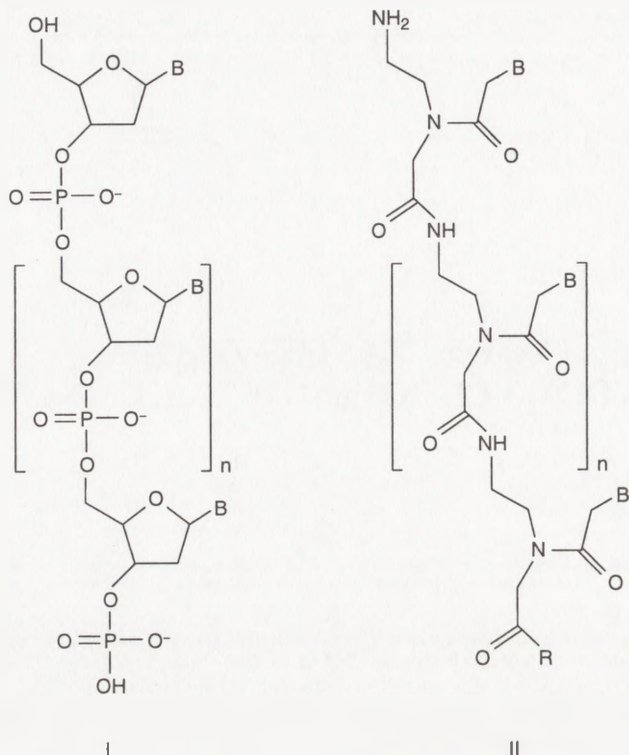
*Summary:* Peptide nucleic acids (PNAs) are novel DNA mimics with the pseudopeptide backbone composed of achiral and uncharged N-(2-aminoethyl)glycine units. PNAs hybridize with complementary nucleic acids with high affinity and could block transcription or translation *in vitro*. They are resistant to proteases and nuclease attack in serum and cellular extracts. PNAs are used in basic research, medical diagnostics and could stimulate evolutionary considerations.

*Key words:* DNA analogs, peptide nucleic acids, PNAs, antisense agents.

## PEPTYDOWE KWASY NUKLEINOWE DOBRZE NAŚLADUJĄ STRUKTURĘ I WŁAŚCIWOŚCI DNA

Wraz z pierwszymi doniesieniami o zastosowaniu oligonukleotydów, jako czynników specyficznie blokujących ekspresję genów, rozpoczęto projektowanie analogów DNA. Celem było otrzymanie pochodnych, które miałyby korzystniejsze niż naturalny DNA właściwości. Idealna cząsteczka antisensowna, zachowując ła-





Rys. 1. Porównanie struktury DNA (I) i PNA (II). Najprostsze PNA składają się z jednostek N-(2-aminoetylo)glicynowych, połączonych wiązaniami amidowymi. Zasady azotowe (B) przyłączone są do rdzenia cząsteczki łącznikami metylenokarbonyłowymi. Na końcach cząsteczki PNA (N i C) znajdować się mogą różne ligandy (np. R). W obu łańcuchach zaznaczono jednostkę podstawową. Nazwa "peptydowe kwasy nukleinowe" jest z chemicznego punktu widzenia myląca. Podkreśla jednak fakt, iż do ich syntezy wykorzystuje się techniki stosowane w syntezie peptydów, a PNA są bliskimi analogami funkcjonalnymi i strukturalnymi kwasów nukleinowych

twość hybrydyzowania z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych, powinna być jednocześnie oporna na działanie nukleaz oraz powinna łatwo przenikać przez błony biologiczne [1, 36, 37, 42].

Możliwe modyfikacje chemicznej struktury kwasów nukleinowych obejmują zmiany zasady azotowej, cukru lub wiązania fosfodiesterowego. W ciągu ostatnich 20 lat zaprojektowano szereg pochodnych, naśladowujących, z różnym skutkiem, strukturalne i funkcjonalne własności DNA [6, 25].

Od paru lat duże nadzieje wiąże się z analogami, w których zastąpiono cały rdzeń fosfocukrowy, zachowując zasady azotowe. Najbardziej obiecującą grupą tych analogów są peptydowe kwasy nukleinowe (PNA). Mają one achiralny, pozbawiony ładunku rdzeń, zbudowany najczęściej z podjednostek N-(2-aminoetylo)glicynowych, połączonych wiązaniami amidowymi. Do rdzenia przyłączone są,

np. poprzez łączniki octanowe, naturalne zasady azotowe. Polarność cząsteczki PNA określa się tak, jak polarność peptydu (koniec N i C). Do końca N dołączona bywa zwykle lizyna, zwiększająca rozpuszczalność w roztworach wodnych [7, 26, 44].

PNA dobrze naśladuje strukturalne i funkcjonalne własności DNA. Stała asocjacji PNA, w przeliczeniu na parę zasad, z komplementarnymi sekwencjami DNA lub RNA jest wyższa niż wszystkich znanych analogów DNA. W fizjologicznych siłach jonowych dupleksy PNA:DNA, w porównaniu z dupleksami DNA:DNA, wykazują stabilność termiczną wyższą o około 1,5°C w przeliczeniu na parę zasad. Różnica ta wynika przede wszystkim z obojętnego charakteru amidowego rdzenia PNA, wykluczającego elektrostatyczne oddziaływania z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi w komplementarnej nici DNA [27].

Duża stabilność termiczna dupleksów PNA:DNA jest zasadniczo niezależna od siły jonowej roztworu. Możliwa jest więc hybrydyzacja oligomeru PNA z dwuniciowym DNA w niskiej sile jonowej, sprzyjającej rozplataniu się helisy DNA. Zmniejszenie stabilności termicznej nie w pełni sparowanych dupleksów PNA:DNA jest również większe niż dla odpowiadających im dupleksów DNA:DNA [2, 27].

Synteza oligomerów PNA, ze względu na achiralność monomerów, jest łatwiejsza niż naturalnych oligonukleotydów. Proces, przebiegający w fazie stałej, oparty jest na metodzie syntezy peptydów według Merrifielda [27].

Podstawową strukturę PNA można modyfikować, zmieniając np. jednostkę podstawową lub odległość pomiędzy rdzeniem i zasadami azotowymi. Peptydowe kwasy nukleinowe syntezowano np. z jednostek serynowych, alaninowych, opartych na kwasie aminopentanowym czy aminoheksanowym [18, 19, 25]. Do obu końców łatwo przyłączać ligandy, co nie zmniejsza zdolności PNA do hybrydyzacji. PNA są odporne na działanie nukleaz i proteaz *in vitro*, jak również są stabilne w ekstraktach komórkowych i płynach ustrojowych [7, 18, 22].

Wszystkie te cechy sprawiły, że PNA są obecnie najdokładniej badanymi analogami DNA [45].

## ZWIĄZKI ANTYSSENSOWNE I PRZECIWGENOWE WIĄŻĄ SIĘ W RÓŻNY SPOSÓB Z SEKWENCJAMI KOMPLEMENTARNYMI

Zasada działania cząsteczek antysensownych wydaje się prosta. Antysensem może być naturalny oligonukleotyd lub jego zmodyfikowana pochodna, o sekwencji komplementarnej do mRNA genu, którego ekspresję chcemy ograniczyć. Inaktywacja polega najczęściej na bezpośrednim zablokowaniu translacji lub na wywołaniu degradacji mRNA przez RNazę H. Aktywność RNazy H wywołują jednak jedynie

analogi przypominające strukturę chemiczną DNA, np. analogi tiofosforanowe [1, 6, 38].

Sekwencją docelową cząsteczki antysensownej może być również dwuniciowy, genomowy DNA. Wiązanie takiego "przeciwgenowego" oligonukleotydu lub jego analogu następować może przez tworzenie potrójnej helisy lub przez inwazję łańcucha. W pierwszym przypadku przyłączenie pojedynczej, antysensownej nici, następuje przez wiązania Hoogsteena do motywu homopurynowego lub homopirymidynowego w DNA. PNA wiąże się natomiast z dwuniciowym DNA przez inwazję łańcucha, tworząc odporne termicznie struktury trójniciowe (PNA<sub>2</sub>:DNA). Podobne struktury tworzone są również z RNA [9,17].

Bardzo dużą stabilność tripleksów PNA<sub>2</sub>:DNA i PNA<sub>2</sub>:RNA tłumaczy się tym, że ich struktura utrzymywana jest zarówno klasycznymi wiązaniami wodorowymi (Watsona-Cricka), jak wiązaniami Hoogsteena i oddziaływaniami van der Waalsa [12, 15].

Ze względu na wiązania Hoogsteena, tworzone z drugą nicią PNA, ograniczenia dotyczące sekwencji oligonukleotydów PNA są podobne, jak dla oligonukleotydów tworzących potrójne helisy. Możliwe jest jednak powstawanie struktury PNA<sub>2</sub>:DNA z sekwencjami DNA o mieszanym składzie nukleotydowym. Jedna z nici PNA rozpoznaje wtedy sekwencję docelową na zasadzie klasycznego parowania zasad. Druga, choć bez pełnej komplementarności, stabilizuje strukturę trójniciową wiązaniami Hoogsteena. Struktura przestrzenna helisy PNA<sub>2</sub>:DNA jest odmienna od znanych, trójniciowych form DNA [21].

Mechanizm inwazji łańcucha nie został w pełni wyjaśniony. Najprawdopodobniej jednak pierwszym, limitującym całą reakcję etapem, jest utworzenie niestabilnego, dwuniciowego kompleksu PNA:DNA. Naturalne rozwieranie się helisy DNA powoduje przyłączenie pierwszej nici PNA, a nietrwały kompleks stabilizowany jest następnie poprzez przyłączenie drugiego oligomeru PNA [3, 35].

Inwazja łańcucha ułatwiona jest w odcinkach DNA częściowo jednoniciowych, mających struktury drugorzędowe, obecnych np. w rejonach promotorowych, w odcinkach aktywnych transkrypcyjnie lub miejscach startu replikacji. Miejsca te mogą stać się naturalnymi i dogodnymi sekwencjami docelowymi dla przeciwgenowych PNA [16, 29, 31].

Zastosowanie tzw. bisPNA, czyli dwu oligomerów PNA, połączonych elastycznym, peptydowym łącznikiem, ułatwia tworzenie tripleksów. BisPNA charakteryzuje się zwiększoną zdolnością do "inwazji łańcucha", porównywalną z powinowactwem do jednoniciowego DNA. Wydaje się, że zastąpienie reszt C przez pseudoizocytozynę (J) w oligomerze PNA lub bisPNA umożliwia łączenie się z dwuniciowym DNA przez inwazję łańcucha w fizjologicznych siłach jonowych [13, 17].

Niektóre analogi DNA wiążą się równie stabilnie z kwasami nukleinowymi. Na przykład analogi ryboacetalowe tworzą struktury trójniciowe o temperaturze

topnienia ( $T_m$ ) o około  $4^\circ\text{C}$  wyższej (w przeliczeniu na jednostkę podstawową) w porównaniu z naturalnym DNA. Jednak struktura łańcucha ryboacetalowego w duplesie z DNA jest zasadniczo różna, tak że wartość  $T_m$  zmniejsza się o  $1^\circ\text{C}$ , w stosunku do duplexu DNA:DNA. PNA są zatem bardziej uniwersalnymi antysensami, tworząc stabilne zarówno duplekisy, jak triplekisy z komplementarnymi kwasami nukleinowymi [25].

## PNA JEST CZĄSTECZKĄ PRZECIWGENOWĄ I ANTYSSENSOWNĄ

Z przeprowadzonych dotychczas badań *in vitro* wynika, iż oligomery PNA, hybridyzujące z sekwencjami promotorowymi, mogą wygaszać ekspresję genu. Wykazano, że związanie krótkiego, tworzącego tripleks PNA do sekwencji enhancerowej hamuje *in vitro* aktywację transkrypcji zależną od czynnika NF- $\kappa$ B [41].

Struktury PNA<sub>2</sub>:DNA bardzo wydajnie hamują transkrypcję, przez zablokowanie polimerazy RNA. Do tego celu dobrze nadają się krótkie (10–12 jednostek) oligomery PNA. Wydaje się, że wiązanie PNA do dwuniciowego DNA jest ułatwione w obszarach z rozluźnioną strukturą helikalną np. aktywnych transkrypcyjnie. Tworzenie struktur trójniciowych w tych rejonach jest około trzy razy wydajniejsze, gdy PNA jest komplementarny względem nici niekodującej. Zjawisko to, określone wdzięcznym mianem "samobójczej transkrypcji", stwarza bardzo obiecujące perspektywy przyszłym zastosowaniom PNA jako czynnika przeciwgenowego. Może być również wykorzystane *in vitro* do śledzenia procesu transkrypcji oraz dynamiki miejsc przyłączania polimerazy RNA [17, 19].

W odróżnieniu od innych analogów DNA, peptydowe analogi DNA mogą również aktywować transkrypcję. Stosując dwa oligomery, komplementarne do sekwencji promotora w miejscach oddalonych o kilkanaście nukleotydów, utworzyć można *in vitro* wypętlone obszary jednoniciowego DNA, wykorzystywane przez polimerazę RNA jako miejsce startu transkrypcji [23].

Inaczej niż w przypadku dwuniciowego DNA, wiązanie PNA z jednoniciowym DNA lub RNA jest niezależne od siły jonowej roztworu. Dlatego też pierwsze udane doświadczenia *in vivo* przeprowadzono z antysensownymi oligomerami PNA. Oligomer PNA liczący 15 i 20 jednostek, wprowadzony metodą iniekcji do komórek ssaczych, skutecznie hamował powstawanie antygeny T SV40 [14].

RNA związany z PNA nie jest rozpoznawany przez RNazę H, jednak duża stabilność hybridów PNA:RNA pozwala na blokowanie komplementarnych sekwencji RNA w inny sposób. Na przykład oligomery PNA, tworzące zarówno duplekisy, jak triplekisy z mRNA i hybridyzujące tuż przed oraz tuż za kodonem

startu, wydajnie hamują translację w układach *in vitro*. Dzieje się tak prawdopodobnie przez fizyczne blokowanie składania kompleksu inicjującego 80S [17].

Do zahamowania translacji w rejonie kodującym konieczne jest natomiast utworzenie stabilniejszej struktury PNA<sub>2</sub>:RNA, np. przez zastosowanie bisPNA lub PNA tworzących tripleks. W miejscu przyłączenia PNA następuje zatrzymanie rybosomu, który najprawdopodobniej pozostaje związany z matrycą, zapobiegając powtórnej inicjacji translacji [17].

Oligomery PNA mogą być przydatne w wygaszaniu funkcji strukturalnych i katalitycznych RNA. Na przykład PNA komplementarny do części matrycowej RNA ludzkiej telomerazy hamuje aktywność telomerazy. Inhibicja jest od 10 do 50 razy wydajniejsza niż przy zastosowaniu oligomerów fosforotioloowych. Jest ponadto wysoce selektywna i zależy od miejsca, do którego przyłącza się PNA [30].

## ZASTOSOWANIA PNA *IN VITRO*

Dużą specyficzność i siłę wiązania oligomerów PNA z kwasami nukleinowymi, jak również możliwość przyłączania ligandów do obu końców cząsteczki PNA, wykorzystuje się już w badaniach *in vitro* [1].

Na przykład PNA z dołączonymi do końca C sześcioma resztami histydynowymi z powodzeniem zastosowano do oczyszczania unikatowych sekwencji DNA. Wykorzystano wysoką specyficzność i siłę wiązania PNA do DNA oraz wysokie powinowactwo (His)<sub>6</sub>-PNA do związanych jonów Ni<sup>2+</sup> w chromatografii powinowactwa. Metoda ta jest odmianą tzw. selekcji przez hybrydyzację, stosowanej najczęściej do izolacji mRNA z lizatów komórkowych. Jednak oczyszczanie unikatowych sekwencji, przez hybrydyzację z unieruchomioną sondą DNA napotykało szereg trudności. Im większa długość sondy, tym mniejsza zdolność rozróżniania nie w pełni komplementarnych sekwencji. Trudno również uniknąć rehybrydyzacji oczyszczanego kwasu nukleinowego. Oba te problemy rozwiązuje zastosowanie PNA. Sondą jest krótka sekwencja, pozwalająca na bardzo specyficzne rozróżniania sekwencji. Ponadto reakcja hybrydyzacji zachodzi w niskiej sile jonowej, faworyzującej powstawanie dupleksów PNA:DNA [33].

PNA wykorzystano również skutecznie do izolacji aktywnych transkrypcyjnie genów, zawierających powtórzenia CAG [5].

PNA nie są rozpoznawane i przecinane przez enzymy restrykcyjne. Możliwe jest zatem blokowanie miejsc restrykcyjnych, przez hybrydyzację PNA do DNA, w obrębie lub w pobliżu wybranej sekwencji. "Wygaszanie" wybranych sekwencji jest precyzyjne, tak że miejsca sąsiednie, odległe o kilka nukleotydów nie są blokowane. Technika ta znalazła zastosowanie m.in. przy konstruowaniu bibliotek ge-

nomowego DNA, o wielkości pomiędzy kilkaset kbp a kilka Mbp. Restryktazy, rozpoznające sekwencje najczęściej 4–6-nukleotydowe, przecinają genomowy DNA znacznie częściej. Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie "spinacza", składającego się z dwu, połączonych, ośmionukleotydowych oligomerów PNA, chrońiących komplementarny region w DNA przed metylacją. Po usunięciu "spinacza", metylowany DNA można przecinać enzymem restrykcyjnym, w miejscach wybranych poprzez sekwencję "spinacza" [28, 40].

Koniugaty PNA z przyłączoną do jednego z końców nukleazą S1 zastosować można do specyficznego przecinania wybranej sekwencji DNA [9, 31].

Dużą specyficzność wiązania PNA wykorzystano w amplifikacyjnym teście wykrywania mutacji punktowych, np. mutacji w protoonkogenie *ras*. Reakcję PCR z DNA pacjenta prowadzi się ze starterem PNA oraz z dwoma starterami DNA, z których jeden jest komplementarny do sekwencji zmutowanej. Powstający u pacjenta bez mutacji dupleks PNA:DNA skutecznie uniemożliwia reakcję PCR. Opisana technika "wykluczenia startera" (*PCR clamping*) pozwala rozróżnić matryce różniące się jednym nukleotydem. Jest bardziej powtarzalna i mniej zależna od obecnych w próbce zanieczyszczeń niż odpowiadająca jej "klasyczna" technika ARMS (amplifikacyjnego odwzorowywania mutacji) [32, 39].

Pewną odmianą przedstawionej techniki jest zapobieganie preferencyjnemu powielaniu krótszych alleli VNTR. Mechanizm pozostaje niejasny, przyjmuje się jednak, iż wynika ono z tworzenia częściowo sparowanych matryc. Zjawisku temu przeciwdziała dodanie do reakcji PCR oligomerów PNA komplementarnych do sekwencji matrycy. Oligomery PNA zapobiegają parowaniu matrycy, a same usuwane są w czasie reakcji wydłużania, przez termostabilną polimerazę DNA [10].

PNA można zastosować również w zmodyfikowanej technice hybrydyzacji oligonukleotydydowej, pozwalającej szybko przeglądać dużą liczbę próbek na obecność wybranych mutacji. Detekcja struktur dwuniciowych (PNA:DNA), metodą elektroforezy kapilarnej, następuje w temperaturze uniemożliwiającej hybrydyzację DNA:DNA [8].

Dużą specyficzność i łatwość przyłączania znaczników fluorescencyjnych do PNA wykorzystywano także w fizycznym mapowaniu DNA i w hybrydyzacji *in situ*, choć na razie na małą skalę [11, 25].

## FARMAKOKINETYKA PNA

Największe problemy stwarza zaprojektowanie oligomerów PNA łatwo przenikających do wnętrza komórek [1, 14]. Niezmodyfikowane, liniowe oligomery PNA penetrują błony liposomów w równie niewielkim stopniu, co naturalne oligonukleotydy [43]. Duże jednak nadzieje wiąże się ze znacznymi możliwościami

modyfikacji cząsteczek PNA. Wydaje się również, że rozwiązaniem może być wiązanie PNA z wektorami ułatwiającymi jego przedostanie się cząsteczek do wnętrza komórki [25].

Na przykład koniugat biotynyłowanego PNA ze streptawidyną i mysim przeciwciałem monoklonalnym, specyficznym wobec szczurzego receptora transferyny, pokonuje barierę krew-mózg z wydajnością 28 razy większą niż wolny PNA. Po podaniu dożylnym zawartość wektora w mózgu szczura odpowiada w przybliżeniu ilości podanej w taki sam sposób morfiny. Wykazano również, że tak przygotowany, antysensowny PNA o długości 18 jednostek, specyficznie i trwale wiąże się z komplementarną sekwencją w mRNA *rev* wirusa HIV-1 *in vitro* [34]. Jeżeli wyniki te zostaną potwierdzone *in vivo*, PNA antysensowny wobec mRNA HIV stać się może skutecznym lekiem w terapii neurologicznych objawów AIDS.

Niedawno zaobserwowano także, iż oligomery PNA, przyjmujące w roztworach wodnych struktury drugorzędowe, hybrydują z normalną wydajnością z dwuniciowym DNA. Być może farmakodynamiczne właściwości nieliniowych oligomerów PNA okażą się bardziej odpowiednie przy pokonywaniu błon biologicznych [31].

## PNA – MODEL STRUKTURALNY I MATERIAŁ GENETYCZNY

Parowanie komplementarnych sekwencji PNA lub DNA zależy od zachowania właściwej orientacji przestrzennej zasad azotowych, przyłączonych do rdzenia o odpowiedniej konformacji. Dane uzyskane z badania analogów, w których deoksyrybozę zastąpiono heksozą lub zmieniono chemicznie, wskazywały, że cukier oraz długość wiązania fosfodiesterowego są podstawowymi determinantami helikalności cząsteczki DNA (lub RNA). Jednak dokładna analiza dupleksów PNA wskazuje, iż przyjmują one strukturę przestrzenną analogiczną do helisy DNA. Nadal więc pozostaje niejasne, w jakim stopniu helikalność wynika z przyjmowania optymalnego ustawienia się par zasad wzdłuż osi cząsteczki i jaki jest wpływ rdzenia na zachowanie odległości pomiędzy zasadami. Analiza dwuniciowych struktur, różnie zmodyfikowanych PNA może wiele strukturalnych kontrowersji wyjaśnić [22].

Niedawno, jeden z odkrywców PNA zasugerował, że związki podobne do PNA mogły pełnić rolę prebiotycznego materiału genetycznego [24]. Możliwe jest, że pierwotny materiał genetyczny zawierać mógł inny niż fosfocukrowy rdzeń, zapewniający wewnętrzną komplementarność cząsteczki, a jednocześnie możliwy do utworzenia i przetrwania w ekstremalnym, prebiotycznym środowisku. Niezależnie, czy miał on strukturę amidową czy też inną, sugestia ta otwiera nowe perspektywy badawcze. Ostatnio wykazano, że *in vitro* oligonukleotyd RNA ułatwia syntezę

komplementarnego PNA i odwrotnie. W rezultacie tak kierowanej syntezy RNA, z racemicznej mieszaniny monomerów powstają w równych ilościach struktury dwuniciowe, zawierające zasadniczo jeden rodzaj izomerów nukleotydów. Można więc postulować możliwość przejścia pomiędzy różnymi systemami informacyjnymi, podobnymi jednak do kwasów nukleinowych [4].

## LITERATURA

- [1] AGRAWAL S, IYER RP. Modified oligonucleotides as a therapeutic and diagnostic agents. *Curr Opin Biotechnol* 1995, **6**: 12–19.
- [2] ALMARSSON O, BRUICE TC, KERR J, ZUCKERMANN RN. Molecular mechanics calculations of the structures of polyamide nucleic acids DNA duplexes and triple helical hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**: 7518–7522
- [3] BETTS L, JOSEY JA, VEAL JM, JORDAN SR. A nucleic triple helix formed by a peptide nucleic acid-DNA complex. *Science* 1995, **270**: 1836–1841.
- [4] BOEHLER C, NIELSEN PE, ORGEL LE. Template switching between PNA and RNA oligonucleotides. *Nature* 1995, **376**: 578–581.
- [5] BOFTA LC, CARPANETO EM, ALIFREY VG. Isolation of active genes containing CAG repeats by DNA strand invasion by a peptide nucleic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **6**: 1901–1905.
- [6] BOHUN E, TWARDOWSKI T. Nowe perspektywy strategii antysensu. *Post Biochem* 1994, **40**: 18–22.
- [7] BUCHARDT O, EGHOLM MM, BERG RH, NIELSEN PE. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 1993, **9**: 384–386.
- [8] CARLSSON C, JONSSON M, NORDEN B, DULAY MT, ZARE RN, NOOLADI J, NIELSEN PE, TSUI L-C, ZIELEŃSKI J. Screening for genetic mutations. *Nature* 1996, **380**: 207.
- [9] COREY DR, MUNOZ-MEDELLIN D, HUANG A. Strand invasion by oligonucleotide-nuclease conjugates. *Bioconjugate Chem* 1995, **5**: 93–100.
- [10] DEMERS DB, CURRY ET, EGHOLM M, SOZER AC. Enhanced PCR amplification of VNTR locus D1S80 using peptide nucleic acid (PNA). *Nucleic Acids Res* 1995, **23**: 3050–3055.
- [11] DEMIDOV VV, CHERNY DI, KURAKIN AV, YAVNILOVICH MV, MALKOV VA, FRANK-KAMENETSKIJ MD, SOENNICHSEN SH, NIELSEN PE. Electron microscopy mapping of oligopurine tracts in duplex DNA by peptide nucleic acids targeting. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**: 5218–5222.
- [12] DEMIDOV VV, YAVNILOVICH MV, BELOTSEKOVSKII BP, FRANK-KAMENETSKII MD, NIELSEN PE. Kinetics and mechanisms of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 2637–2641.
- [13] EGHOLM M, CHRISTENSEN L, DUEHOLM KL, BUCHARDT O, COULL J, NIELSEN PE. Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosine-containing PNA. *Nucleic Acids Res* 1995, **23**: 17–22.
- [14] HANVEY JC, PEFFER NJ, BISI JE, THOMSON SA, CADILLA R, JOSEY AJ, RICCA DJ, HASSMAN F, BONHAM MA, AU KG, CARTER SG, BRUCKENSTEIN DA, BOD AL, NOBLE SA, BABISS LE. Antisense and antigenic properties of peptide nucleic acids. *Science* 1992, **258**: 1481–1485.



- [15] HYRUP B, EGHOLM M, NIELSEN PE, WITTUNG P, NORDEN B, BUCHARDT O. Structural-activity studies of the binding of modified peptide nucleic acids (PNA) to DNA. *J Am Chem Soc* 1994, **116**: 7964–7970.
- [16] IYER M, NORTON JC, COREY DR. Accelerated hybridization of oligonucleotides to duplex DNA. *J Biol Chem* 1995, **270**: 14712–14717.
- [17] KNUDSEN H, NIELSEN PE. Antisense properties of duplex- and triplex-forming PNAs. *Nucleic Acids Res* 1996, **24**: 495–500.
- [18] KOSYNKINA L, WANG W, LIANG TC. A convenient synthesis of chiral PNA monomers. *Tetrahedron Lett* 1994, **35**: 5173–5176.
- [19] KROTZ AH, BUCHARDT O, NIELSEN PE. Synthesis of "retro-inverse" peptide nucleic acids. Characterization of monomers. *Tetrahedron Lett* 1995, **36**: 6937–6940.
- [20] LARSEN HJ, NIELSEN PE. Transcription-mediated binding of PNA to double stranded DNA: sequence-specific suicide transcription. *Nucleic Acids Res* 1996, **24**: 458–463.
- [21] LEIJON M, GRASLUND A, NIELSEN PE, BUCHARDT O, NORDEN B, KRISTENSEN SM, ERIKSSON M. Structural characterization of PNA:DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in B-like conformation. *Biochemistry* 1994, **33**: 9820–9825.
- [22] MESMAEKER DE A, ALTMANN KH, WALDNER A, WENDEBORN S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Curr Opin Struct Biol* 1995, **5**: 343–355.
- [23] MOELGAARD NE, BUCHARDT O, EGHOLM M, NIELSEN PE. Peptide nucleic acid-DNA strand displacement loops as artificial transcription promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**: 3892–3895.
- [24] NIELSEN PE. Peptide nucleic acid (PNA). A model structure for the primordial genetic material. *Orig Life* 1993, **23**: 323–327.
- [25] NIELSEN PE. DNA analogues with nonphosphodiester backbones. *Ann Rev Bioph Biomol Struct* 1995, **24**: 167–183.
- [26] NIELSEN PE, EGHOLM M, BERG RH, BUCHARDT O. Peptide nucleic acids (PNA). Potential antisense and antigene agents. *Anticancer Drug Des* 1993, **8**: 53–63.
- [27] NIELSEN PE, EGHOLM M, BERG RH, BUCHARDT O. Peptide nucleic acids (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconj Chem* 1994, **5**: 3–7.
- [28] NIELSEN PE, EGHOLM M, BERG RH, BUCHARDT O. Sequence specific inhibition of restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic Acids Res* 1993, **21**: 197–200.
- [29] NIELSEN PE, EGHOLM M, BUCHARDT O. Evidence for PNA<sub>2</sub>/DNA triplex structure upon binding of PNA to dsDNA by strand displacement. *J Mol Recognit* 1994, **7**: 165–170.
- [30] NORTON JC, PIATYSZEK MA, WRIGHT WE, SHAY JW, COREY DR. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotechnol* 1996, **5**: 615–619.
- [31] NORTON JC, WAGGENSPACK JH, VARNUM E, COREY DR. Targeting peptide nucleic acids-protein conjugates to structural features within duplex DNA. *Bioorg Med Chem* 1995, **3**: 437–445.
- [32] ORUM H, NIELSEN PE, EGHOLM M, BERG RH, BUCHARDT O, STANLEY C. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1993, **21**: 5332–5336.
- [33] ORUM H, NIELSEN PE, JORGENSEN M, LARSSON C, STANLEY C, KOCHT T. Sequence specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. *BioTechniques* 1995, **19**: 472–480.
- [34] PARDRIDGE WM, BOADO RJ, KANG Y-S. Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 5592–5596.
- [35] PEFFER NJ, HANVEY JC, BISI JE, THOMSON SA, HASSMAN CF, NOBLE SA, BABISS LE. Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**: 10648–10652.

- [36] RATAJCZAK MZ, SKÓRSKI T. Perspektywy wykorzystania strategii antysensów w medycynie doświadczalnej i klinicznej. *Post Biol Kom* 1994, 2: 177–196.
- [37] SZKLARCZYK A. Oligodezoksurybonukleotydy jako narzędzie specyficznej regulacji transkrypcji genów. *Post Biochem* 1993, 39: 221–227.
- [38] SZKLARCZYK A. Mechanizmy działania antysensownych oligodeoksurybonukleotydów. *Post Biochem* 1994, 40: 166–173.
- [39] THIEDE C, BAYERDOFFER E, BLASZCZYK R, WITTIG B, NEUBAUER A. Simple and sensitive detection of mutations in the ras protooncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res* 1996, 24: 983–984.
- [40] VESELKOV AG, DEMIDOV VV, FRANK-KAMENETSKIJ MD, NIELSEN PE. PNA as a rare genome-cutter. *Nature* 1996, 379: 214.
- [41] VICKERS TA, GRIFFITH MC, RAMASAMY K, RISEN LM, FREIER SM. Inhibition of NF- $\kappa$ B specific transcriptional activation by PNA strand invasion. *Nucleic Acids Res* 1995, 23: 3003–3005.
- [42] WAGNER RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994, 372: 333–335.
- [43] WITTUNG P, KAJANUS J, EDWARDS KM, HAAIMS G, NIELSEN PE, NORDEN B, MALMSTROM BG. Phospholipid membrane permeability of peptide nucleic acid. *FEBS Lett* 1995, 375: 27–29.
- [44] WITTUNG P, KIM SK, BUCHARDT O, NIELSEN PE, NORDEN B. Interactions of DNA binding ligands with PNA-DNA hybrids. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 5371–5377.
- [45] ŻEKANOWSKI C. Peptydowe kwasy nukleinowe – nowa grupa analogów DNA. *Post Biochem* 1995, 41: 32–38.

*Redaktor prowadzący: Maria Olszewska*

*Otrzymano: 22.07.1996 r.*

*Przyjęto: 19.07.1996 r.*

*Adres autora: 01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a.*



# RECEPTORY EIKOZANOIDÓW

## EICOSANOID RECEPTORS

Piotr KAPUSTA, Anna Maria KORDOWIAK

Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej  
Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

*Streszczenie:* W artykule przedstawiono informacje dotyczące struktury i funkcji receptorów eikozanoidów na podstawie wyników badań cytowanych w literaturze ostatnich lat. Szczegółowo omówiono udział tych receptorów w mechanizmach przekazywania sygnału i ich oddziaływaniu z różnymi systemami wtórnych przekaźników.

*Słowa kluczowe:* receptory, pochodne kwasu arachidonowego, prostaglandyny, leukotrieny, białka G.

*Summary:* The information published during the last years, concerning eicosanoid receptors structure and function has been presented. Involvement of those receptors in signal transduction mechanisms and their interactions with various second messenger systems have been discussed in detail.

*Key words:* receptors, arachidonic acid derivatives, prostaglandins, leukotrienes, G proteins.

*Stosowane skróty:* **AA** – kwas arachidonowy, **PGs** – prostaglandyny, **PGD<sub>2</sub>**, **PGE<sub>1</sub>**, **PGE<sub>2</sub>**, **PGF<sub>2a</sub>**, **PGH<sub>2</sub>** – odpowiednio: prostaglandyna D<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2a</sub>, H<sub>2</sub>, **PGI<sub>2</sub>** – prostacyklina, **TXA<sub>2</sub>** – tromboksan A<sub>2</sub>, **LTB<sub>4</sub>**, **LTB<sub>5</sub>**, **LTC<sub>4</sub>**, **LTD<sub>4</sub>**, **LTE<sub>4</sub>** – odpowiednio: leukotrien B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub>, **12-HETE**, **15-HETE** – odpowiednio: kwas 12- i 15-hydroksyeikozatetraenowy, **cAMP** – cykliczny AMP, **Ptd Ins(4,5)P<sub>2</sub>** – fosfatydyloinozytolo(4,5)difosforan, **Ptd Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>** – fosfatydyloinozytolo(1,4,5)trifosforan, **[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** – wewnątrzkomórkowe stężenie Ca<sup>2+</sup>

Zdolność komórek do odbierania różnorodnych sygnałów z otaczającego środowiska jest możliwa dzięki istnieniu na ich powierzchni białek swoiście wiążących substancje biologicznie aktywne, w tym również eikozanoidy – pochodne kwasu arachidonowego (AA). Wiadomości dotyczące tej grupy receptorów, zebrane na podstawie literatury do 1991 roku [34] należy uzupełnić licznymi, nowymi danymi doświadczalnymi opublikowanymi w ciągu ostatnich czterech lat. Ze względu na rodzaj ligandu, receptory eikozanoidów dzieli się na 3 główne grupy:

- receptory prostanoidów (związków powstających z AA przy udziale cyklo-  
oxygenazy) – najlepiej poznane i scharakteryzowane [34],
- receptory leukotrienów (związków powstających z AA przy udziale 5-lipo-  
oxygenazy),
- receptory pochodnych AA powstających przy udziale enzymów innych niż  
cyklooksygenaza i 5-lipooksygenaza.

Podział ten, mimo pewnych ograniczeń, zachowano ze względu na jego po-  
gładowość w niniejszym artykule.

## RECEPTORY PROSTANOIDÓW

Aktualną klasyfikację receptorów prostanoidów oparto na badaniach farmakolo-  
gicznych, w których porównywano oddziaływanie pięciu naturalnie występujących  
prostanoidów oraz ich syntetycznych agonistów i antagonistów na poszczególne  
receptory [9]. Na tej podstawie wyróżniono receptory DP, EP, FP, IP oraz TP,  
odpowiednio dla pochodnych  $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  i  $TXA_2$ . Receptor EP  
dzieli się dodatkowo na cztery podklasy (podtypy):  $EP_1$ ,  $EP_2$ , i  $EP_3$  i  $EP_4$  (podział  
ten zestawiono w tabeli 1). Druga klasyfikacja zaproponowana przez Muallema  
i wsp. [51] opiera się na pomiarach efektów różnych prostanoidów na poziomy  
wtórnych przekaźników, tj. cAMP i  $[Ca^{2+}]_i$ . Dzieli ona receptory prostanoidów  
na trzy grupy:

- podnoszące poziom cAMP,
- podnoszące poziom  $[Ca^{2+}]_i$ ,
- podnoszące poziom  $[Ca^{2+}]_i$  przez aktywację oddzielnej puli fosfolipazy C.

Podział ten opiera się na doświadczeniach prowadzonych tylko z jedną linią  
komórkową i w związku z tym nie obejmuje on receptorów obniżających poziom  
cAMP, takich jak  $EP_3$  [78]. Dlatego też większość badaczy posługuje się pierwszą  
klasyfikacją.

### Receptor DP

Receptor  $PGD_2$  (DP) jest do tej pory stosunkowo słabo poznany. Wynika to  
być może z faktu, że  $PGD_2$  przez długi czas była uważana za względnie nieaktywny  
produkt przemiany  $PGH_2$  [66]. Obecnie wiadomo, że  $PGD_2$  odgrywa ważną rolę  
w regulacji cyklu snu i czuwania (indukując sen) oraz regulacji temperatury ciała  
[49], hamuje wydzielanie hormonu uwalniającego LH [66], hamuje funkcje płytek  
krwi, eozynofili i neutrofilii [89], zmienia napięcie naczyń i nienaczyń  
mięśni gładkich, a w związku z tym jest odpowiedzialna za rozszerzanie naczyń  
[16,39]. Najbardziej istotną funkcję  $PGD_2$  odgrywa w wątrobie, gdzie pośredniczy  
w wewnątrznarządowej komunikacji pomiędzy komórkami nieparenchymalnymi a  
hepatocytami. Dowiedziono, że w większości tych procesów uczestniczy receptor

TABELA 1. Zestawienie najważniejszych własności receptorów eikozanoidów

Typ receptora	Liczba reszt aminokwasowych	Ligand wiązany swoiście	Białko G uczestniczące w przekazywaniu sygnału	Sposób przekazywania sygnału	Pozycja piśmiennictwa
DP	359	PGD <sub>2</sub>	G <sub>s</sub>	aktywacja cyklazy adenylationowej	24,74,86
EP <sub>1</sub>	405	PGE <sub>2</sub>	G <sub>q</sub>	aktywacja fosfolipazy C lub wzrost [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> niezależny	9,15,75,88
EP <sub>2</sub>	362	PGE <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub>	G <sub>s</sub>	aktywacja cyklazy adenylationowej	9,14,21, 24,75
EP <sub>3</sub> α,β,γ lub EP <sub>3a</sub> , EP <sub>3b</sub> , EP <sub>3c</sub> , EP <sub>3d</sub> , EP <sub>3e</sub> , EP <sub>3f</sub>	mysi 365 z macicy ludzkiej	PGE <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub>	G <sub>i</sub>	hamowanie cyklazy adenylationowej albo wzrost cAMP aktywacja fosfolipazy C (?) wzrost [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ,	9,15,22,28 54,56, 62,71, 75,78
EP <sub>4</sub>	513	PGE <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub>	G <sub>s</sub>	aktywacja cyklazy adenylationowej	4,7,22,60,68
FP	366	PGF <sub>2a</sub> , PGD <sub>2</sub>	G <sub>q</sub>	aktywacja fosfolipazy C	10,15,24,32,33 43,51,67,77
IP (IP <sub>1</sub> ,IP <sub>2</sub> ,IP <sub>3</sub> )	416,417	PGI <sub>2</sub> ,PGE <sub>1</sub>	G <sub>s</sub>	aktywacja cyklazy adenylationowej	1,15,47,70,74,85
TP	341 mysiej, 369 ludzkiej	TXA <sub>2</sub> ,PGH <sub>2</sub>	G <sub>q</sub>	aktywacja fosfolipazy C	11,32,43,53,63, 67,76
rec.LTB <sub>4</sub>		LTB <sub>4</sub> , LTB <sub>5</sub>	G <sub>i</sub>	?	3,25,73
LTI(PL1)		LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>	G <sub>i</sub>	?	6,36,46,84
LT2 (PL2)		LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , LTE <sub>4</sub>	?	?	6,36,46, 84

DP – receptor PGD<sub>2</sub>. Receptor ten aktywuje cyklazę adenylationową we współdziałaniu z białkiem regulatorowym G<sub>s</sub>, co prowadzi do wzrostu stężenia cAMP [24,74,86]. To sugeruje, że struktura tego receptora przypomina strukturę innych receptorów związanych z białkami G [64]. W latach 1994/1995 dwa niezależne od siebie zespoły badawcze uzyskały cDNA tego receptora ludzkiego [5] oraz mysiego [20]. Receptor DP jest glikoproteiną mającą reszty cukrowe przyłączone wiązaniami N- i O-glikozydowymi [49]. W ludzkich leukocytach zasadochłonnych charakteryzuje się on posiadaniem pojedynczego miejsca wiążącego o K<sub>d</sub>= 13 nM i nieco słabszej zdolności stymulacji powstawania cAMP [86]. Dla porównania, K<sub>d</sub> tego receptora z oka ludzkiego określono na 5,2 nM [42], co biorąc pod uwagę różnice tkankowe jest dobrą zgodnością. Badania z zastosowaniem swoistych agonistów i antagonistów świadczą o istnieniu tylko jednego typu receptora DP w różnych komórkach [16,39].

W pewnych komórkach PGD<sub>2</sub> może zapewne działać przez inne receptory prostanoidów, np. w miometrium szczura [15] i w szczurzych astrocytach typu-I [24] PGD<sub>2</sub> aktywuje receptory FP, co prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, a w konsekwencji do stymulacji obrotów metabolicznych fosfolipidów inozytolowych i wzrostu [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. W sercu wołu PGD<sub>2</sub> jest odpowiedzialna za relaksację naczyń wieńcowych, zaś wtórnym przekaźnikiem jest najprawdopodobniej cGMP.

## Receptor EP

Z dotychczasowych badań wynika, że PGE<sub>2</sub> wykazuje najszersze biologiczne działanie spośród wszystkich naturalnie występujących prostanoidów. Fizjologiczne efekty tego działania są często przeciwstawne w różnych tkankach, np. PGE<sub>2</sub> wywołuje skurcz lub relaksację mięśni gładkich, czy też stymuluje lub hamuje wydzielanie neuroprzekaźników i hormonów [78]. Ta pozorna sprzeczność wynika z obecności różnych podtypów tego samego receptora EP – wiążącego swoiście PGE<sub>2</sub>. Przy podziale rodziny receptorów PGE<sub>2</sub> na podtypy bierze się pod uwagę oprócz biochemicznego ich oddziaływania na wewnątrzkomórkowy metabolizm (np. aktywację lub hamowanie cykazy adenylanowej, wzrost lub spadek cAMP, zmiany w [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, oddziaływanie z fosfolipazami A lub C, wpływ na wtórne przekaźniki jak DAG lub Ptd Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>) również ich tzw. działanie farmakologiczne. Ten ostatni efekt obejmuje działanie na macicę, hamowanie wydzielniczej aktywności żołądka, wydzielanie neurotransmiterów, działanie na lipolizę w tkance tłuszczowej, reabsorpcję sodu i wody w kanalikach nerki czy też modulację wydzielania amin katecholowych w nadnerczu [38]. Receptory należące do różnych podklas mogą po związaniu tego samego ligandu, powodować zupełnie różne efekty wymienionych wyżej parametrów, reagują również inaczej na działanie związków będących ich agonistami lub antagonistami [38,55]. W literaturze lat 1992/1993 przyjmowano istnienie trzech podtypów receptora tzw. EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> oraz EP<sub>3</sub> [9,78,88]. Do dzisiaj zresztą w części piśmiennictwa stosuje się ten podział [np. 4,20,23,38]. Jednak w latach 1994/1995, ze względu na reakcje ze swoistymi antagonistami wyłoniono jeszcze jeden podtyp i nazwano go EP<sub>4</sub> [13,22,71,82]. Mogą stąd pochodzić cytowane w piśmiennictwie różnice co do ilości aminokwasów EP<sub>2</sub>: w "starszych" artykułach obliczano ją na 513 [21], w literaturze ostanich dwu lat szacowana jest na 362 reszty aminokwasowe [22,28].

## Receptor EP<sub>1</sub>

Uważa się, że receptor ten pośredniczy w skurczu mięśni gładkich żołądka, jelit i tchawicy oraz stymuluje uwalnianie neuroprzekaźników [88]. Ponadto jego obecność została potwierdzona w miometrium [15], tęczówce oka [10], kanalikach zbiorczych nerki [75], komórkach typu osteoblastów [35], w komórkach chromochłonnych rdzenia nadnerczy. Receptor EP<sub>1</sub> aktywuje fosfolipazę C, co prowadzi

do hydrolizy PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> i wzrostu [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, a pośredniczy temu niewrażliwe na toksynę krztuśca białko G<sub>q</sub> [9,15,75,88]. Należy jednak podkreślić, że doświadczenia z użyciem sklonowanego mysiego receptora EP<sub>1</sub> wskazują raczej na mechanizm niezależny od działania fosfolipazy C [27]. Niektórzy badacze ustalili, że w pewnych komórkach uczestniczy także białko G wrażliwe na tę toksynę, co może wskazywać również na obecność receptora EP<sub>3</sub> [59] lub na fakt, że receptor EP<sub>1</sub> jest zdolny oddziaływać nie tylko z jednym typem białka G [15,72]. Najbardziej interesująca jest zdolność PGE<sub>2</sub> do uwalniania AA z komórkowych fosfolipidów (w wyniku aktywacji receptora EP<sub>1</sub>) i w efekcie do syntezy tego samego i/lub innych eikozanoidów [35]. Byłby to więc jeden z mechanizmów wyjaśniających autokrynnie działanie PG<sub>s</sub> i amplifikację ich sygnału. Otrzymano funkcjonalny cDNA kodujący mysiego receptora EP<sub>1</sub>. Na tej podstawie ustalono, że receptor EP<sub>1</sub> jest zbudowany z pojedynczego łańcucha polipeptydowego zawierającego 405 aminokwasów. Struktura tego receptora przypomina strukturę innych receptorów związanych z białkami G (receptorów należących do wielkiej rodziny receptora β-adrenergicznego) wyróżniając się siedmioma domenami transbłonowymi. Analiza *Northern blot* wykazała obecność mRNA białka receptorowego w nerwie, a w mniejszej ilości w płucach. W części N-końcowej receptora EP<sub>1</sub> znajdują się potencjalne miejsca N-glikozylacji, zaś wewnątrzkomórkowe domeny pierwsza i trzecia lub tylko trzecia to potencjalne miejsca fosforylacji tego receptora przez kinazę białkową zależną od cAMP oraz kinazę białkową C. Receptor EP<sub>1</sub> wykazuje o wiele silniejsze powinowactwo do PGE<sub>2</sub> niż do PGE<sub>1</sub>, co odróżnia go od pozostałych receptorów EP. Wykazuje także mniejszą identyczność sekwencji aminokwasowej w domenach transbłonowych z pozostałymi receptorami: 28% z EP<sub>2</sub> i 33% z EP<sub>3</sub> (dla porównania wartość ta wynosi 36% pomiędzy EP<sub>2</sub> i EP<sub>3</sub>) [88].

## Receptor EP<sub>2</sub>

Obecność receptora EP<sub>2</sub> została wykazana w wielu tkankach i komórkach m.in. w limfocytach T (PGE<sub>2</sub> hamuje ich funkcję i proliferację) [2], makrofagach [65], neutrofilach [89], adipocytach [8], astrocytach typu 2 [24], osteoblastach [14,], komórkach mięśnia rzęskowego oka [42], komórkach śluzówki macicy [28] i tkanki mózgowej. Receptor ten znajduje się również w komórkach kanalików zbierających nerki [75], gdzie jest odpowiedzialny za stymulację reabsorpcji wody i Na<sup>+</sup>. Inne funkcje, które spełnia receptor EP<sub>2</sub>, to relaksacja mięśni rzęskowych w jelicie krętym i tchawicy, rozszerzanie naczyń krwionośnych [21] oraz regulacja temperatury ciała. PGE<sub>2</sub> odgrywa niezwykle istotną rolę w kontroli cyklu snu i czuwania [49], jednak uczestnictwo receptora EP<sub>2</sub> nie jest w tym przypadku do końca udokumentowane. W procesie aktywacji cyklazy adenylanowej przez receptor EP<sub>2</sub> uczestniczy białko regulatorowe G<sub>s</sub> [9,14,21,24,75]. Być może rolę tę może spełniać białko G inne niż klasyczne białko G<sub>s</sub>, ale zdolne do aktywacji cyklazy adenylanowej [8]. Jak



dotąd nie ma zgodności co do ilości miejsc wiążących ligand w receptorze EP<sub>2</sub>. W komórkach mięśnia rzęskowego oka [42] receptor ten charakteryzuje się posiadaniem tylko jednego miejsca wiążącego PGE<sub>2</sub> o wysokim powinowactwie ( $K_{d1}=0,9$  nM). Natomiast dla tego samego receptora w mózgu i w komórkach P388D<sub>1</sub> linii wywodzącej się od makrofagów mysich [65] ustalono obecność dwóch miejsc wiążących, o wysokim i o niskim powinowactwie ( $K_{d1}=2,1$  nM,  $K_{d2}= 272$ nM). Grupa Ichikawy [21,77–80] badająca różne podklasy receptorów EP ustaliła, że ich struktura cechuje się obecnością siedmiu transbłonowych domen. Mają również długi fragment C-końcowy, co wskazuje na podobieństwo do receptorów  $\beta_2$ -adrenergicznego i D<sub>1</sub>-dopaminergicznego. Potencjalne miejsca N-glikozylacji znajdują się w rejonie N-końcowym i w drugiej pętli zewnątrzkomórkowej. Spośród wszystkich receptorów EP<sub>2</sub> charakteryzuje się najwyższą swoistością wiązania PGE<sub>1</sub>, równą swoistości wiązania PGE<sub>2</sub>. Ma cztery potencjalne miejsca fosforylacji przez zależną od cAMP kinazę białkową: w trzeciej domenie wewnątrzkomórkowej i rejonie C-końcowym, co także jest podobieństwem do receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego. Analiza *Northern blot* wykazała obecność mRNA dla EP<sub>2</sub> w największych ilościach w grasicy i w jelicie krętym, a ponadto w płucach, sercu, śledzionie i macicy. Obecnie przyjmuje się istnienie dwu receptorów zamiast jak poprzednio jednego: właściwego PGE<sub>2</sub> zbudowanego z 362 reszt aminokwasowych oraz EP<sub>4</sub> który składa się z 513 reszt. Bastien i wsp. [4] dla ludzkiego receptora EP<sub>2</sub>, który ulega bardzo silnej ekspresji w jelicie cienkim (a także występuje w innych tkankach ludzkich), podają 488 reszt aminokwasowych, uzyskanych z cDNA pochodzącego z biblioteki genowej płuc człowieka. Regan i wsp. [68] otrzymali drogą klonowania z łożyska ludzkiego tzw. Hup-4, klon kodujący białko o 358 resztach aminokwasowych o ok. 30% identyczności z innymi receptorami prostaglandyn włączając w to ludzkie i mysie oznaczane jako EP<sub>2</sub>. Hup-4 ulega ekspresji w macicy ludzkiej i leukemicznych komórkach ludzkich HL-60 i działa tam jako receptor EP<sub>2</sub>.

### Receptor EP<sub>3</sub>

Spośród wszystkich receptorów PGE<sub>2</sub> receptor EP<sub>3</sub> został najlepiej poznany i scharakteryzowany farmakologicznie. Jest chyba również najszerzej rozpowszechnionym receptorem prostanoidów, występuje m.in. w miometrium ludzkim i szczurzym [15], sercu [41,44], adipocytach [8,85], komórkach HIT (klonalna linia trzustkowych komórek B), hepatocytach [62], komórkach tucznych [59], sympatycznych włóknach nerwowych, komórkach kanalików zbierających nerki [75], rdzeniu nerki i nadnerczy oraz w śluzówce żołądka.

Receptor ten uczestniczy aktywnie we wszystkich farmakologicznych procesach, w których uczestniczy receptor PGE<sub>2</sub>. Również i w przypadku tego receptora badacze nie są zgodni co do ilości miejsc wiążących ligand. Dla receptora EP<sub>3</sub> z serca i z śluzówki żołądka stwierdzono obecność dwóch miejsc wiążących – o wysokim

i o niskim powinowactwie do  $\text{PGE}_2$  ( $K_{d1}=0,018-2$  nM,  $K_{d2}=1.9-319$  nM) [41,44,], jednakże zgodność tych wyników nie jest dobra. Natomiast w znacznie lepszej zgodności pozostają wyniki badaczy sugerujących istnienie tylko jednego miejsca wiążącego o wysokim powinowactwie ( $K_d=1-9,66$  nM; uzyskane wartości zależały od rodzaju komórek oraz od tego, czy analiza Scatcharda wykonywana była w obecności GTP lub jego analogów, czy też nie [78]).

Receptor  $\text{EP}_3$  hamuje tworzenie cAMP przez białko regulatorowe  $G_i$  wrażliwe na toksynę krztuśca [9,15,56,62,75,78]. Oprócz tego receptor  $\text{EP}_3$  może wpływać na metabolizm fosfoinozytydów, przy czym pośredniczy wówczas białko G niewrażliwe ( $G_q$ ?) lub wrażliwe [59] na tę toksynę. Świadczy to, że jeden receptor może oddziaływać z różnymi białkami G w zależności od rodzaju komórki i jej stanu czynnościowego. Wykazano, że w komórkach CHO, w których nastąpiła ekspresja cDNA dla receptora  $\text{EP}_3$  wykazano, że receptor może funkcjonalnie oddziaływać z różnymi odmianami białek G wrażliwych na toksynę krztuśca ( $G_{i1}$ ,  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$  i  $G_o$ ), ale z różnym powinowactwem [56]. Poza tym, inaczej niż w przypadku innych receptorów związanych z białkami G, kompleks receptor  $\text{EP}_3$ -białko G wykazuje niskie powinowactwo do  $\text{PGE}_2$ , podczas gdy wolny receptor wysokie. Pogląd, że  $\text{EP}_3$  należy do tej wielkiej rodziny receptorów związanych z białkami G potwierdziło uzyskanie cDNA kodującego ten receptor [78]. Na tej podstawie ustalono, że łańcuch polipeptydowy białka receptorowego składa się z 365 reszt aminokwasowych. Ma dwa potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazę białkową zależną od cAMP w pierwszej domenie cytoplazmatycznej, a potencjalne miejsca N-glikozylacji to region N-końcowy i druga pętla zewnątrzkomórkowa (analogicznie, jak  $\text{EP}_1$  i  $\text{EP}_2$ ). Obecność mRNA tego receptora została potwierdzona w nerkach, a ponadto w mózgu, grasicy, płucach, sercu, żołądku i śledzionie. Grupy Ichikawy i Narumiyi [24,28,55,78] stwierdziły istnienie trzech form receptora  $\text{EP}_3$ :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Działanie prostaglandyny  $E_2$  przez wszystkie formy receptora  $\text{EP}_3$  polega głównie na hamowaniu cykazy adenylanowej, które różni się w zależności od tkanki, a także wg tych autorów oddziałuje również na inne wtórne przekaźniki i ich szlaki metaboliczne. Podklasy tego receptora mają typową strukturę podobną do receptora  $\beta$ -adrenergicznego z siedmioma hydrofobowymi domenami transbłonowymi oraz identyczne miejsca glikozylacji i fosforylacji, jak opisano wyżej. Różni je natomiast struktura cytoplazmatycznego C końca, kodowanego przez różne sekwencje nukleotydowe cDNA. Wynoszą one 30, 26 i 29 reszt aminokwasowych odpowiednio dla  $\text{EP}_{3\alpha}$ ,  $\text{EP}_{3\beta}$  i  $\text{EP}_{3\gamma}$ . Koniec ten nie uczestniczy w wiązaniu agonistów, gdyż jest on identyczny dla trzech form tego receptora. Różnią się natomiast oddziaływaniem biochemicznym.  $\text{EP}_{3\alpha}$  hamuje cyklazę adenylanową bardziej skutecznie niż  $\text{EP}_{3\beta}$ . C-koniec wszystkich form decyduje o efektywności aktywacji białek G oraz rodzaju tych białek, na które oddziałuje. Jest on modulowane przez nukleotydy gwaninowe: wzmagają one wiązanie  $\text{EP}_{3\alpha}$  i  $\text{EP}_{3\gamma}$ , a zmniejszają  $\text{EP}_{3\beta}$  nie wpływając na wiązanie ani na dysocjację kompleksu  $\text{PGE}_2$  z receptorem [55].

Obiecujące wyniki badań receptorów w poszczególnych pochodnych  $PG_5$  osiąga się przy zastosowaniu swoistych antagonistów i/lub agonistów. Lanthorn i wsp. [38] sugerują nawet udział poszczególnych klas lub podklas receptorów EP w różnych procesach fizjologicznych, na które oddziałują prostaglandyny; np. wywołujące biegunkę działanie  $PG_5$  nie jest spowodowane aktywnością receptora  $EP_3$ , zależy natomiast od  $EP_1$ , podczas gdy własności cytoprotekcyjne i zmniejszające wydzielanie prostaglandyn są warunkowane głównie działaniem receptorów  $EP_3$  nie zależąc od aktywności  $EP_1$ . Schmid i wsp. [71] badając różnice w biochemicznym i farmakologicznym oddziaływaniu receptora  $EP_3$  uzyskali cDNA kodujący ten receptor z ludzkiej macicy i stwierdzili siedem wariantów cDNA, które kodują sześć różnych form receptora  $EP_3$ :  $EP_{3a1}$ ,  $EP_{3a2}$ ,  $EP_{3b}$ ,  $EP_{3c}$ ,  $EP_{3d}$ ,  $EP_{3e}$ ,  $EP_{3f}$  wg nomenklatury tych autorów. Ekspresja tych form zależy od tkanki [71], u ludzi jest bardzo wysoka w nerkach i trzustce. Badacze ci twierdzą, że "ich" formy  $EP_{3a}$ ,  $EP_{3b}$  i  $EP_{3c}$  są identyczne z ludzkimi trzema formami tego receptora, opisanymi ostatnio w literaturze oraz że badane przez nich formy tego receptora wykazują wysokie podobieństwo do receptorów  $EP_3$  innych gatunków. Wszystkie sześć form  $EP_3$  wykazuje tę samą odpowiedź po związaniu prostaglandyny  $E_2$ , tzn. hamowanie cykazy adenylanowej oraz wzrost  $[Ca^{2+}]_i$ . Autorzy ci [71] zapowiadają dalsze badania nad różnicami w odpowiedzi komórkowej (dla różnych tkanek) na  $PGE_2$  oraz klinicznym użyciem różnych analogów.

## Receptor $EP_4$

Doniesienia na temat istnienia tego receptora pojawiły się w literaturze w latach 1994/1995. Jak wspomniano poprzednio, został on wyłoniony z podklasy  $EP_2$ . Większość prac ostatnich dwu lat stosuje więc podział receptora klasy E na cztery, a nie jak poprzednio na trzy główne podklasy [4,7,13,22,68,82]. Coleman i wsp. [7] opisali w 1994 r. receptor obecny w preparatach żyły odpiszczelowej noworodków świńskich, nie będącym żadnym ze znanych podtypów, tj.  $EP_1$ ,  $EP_2$  czy  $EP_3$ , lecz farmakologicznie i biochemicznie odrębnym, nazwanym przez nich  $EP_4$ , który stymuluje cyklazę adenylanową i powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego cAMP. Autorzy stwierdzają, że tego typu receptor występuje poza tym w macicy chomików, tchawicy szczura oraz mięśniach gładkich noworodków świni. Niezależnie od tych wyników Nishigaki i wsp. [60] stwierdzili istnienie nowego typu receptora  $EP_4$ , który dawniej klasyfikowany był jako  $EP_2$ . Zespół ten sklonował go z komórek linii mysiej mastocytozy [60] i podobnie jak zespół Colemana stwierdził, że stymuluje cyklazę adenylanową, ale różni się od  $EP_2$  odpowiedzią farmakologiczną indukowaną związaniem pewnych ligandów, przy czym zupełnie nie jest aktywowany przez butaprost, agonistę receptorów  $EP_2$ , a jest wrażliwy na AH 23848 B, poza tym uzyskuje wysoką ekspresję w śledzionie i odgrywa bardzo ważną rolę w układzie immunologicznym oraz w nerkach. Trudno posądzać grupę badawczą Ichikawy

[60,77–80] o pomyłkę lub brak doświadczenia, gdyż jest to zespół mający ogromne zasługi w precyzyjnych badaniach receptorów nie tylko klasy EP.

## Receptor FP

Podobnie, jak w przypadku receptorów innych prostanoidów, obecność receptora FP została stwierdzona w rozmaitych narządach, tkankach i komórkach m.in. w oku [10], macicy [15,31], ciałku żółtym [37,90], komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [43] i astrocytach typu-2 [24,33]. Miejsca wiążące swoiście  $\text{PGF}_{2a}$  zostały również bardzo dobrze scharakteryzowane w szczurzych hepatocytach [57]. Związanie  $\text{PGF}_{2a}$  ze swoim receptorem prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, a w konsekwencji do aktywacji obrotów metabolicznych  $\text{PtdIns}$  i wzrostu  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; [10,15,24,33,45,51,77], przy czym wapń może pochodzić nie tylko z zapasów wewnątrzkomórkowych, ale także może być dostarczony do wnętrza komórek przez kanały wapniowe aktywowane przez receptor [33]. W procesie tym uczestniczy białko regulatorowe G, najprawdopodobniej niewrażliwe na toksynę krztuśca białko  $G_q$  [16], choć w komórkach typu osteoblastów  $\text{PGF}_{2a}$  indukuje hydrolizę  $\text{PtdIns}$  przez białko G wrażliwe na wymienioną toksynę. Sprawę komplikuje nieco fakt, że przynajmniej niektóre efekty działania  $\text{PGF}_{2a}$  mogą być spowodowane uwolnieniem innych pochodnych AA na komórkę docelową i ich autokrynnym działaniem [31]. Izolowane błony hepatocytów mają dwa miejsca o wysokim i o niskim powinowactwie do ligandu (odpowiednio  $K_{d1}=3$  nM,  $K_{d2}=426$  nM), ale tylko miejsce o niskim powinowactwie jest związane z białkiem G [57]. Obecność dwóch receptorów, o wysokim i o niskim powinowactwie do  $\text{PGF}_{2a}$  została również wykazana w ciałku żółtym owcy [37], aczkolwiek inni badacze [90] nie potwierdzają tego i skłaniają się raczej do tezy o obecności tylko jednego receptora FP o wysokim powinowactwie ( $K_d=6,4$  nM). Receptor FP może również wiązać swoiście  $\text{PGD}_2$  [15,24] i ta właściwość swoistego wiązania więcej niż jednej pochodnej wydaje się być charakterystyczna dla większości receptorów prostanoidów. Otrzymanie cDNA kodującego mysiego receptor FP pozwoliło na uzyskanie wielu informacji dotyczących jego struktury i własności biochemicznych [77]. Receptor FP zbudowany jest z 366 reszt aminokwasowych, a obecność siedmiu domen transbłonowych świadczy o jego podobieństwie do innych receptorów prostanoidów, przy czym największa homologia sekwencji występuje pomiędzy FP i  $\text{EP}_1$  (47% identyczności w sekwencji domen transbłonowych) oraz FP i TP (48%). Potencjalne miejsca N-glikozytacji znajdują się w rejonie N-końcowym i w trzeciej pętli zewnątrzkomórkowej. Fragment C-końcowy zawiera potencjalne miejsca fosforylacji. Analiza Scatcharda wykazała obecność tylko jednego miejsca wiążącego  $\text{PGF}_{2a}$  z wysokim powinowactwem ( $K_d=1,32$  nM). Największe ilości mRNA tego receptora wykryto w komórkach ciałka żółtego, a nieco mniejsze w nerkach, sercu, żołądku i płucach.

## Receptor IP

Stosunkowo mniejsze niż o innych receptorach są informacje dotyczące IP – receptora  $\text{PGI}_2$ , co wynika z braku odpowiednich antagonistów umożliwiających upłynnienie białka receptorowego do stanu homogenego bez utraty jego zdolności wiążących [80]. Sama prostacyklina jest nietrwałą w warunkach fizjologicznych pochodną, powstającą głównie w komórkach endotelialnych w ścianach aorty, w płucach i sercu. Działa po związaniu ze swoistym receptorem wywołując farmakologiczne i biochemiczne zmiany w tym aktywuje cyklazę adenylanową, wzrost cAMP, działając przez białka G [1,15,47,69,70,74,85]. Sklonowano go z biblioteki genowej z płuc szczurów [69], ma typową strukturę siedmiu transbłonowych domen i składa się z 416 reszt aminokwasowych. Receptor IP został stwierdzony w miometrium szczura [15], ludzkich leukocytach zasadochłonnych [86], komórkach tłuszczowych [70], preadipocytach [85], płytkach krwi [47,74], mięśniach gładkich naczyń krwionośnych [31,43], różnych liniach komórek nowotworowych [1,80].  $\text{PGE}_1$  wiąże się do tego receptora z wysokim powinowactwem i dlatego przyjmuje się, że IP jest wspólnym receptorem dla  $\text{PGI}_2$  i  $\text{PGE}_1$  [1,85]. W cząsteczce receptora wyróżniono dwa miejsca wiążące ligand: jedno o wysokim powinowactwie ( $K_{d1}=0,5-9,8$  nM), a drugie o niskim ( $K_{d2}=27-56$  mM) [86]. Badania z użyciem azydofenylowych pochodnych izokarboksycykliny (analogów prostacykliny) wykazały, że receptor IP rozpoznaje różnice w absolutnej konfiguracji związanej cząsteczki przy węglu 15 preferując izomer S [80]. Grupa Ichikawy [52,69] sklonowała myszy receptor IP pochodzący z grasicy o 417 resztach aminokwasowych. Ma 30–40% identyczności z receptorami  $\text{PGE}$  oraz  $\text{TXA}_2$ . Herbert i wsp. [19] w 1995 r. zaproponowali podział receptora IP na trzy podklasy, analogicznie do podklas EP. Zatem wg nich IP1 powoduje aktywację fosfolipazy C, IP2 stymuluje cyklazę adenylanową przez białka G, natomiast w przewodach zbierających kory nerki królika [19] jest receptor  $\text{IP}_3$ , który hamuje przewodnictwo wody stymulowane wazopresyną oraz hamuje cyklazę adenylanową.  $\text{PGE}_2$  może się z nim wiązać, ale nie może go aktywować.

## Receptor TP

Receptor  $\text{TXA}_2/\text{PGH}_2$ , czyli TP, był pierwszym, dla którego otrzymano funkcjonalny cDNA [53], co pozwoliło na pełne potwierdzenie wcześniejszych teorii na temat struktury receptorów prostanoidów. Obecność receptora TP została wykazana w płytkach krwi [30,63,81], megakariocytach [11], mięśniach gładkich naczyń krwionośnych [12,45] i płuc [61], komórkach mezenchymalnych kłębuszka nerkowego [43,81], astrocytach w hodowli [54], komórkach nowotworowych astrocytoma [12] i HeLa [58] oraz w nabłonku endotelialnym [67]. Analiza *Northern blot* ujawniła, że organem najbogatszym w TP jest grasica, śledziona, płuca, nerki, macica, mózg i serce. Mniejsze ilości zostały wykryte w wątrobie, żołądku, jelicie

krętym i jądrach [53]. Ustalono, że aktywacja receptora TP (podobnie, jak receptorów EP<sub>1</sub> i FP) prowadzi do degradacji Ptd Ins(4,5)P<sub>2</sub> i wzrostu [Ca<sup>2+</sup>]<sub>2</sub> po wcześniejszej aktywacji fosfolipazy C [11,43,55,65,81], a w procesie tym uczestniczy białko regulatorowe G [53], niewrażliwe na toksyny krztuśca i cholery [50]. Dzięki zastosowaniu technik chromatografii o wysokim powinowactwie i wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) udało się oczyścić receptor TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> z ludzkich płytek krwi i określić jego masę cząsteczkową na 55 kDa. Oczyszczony receptor ma pojedyncze miejsce wiążące o K<sub>d</sub>=4 nM [30]. Dalsze badania nad tym receptorem wykazały obecność w jego cząsteczce reszt cukrowych przyłączonych wiązaniami N-glikozydowymi. Masa cząsteczkowa po trawieniu N-glikozydazą F wynosiła tylko 32 kDa. Równocześnie sklonowano cDNA i na tej podstawie ustalono sekwencję aminokwasową receptora TP z endotelium człowieka [67], płuc myszy [53] i astrocytów szczurzych [32]. Udowodniono, że receptor TP należy do wielkiej rodziny receptorów związanych z białkami G, dzieląc z nimi charakterystyczną strukturę siedmiu hydrofobowych transbłonowych domen o konformacji α-helisy [64]. Receptor ludzki i myszy wykazują ogromne podobieństwo – łańcuch polipeptydowy składa się odpowiednio z 343 i 341 reszt aminokwasowych, chociaż Raychowdhury i wsp. [67] ocenili ludzki receptor TxA<sub>2</sub> na 369 reszt. Wynika to z możliwości istnienia izoform receptora TP. Sekwencja aminokwasowa jest zgodna w 76%, a wewnątrz hydrofobowych domen aż w 85% [53]. Dla porównania, zgodność tej sekwencji mysiego receptora TP z sekwencją mysiego receptora EP<sub>1</sub> wynosi tylko 35% [88]. Dlatego uważa się, że receptor TXA<sub>2</sub> myszy i ludzki jest tym samym receptorem, a istniejące drobne różnice wynikają z różnic gatunkowych. Analiza Scatcharda wykazała obecność jednego miejsca wiążącego ligand o K<sub>d</sub>=3,3 nM [53]. Wynik ten wskazuje na bardzo dobrą zgodność z K<sub>d</sub> dla oczyszczonego receptora z ludzkich płytek krwi [30]. Natomiast wartości K<sub>d</sub> uzyskane dla receptorów TP charakteryzowanych w innych komórkach różnią się znacznie od siebie (K<sub>d</sub>=0,17–185 nM), należy jednak pamiętać, że w tych przypadkach nie wykonywano doświadczeń z oczyszczonym receptorem [45,76,81]. Poza tym niektórzy badacze sugerują istnienie dwóch odmian (podklas) receptora TP [58,63]. Udowodniono, że receptor TP obecny w komórkach linii HeLa aktywuje fosfolipazę C przez białko G wrażliwe na toksynę krztuśca, a w tych komórkach miejsca wiążące TXA<sub>2</sub> i PGH<sub>2</sub> występują oddzielnie [58]. Mysi receptor TP zawiera pięć, a ludzki cztery potencjalne miejsca fosforylacji przez kinazę białkową C. Uważa się, że kinaza białkowa C odgrywa główną rolę w funkcjonalnym, heterologicznym unieczynnianiu receptora. Natomiast obecność "konserwatywnych" reszt serynowych i treoninowych w dwóch pierwszych pętłach wewnątrzkomórkowych i rejonie C-końcowym decydowałaby o indukowanym przez agonistów homologicznym unieczynnianiu receptora [53]. Tę drugą hipotezę potwierdzają badania grupy Halushki [63], w wyniku których ustalono, że unieczynnienie receptorów TP w płytkach krwi jest niezależne od tworzenia wtórnych przekaźników, natomiast jest związane

ze zmianą powinowactwa do agonistów, jak również zmniejszeniem ilości miejsc wiążących (przyspieszona internalizacja receptora i jego degradacja). Receptor TP oprócz  $\text{TXA}_2$  i  $\text{PGH}_2$  w niektórych komórkach wiąże swoiście i z dużym powinowactwem 8-epi  $\text{PGF}_{2\alpha}$  – biologicznie aktywną pochodną AA, która powstaje w reakcji peroksydacji katalizowanej przez wolne rodniki i którego działanie uważa się za patologiczne [26].

## RECEPTORY LEUKOTRIENÓW

Badania nad receptorami leukotrienów koncentrują się przede wszystkim na poszukiwaniu odpowiednich trwałych i nietoksycznych antagonistów, które miałyby zastosowanie terapeutyczne [17,18,25], zwłaszcza w przypadku różnorodnych reakcji alergicznych, mniej zaś na scharakteryzowaniu samych białek receptorowych. Należy podkreślić, że leukotrieny zdefiniowano jako osobną grupę związków dopiero w 1979 roku. Receptory leukotrienów stwierdzono w wielu komórkach ssaków: w leukocytach wielojądrzastych [25,73], komórkach płuc i tchawicy [36], komórkach skóry i mięśni gładkich żołądka [46], komórkach serca [17], makrofagach, eozynofilach, błonach komórek śledziony i mózgu [3]. Ostatnie doniesienia wskazują na obecność białek wiążących leukotrieny w hepatocytach oraz komórkach hepatomy szczurzej i ludzkiej [40]. Zlokalizowano je w płucach, mózgu i błonach izolowanych z komory serca żaby *Rana catesbeiana* [3,7]. Do tej pory udało się scharakteryzować trzy różne receptory leukotrienów: receptor leukotrienu  $\text{B}_4$  ( $\text{LTB}_4$ ) [3,25,75] oraz receptory leukotrienów cysteinylowych (czyli  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  i  $\text{LTE}_4$ ) określane jako  $\text{LT}_1$  i  $\text{LT}_2$  [36,46] (tab. 1).

Receptor wiążący  $\text{LTB}_4$  w ludzkich leukocytach wielojądrzastych ma jedno miejsce wiążące ligand i masę cząsteczkową ok. 65 kDa, a w kompleksie z białkiem G – 140 kDa. Najprawdopodobniej białkiem tym jest białko  $\text{G}_i$ , ponieważ obecność toksyny krztuśca przed izolacją receptora hamowała tworzenie kompleksu receptor/białko G [73]. Prace innych badaczy potwierdzają rolę białka  $\text{G}_i$  w procesie oddziaływania ligand – receptor  $\text{LTB}_4$  u ssaków. Badania porównawcze nad wiązaniem agonistów i antagonistów do receptora  $\text{LTB}_4$  z ludzkich leukocytów wielojądrzastych wykazały istnienie przynajmniej jednej populacji tego receptora o niskim powinowactwie do ligandu, która nie jest zupełnie związana z białkiem G [25]. Jest to typowe dla receptorów łączących się z białkami G (tzn. receptor niezwiązany z białkiem G ma niskie powinowactwo do ligandu, forma związana z tym białkiem – wysokie) [56], dlatego też można przypuszczać, że również receptor  $\text{LTB}_4$  będzie należał do tej wielkiej rodziny. Natomiast receptor  $\text{LTB}_4$  opisany u żaby *Rana catesbeiana* raczej nie oddziałuje z białkiem  $\text{G}_i$ , ponadto wiąże ligand z mniejszym powinowactwem ( $K_d=2,22$  nM, podczas gdy dla receptora  $\text{LTB}_4$  u ssaków  $K_d=0,44-0,76$  nM), co jednak może być równoważone stosunkowo dużą liczbą receptorów w błonie. Receptor ten wiąże swoiście i z wysokim powinow-

wactwem  $LTB_5$  [3]. Receptory leukotrienów cysteinylowych są słabiej poznane. Stwierdzono, że istnieją dwa różne receptory:  $LT_1$  (zwany też  $PL_1$ ), który jest aktywowany przez  $LTD_4$  i  $LTE_4$  w jelicie cienkim i tchawicy świnki morskiej i  $LT_2$  ( $PL_2$ ), aktywowany przez  $LTC_4$  w tych samych narządach. Jednakże zarówno  $LT_1$ , jak i  $LT_2$  mogą być aktywowane przez wszystkie trzy leukotrieny cysteinylowe w innych tkankach. Istotna różnica między nimi (z farmakologicznego punktu widzenia) polega na tym, że receptor  $LT_2$  jest wrażliwy tylko na jeden ze znanych antagonistów leukotrienów cysteinylowych, podczas gdy inne związki antagoni- styczne blokują wyłącznie  $LT_1$  [36,46].  $LT_1$  prawdopodobnie oddziałuje z białkiem  $G_i$ , natomiast  $LT_2$  raczej nie. Sugeruje się istnienie trzeciego receptora  $PL_3$ . Receptor ten wykazywałby więc bardzo duże podobieństwo z niedawno odkrytym receptorem  $LTC_4$  znajdującym się w płucach żaby *Rana catesbeiana* [6, 91]. Podsumowując ten rozdział należy dodać, że niezbędne są dalsze badania wyjaśniające strukturę tych receptorów i mechanizm przekazywania przez nie sygnału.

## ZAKOŃCZENIE

Badania nad receptorami eikozanoidów mające na celu poznanie ich struktury, współdziałania z innymi białkami o aktywności biologicznej (zarówno związanymi z błoną komórkową, jak i wewnątrzkomórkowymi) oraz funkcji w przekazywaniu sygnału przez właściwe im ligandy są bardzo istotne. Z jednej strony mają charakter poznawczy, z drugiej zaś użyteczny, gdyż w przyszłości eikozanoidy (po uzyskaniu odpowiednich ich pochodnych) zostaną prawdopodobnie użyte jako leki w różnych jednostkach chorobowych. Już obecnie w celach leczniczych stosuje się pewne związki  $PG_s$ .

Czynnościowy stan receptorów, które są białkami wiążącymi bardzo aktywne biologicznie związki na powierzchni komórki, również będzie miał wpływ na sposób oddziaływania tych związków na komórkę, narząd, czy cały organizm. Stan fizjologiczny receptorów ma wpływ na wiele efektów biologicznej aktywności eikozanoidów, w tym również na cytoprotekcję. Dlatego poznanie molekularnych podstaw ich struktury i funkcji będzie miało decydujące znaczenie w pełnym wyjaśnieniu mechanizmu działania tych związków.

## LITERATURA

- [1] ADIE EJ, MULLANEY I, MCKENZIE FR, MILLIGAN G. Concurrent down-regulation of IP prostanoid receptors and the  $\alpha$ -subunit of the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein ( $G_s$ ) during prolonged exposure of neuroblastoma 5 glioma cells to prostanoid agonists. *Biochem J* 1992; **285**: 526-530.
- [2] ANASTAZIU ED, PALIOGIANIF, BALOW JP, YAMADA H, BOUMPAS DT. Prostaglandin  $E_2$  and other cyclic AMP-elevating agents modulate IL-2 and IL-2Ra gene expression at multiple levels. *J Immunol* 1992; **148**: 2845-2852.



- [3] ANDAZOLA JJ, UNDERWOOD JA, CHIONO M, TORRES OA, HERMAN CA. Leukotriene B<sub>4</sub> and Leukotriene B<sub>5</sub> have binding sites on lung membranes and cause contraction of bullfrog lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **263**: 1111–1117
- [4] BASTIEN L, SAWYER N, GRYGORCZYK R, MATTERS K, ADAM M. Cloning, functional expression and characterization of the human prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>2</sub> subtype. *J Biol Chem* 1994; **269** : 11873–11877.
- [5] Boie Y, SAWYER N, SLIPETZ DM, METTERS KM, ABRAMOVITZ M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 18910–18916.
- [6] CHIONO M, ANDAZOLA JJ, TORRES OA, HERMAN CA. Characterization and localization of leukotriene C<sub>4</sub> receptors in bullfrog lung *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **262**: 1248–1255.
- [7] COLEMAN RA, GRIX SP, HEAD SA, LOUITTIT JB, MALLETT A, SHELDRIK RLG. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 1994; **47**: 151–168.
- [8] COHEN-LURIA R, RIMON G. Prostaglandin E<sub>2</sub> can bimodally inhibit and stimulate the epidymal adipocyte adenylyl cyclase activity. *Cell Signal* 1992; **4**: 331–335.
- [9] COLEMAN RA, KENNEDY I, HUMPHREY PPA, BUNCE K, LUMLEY P. Prostanoids and their receptors. [w] Hansch C, Sammes PG, Taylor JB. (red.) *Comprehensive Medicinal Chemistry Vol. 3, Membranes and their Receptors*. Oxford Pergamon Press. 1990: 643–676.
- [10] CSUKAS S, BHATTACHERJEE P, RHODES L, PATERSON CA. Prostaglandin E<sub>2</sub> and F<sub>2a</sub> binding sites in the bovine iris ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; **34**: 2237–2245.
- [11] DORN II GW. Regulation of response to thromboxane A<sub>2</sub> in CHRF-288 megakaryocytic cells. *Am J Physiol* 1992; **262**: C991–C999.
- [12] DORN II GW, BECKER MW. Growth factors downregulate smooth muscle tromboxane receptors independent of cell growth. *Am J Physiol* 1992; **262**: C927–C933.
- [13] EXNER HJ, SCHLICKER E. Prostanoid receptors of the EP<sub>3</sub> subtype mediated the inhibitory effect of prostaglandin E<sub>2</sub> or noradrenaline release in the mouse brain cortex. *Naunyn-Schneideberg's Arch Pharmacol*. 1995; **351**: 46–52.
- [14] FREYALDENHOVEN AM, GUTIERREZ GE, LIFSCHITZ MD, KATZ MS. Protein kinase C differentially modulates PTH- and PGE<sub>2</sub>- sensitive adenylyl cyclase in osteoblast-like cells. *Am J Physiol* 1992; **262**: E87–E95.
- [15] GOUREAU O, TANFIN Z, MARC S, HARBON S. Diverse prostaglandin receptors activate distinct signal transduction pathways in rat myometrium. *Am J Physiol* 1992; **263**: C257–C265.
- [16] GRAY SJ, GILES H, POSNER J. The effect of a prostaglandin DP-receptor partial agonist(192C86) on platelet aggregation and the cardiovascular system in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1992; **34**: 344–351.
- [17] HAHN RA, MACDONALD BR, MORGAN E, POTTS BD, PARLI CJ, RINKEMA LE, WHITESITT CA, MARSHALL WS. Evaluation of LY203647 on cardiovascular leukotriene D<sub>4</sub> receptors and myocardial reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1992 **260**: 979–989.
- [18] HARPER RW, HERRON DK, BOLLINGER NG, SCOTT SAWYER J, BALDWIN RF, ROMAN CR, RINKEMA LE, FLEISCH JH. Development of a series of phenyltetrazole leukotriene D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonists. *J Med Chem* 1992; **35**: 1191–1200.
- [19] HERBERT RL, REGNIER L, PETERSON LN. Rabbit cortical collecting ducts express a novel prostacyclin receptor. *Am J Physiol* 1995; **268**: F145–F154.
- [20]HIRATA M, KAKIZUKA A, AIZAWA M, USHIKUBI F, NARUMIYA S Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11192–11196.
- [21] HONDA A, SUGIMOTO Y, NAMBA T, WATABE A, IRIE A, NEGISHI M, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Cloning and expression of cDNA for mouse prostaglandin E<sub>2</sub> receptor subtype. *J Biol Chem* 1993; **268**: 7759–7762.
- [22] ICHIKAWA A, SUGIMOTO Y, NOGISHI M. Molecular aspects of the structures and

- functions of the prostaglandin E receptors. Abstracts Lipid messengers in the nervous system 15 sat. Meeting of 15th ISN 1995; 36.
- [23] IRIE A, SUGIMOTO Y, NAMBA T, HARAZONO A, HONDA A, WATABE A, NEGISHI M, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Third isoform of the prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype with different C terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. *Eur.J.Biochem.* 1993; **217**: 313–318.
- [24] ITO S, SUGAMA K, INAGAKI N, FUKUI H, GILES H, WADA H, HAYAISHI O. Type-1 and type-2 astrocytes are distinct targets for prostaglandins D<sub>2</sub>, E<sub>2</sub> and F<sub>2a</sub>. *Glia* 1992; **6**: 67–74.
- [25] JACKSON RH, MORRISSEY MM, SILLS MA, JARVIS MF. Comparison of antagonist and agonist binding to the leukotriene B<sub>4</sub> receptor on intact human polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **262**: 80–89.
- [26] KANG KH, MORROW JD, JACKSON ROBERTS II L, NEWMAN JH, BANERJEE M. Airway and vascular effects of 8-epi prostaglandin F<sub>2a</sub> in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1993; **74**: 460–465.
- [27] KATOCH K, WATABE A, SUGIMOTO Y, ICHIKAWA A, NEGISHI M. Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> subtype in cDNA transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1244**: 4–48.
- [28] KATSUYAMA M, NISHIGAKI N, SUGIMOTO Y, MORIMOTO K, NEGISHI M, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. The mouse prostaglandin E receptor EP(2) subtype: cloning, expression and Northern blot analysis. *FEBS Lett.* 1995; **372**: 151–156.
- [29] KAWASE T, ORIKASA M, SUZUKI A. Phorbol ester-like action of staurosporine on the cAMP response to prostaglandin E<sub>2</sub> in two macrophage-like cell lines at distinct differentiation stages. *Cell Signal* 1992; **4**: 479–485.
- [30] KIM S, LIM CT, LAM SC, HALL SE, KOMIOTIS D, VENTON DL, LE BRETON GC. Purification of the human blood platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptor protein. *Biochem Pharmacol* 1992; **43**: 313–322.
- [31] KIMURA T, YOSHIDA Y, TODA N. Mechanisms of relaxation induced by prostaglandins in isolated canine uterine arteries. *Am J Obstet Gynecol* 1992; **167**: 1409–1416.
- [32] KITANAKA J, HASHIMOTO H, SUGIMOTO Y, SAWADA M, NEGISHI M, SUZUMURA A, MARUNOUCHI T, ICHIKAWA A, BABA A. cDNA cloning of thromboxane A<sub>2</sub> receptor from rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1265**: 220–223.
- [33] KITANAKA J, ISHIBASHI T, BABA A. Phloretin as an antagonist of prostaglandin F<sub>2a</sub> receptor in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1993; **60**: 704–708.
- [34] KORDOWIAK AM, KAPUSTA P. Prostaglandyny (PGs) jako przykład niepeptydowego ligandu wiązanego przez swoiste receptory na powierzchni komórki. *Post Biol Kom* 1992; **19**: 179–184.
- [35] KOZAWA O, TOKUDA H, MIWA M, TAKAHASHI Y, OZAKI N, OISO Y. Mechanism of prostaglandin E<sub>2</sub>-induced arachidonic acid release in osteoblast-like cells: independence from phosphoinositide hydrolysis. *Prost Leuk Essen Fatty Acids* 1992; **46**: 291–295.
- [36] LABAT C, ORIZ LJ, NOREL X, GORENNE I, VERLEY J, ABRAM TS, CUTHBERT NJ, TUDHOPE SR, NORMAN P, GARDINER P, BRINK C. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **263**: 799–805.
- [37] LAMSA JC, CUSHMAN RA, NAY MG, McCracken JA. In vivo desensitization of a high affinity PGF<sub>2a</sub> receptor in the ovine corpus luteum. *Prostaglandins* 1992; **43**: 165–179.
- [38] LANTHAN TH, BIANCHI RG, PERKINS WE. EP<sub>1</sub> receptor antagonist blocks the diarrheagenic, but not cytoprotective actions of a synthetic prostaglandin. *Drug Develop Res* 1995; **34**: 35–8.
- [39] LEFF P, GILES H. Classification of platelet and vascular prostaglandin D<sub>2</sub> (DP) receptors: estimation of affinities and relative efficacies for a series of novel bicyclic ligands. *Br J Pharmacol* 1992; **106**: 996–1003.

- [40] LEIER I, MULLER M, JEDLITSCHKY G, KEPPLER D. Leukotriene uptake by hepatocytes and hepatoma cells. *Eur J Biochem* 1992; **209**: 281–289.
- [41] LERNER RW, LOPASCHUK GD, OLLEY PM. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in the heart are coupled to inhibition of adenylyl cyclase via a pertussis toxin sensitive G protein. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; **70**: 77–84.
- [42] MATSUO T, CYNADER MS. The EP<sub>2</sub> receptor is the predominant prostanoid receptor in the human ciliary muscle. *Br J Ophthalmol* 1993; **77**: 110–114.
- [43] MENE P, SIMONSON MS, DUNN MJ. Eicosanoids, mesangial contraction and intracellular signal transduction. *Tohoku J Exp Med* 1992; **166**: 57–73.
- [44] MICHALAK M, WANDLER EL, STRYNADKA K, CATENA R, LIU HJ, OLLEY PM. Solubilization and purification of the prostaglandin E<sub>2</sub> receptor from cardiac sarcolemma. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1111**: 247–255.
- [45] MIKI I, ISHII A. Characterization of thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors in porcine coronary artery – the inhibitory effect of a novel dibenzoxepin derivative, KW-3635. *Thromb Haemost* 1992; **67**: 582–584.
- [46] MIURA T, INAGAKI N, GOTO S, YOSHIDA K, NAGAI H, KODA A. Leukotriene receptors in the skin of rats differ from those of mouse skin or rat stomach strip. *Eur J Pharmacol* 1992; **221**: 333–342.
- [47] MOLLNER S, DEPPISCH H, PFEUFFERT T. The  $\alpha$  subunit of the stimulatory guanine-binding regulatory protein forms high-molecular-mass aggregates, concomitant with iloprost-induced desensitization of human platelet adenylyl cyclase. *Eur J Biochem* 1992; **210**: 539–544.
- [48] MONSHIZADEGAN H, HEDBERG A, WEBB ML. Characterization of binding of a specific antagonist, [<sup>3</sup>H]-SQ29,548, to soluble thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> (TP) receptors in human platelet membranes. *Life Sci* 1992; **51**: 431–437.
- [49] MORII H, WATANABE Y. A possible role of carbohydrate moieties in prostaglandin D<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> receptor proteins from the porcine temporal cortex. *Arch Biochem Biophys* 1992; **292**: 121–127.
- [50] MORINELLI TA, HALUSHKA PV. Thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. Characterization and antagonism. *Trends Cardiovasc Med* 1991; **1**: 157–161.
- [51] MUALLEM S, MERRIT BS, GREEN J, KLEEMAN CR, YAMAGUCHI DT. Classification of prostaglandin receptors based on coupling to signal transduction systems. *Biochem J* 1989; **263**: 769–774.
- [52] NAMBA T, OIDA H, SUGIMOTO Y, KAKIZUKA A, NEGISHI M, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 9986–9992.
- [53] NAMBA T, SUGIMOTO Y, HIRATA M, HAYASHI Y, HONDA A, WATABE A, NEGISHI M, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. Mouse thromboxane A<sub>2</sub> receptor: cDNA cloning, expression and Northern blot analysis. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; **184**: 1197–1203.
- [54] NAMBA T, SUGIMOTO Y, NEGISHI M, IRIE A, USHIKUBI F, KAKIMAKA A, ITO S, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. *Nature* 1993; **365**: 166–170.
- [55] NEGISHI M, SUGIMOTO Y, NAMBA T, IRIE A, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Signal transductions of three isoforms of mouse prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. [W] Advances of prostaglandin, thromboxane and leukotriene research vol.23 ed. B. Samuelsson Raven Press Ltd N.York 1995.
- [56] NEGISHI M, SUGIMOTO Y, HAYASHI Y, NAMBA T, HONDA A, WATABE A, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Functional interaction of prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype with guanine nucleotide-binding proteins, showing low affinity ligand binding. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1175**: 343–350.
- [57] NEUSCHAFER-RUBE F, PUSCHEL GP, JUNGERMANN K. Characterization of prosta-

- glandin F<sub>2a</sub>-binding sites on rat hepatocyte plasma membranes. *Eur J Biochem* 1993; **211**: 163–169.
- [58] NIGAM S, ESKAFI S, ROSCHER A, WEITZEL H. Thromboxane A<sub>2</sub> analogue U46619 enhances tumour cell proliferation in HeLa cells *via* specific receptors which are apparently distinct from TXA<sub>2</sub> receptors on human platelets. *FEBS Lett* 1992; **316**: 99–102.
- [59] NISHIGAKI N, NEGISHI M, SUGIMOTO Y, NAMBA T, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Characterization of the prostaglandin E receptor expressed on a cultured mast cell line, BNu-2c13. *Biochem Pharmacol* 1993; **46**: 863–869.
- [60] NISHIGAKI N, NEGISHI M, HONDA A, SUGIMOTO Y, NAMBA T, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Identification of prostaglandin E receptor EP<sub>2</sub> cloned from mastocytoma cells as EP<sub>4</sub> subtype. *FEBS Lett* 1995; **364**: 339–341.
- [61] NORMAN P, CUTHBERT NJ, MCKENNIFF MG, GARDINER PJ. The thromboxane receptors of rat and guinea-pig lung. *Eur J Pharmacol* 1992; **229**: 171–178.
- [62] OKUMURA T, KANEMAKI T, KITADE H. Stimulation of glucose incorporation into glycogen by E-series prostaglandins in cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; **1176**: 137–142.
- [63] OKWU AK, ULLIAN ME, HALUSHKA PV. Homologous desensitization of human platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; **262**: 238–245.
- [64] PROBST WC, SNYDER LA, SCHUSTER DI, BROSIUS J, SEALFON SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992; **1**: 1–20.
- [65] RAE MG, ROTONDO D, DUTTA-ROY AK. Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> binding to a murine macrophage cell line, P388D<sub>1</sub>, by insulin. *Biochim Biophys Acta* 1992; **1135**: 343–348.
- [66] RANGACHARI PK. Concerning prostaglandin D<sub>2</sub>: forgotten, promiscuous, capricious. *Ann NY Acad Sci* 1992; **635**: 248–259.
- [67] RAYCHAWDHURY MK, YUKAWA M, COLLINS LJ, MCGRAIL SH, KENT KC, WARE JA. Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19256–19261.
- [68] REGAN JW, BAILEY TJ, PEPPERL DJ, PIERCE KL, BOGARDUS AM, DONELLO JE, FAIRBAIRN CE, KEDZIE KM, WOODWARD DE, GIL DW. Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP<sub>2</sub> subtype. *Molec Pharmacol* 1994; **46**: 213–220.
- [69] SASAKI Y, USUI T, TANAKA I, NAKAGAWA O, SANDO T, TAKAHASHI T, NAMBA T, NARUMIYA S, NAKAO K. Cloning and expression of cDNA for rat prostacyclin receptor. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1224**: 601–605.
- [70] SAWAIT, NEGISHI M, NISHIGAKI N, OHNO T, ICHIKAWA A. Enhancement by protein kinase C of prostacyclin receptor-mediated activation of adenylate cyclase through a calmodulin/myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) system in IC<sub>2</sub> mast cells. *J Biol Chem* 1993; **268**: 1995–2000.
- [71] SCHMID A, THIERAUCH KH, SCHLEUNING WD, DINTER H. Splice variants of the human EP<sub>3</sub> receptor for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Eur J Biochem* 1995; **228**: 23–30.
- [72] SCHWANER I, OFFERMANN S, SPICHER K, SEIFERT R, SCHULTZ G. Differential activation of Gi and Gs proteins by E and I subtype prostaglandins in membranes from the human erythroleukemia cell line HEL. *Biochim Biophys Acta* 1995; **1265**: 8–14.
- [73] SHERMAN JW, MENDELSON MA, BOGGS JM, KOO CH, GOETZL EJ. Ligand-induced formation of the leukotriene B<sub>4</sub> receptor-G protein complex of human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biochem* 1992; **48**: 367–372.
- [74] SIESS W, GRUNBERG B, LUBER K, VAUTI F, WILHELM B. Platelet signal transduction mechanisms induced by eicosanoids. *Eicosanoids* 1992; **5** (Suppl): S13–S15.
- [75] SMITH WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 1992; **263**: F181–F191.

- [76] SPURNEY RF, ONORATO JJ, ALBERS FJ, COFFMAN TM. Thromboxane binding and signal transduction in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* 1993; **264**: F292–F299.
- [77] SUGIMOTO Y, HASUMOTO K, NAMBA T, IRIE A, KATSUYAMA M, NEGISHI M, KAKIZUKA A, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Cloning and expression of cDNA for mouse prostaglandin F receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1356–1360.
- [78] SUGIMOTO Y, NAMBA T, HONDA A, HAYASHI Y, NEGISHI M, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. Cloning and expression of cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP<sub>3</sub> subtype. *J Biol Chem* 1992; **267**: 6463–6466.
- [79] SUGIMOTO Y, NEGISHI M, HAYASHI Y, NAMBA T, HONDA A, WATABE A, HIRATA M, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Two isoforms of the EP<sub>3</sub> receptor with different carboxyl-terminal domains. *J Biol Chem* 1993; **268**: 2712–2718.
- [80] SUZUKI M, KOYANO R, NOYORI R, HASHIMOTO H, NEGISHI M, ICHIKAWA A, ITO S. An azido-functionalised isocarbacyclin analogue acting as an efficient photoaffinity probe for a prostacyclin receptor. *Tetrahedron* 1992; **48**: 2635–2658.
- [81] TAKANO S, ISHIMOTO H, NAKAHATA N, NAKANISHI H. Thromboxane A<sub>2</sub> receptor characterization in human astrocytoma cells and rabbit platelets by a new thromboxane antagonist, [3H]ONO NT-126. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1992; **76**: 155–170.
- [82] TOH H, ICHIKAWA A, NARUMIYA S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. *FEBS Lett* 1995; **361**: 17–21.
- [83] TOKUDA H, YONEDA M, OISO Y, KOZAWA O. Inhibitory effect of 17  $\beta$ -estradiol on prostaglandin E<sub>2</sub>-induced phosphoinositide hydrolysis in osteoblast-like cells. *Prostaglandins* 1992; **43**: 271–280.
- [84] TUDHOPE SR, CUTHBERT NJ, ABRAMTS, JENNINGS MA, MAXEY RJ, THOMPSON AM, NORMAN P, GARDINER PI. Bay u 9773 a novel antagonist of cysteinyl-leukotriens with activity against two receptor subtypes *Eur J Pharmacol* 1994 **264**: 317–323.
- [85] VASSAUX G, GAILLARD D, DARIMONT C, AILHAUD G, NEGREL R. Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>: physiological implications. *Endocrinology* 1992; **131**: 2393–2398.
- [86] VIRGOLINI I, LI S, SILLABER C, MAJDIC O, SINZINGER H, LECHNER K, BETTELHEIM P, VALENT P. Characterization of prostaglandin (PG)-binding sites expressed on human basophils. *J Biol Chem* 1992; **267**: 12700–12708.
- [87] VONAKIS BM, VANDERHOEK JY. 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) receptors. *J Biol Chem* 1992; **267**: 23625–23631.
- [88] WATABE A, SUGIMOTO Y, HONDA A, IRIE A, NAMBA T, NEGISHI M, ITO S, NARUMIYA S, ICHIKAWA A. Cloning and expression of cDNA for a mouse EP<sub>1</sub> subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 20175–20178.
- [89] WHEELDON A, VARDEY CJ. Characterization of the inhibitory prostanoid receptors on human neutrophils. *Br J Pharmacol* 1993; **108**: 1051–1054.
- [90] WIEPZ GJ, WILTBANK MC, NETT TM, NISWENDER GD, SAWYER HR. Receptors for prostaglandins F<sub>2a</sub> and E<sub>2</sub> in *ovine corpora lutea* during maternal recognition of pregnancy. *Biol Rep* 1992; **47**: 984–991.
- [91] YU SP. Roles of arachidonic acid, lipoxygenases and phosphatases in calcium-dependent modulation of M current in bullfrog sympathetic neurons. *J Physiol* 1995; **487**: 797–811.

Redaktor prowadzący: Jan Michejda

Otrzymano: 15.05.1994 r. Przyjęto: 08.03.1996 r.

Adresautora: Instytut Biologii Molekularnej, UJ

Zakład Biochemii Zwierząt, 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3

## CZYNNIKI WARUNKUJĄCE UKIERUNKOWANY WZROST NEURONÓW\*

### FACTORS INFLUENCING GUIDED OUTGROWTH OF NEURONS

Ewa STĘPIEŃ

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego UJ,  
Kraków

*Streszczenie:* W artykule omówiono zjawisko ukierunkowanego wzrostu komórek nerwowych. Scharakteryzowano wybrane czynniki biorące udział w procesie naprowadzania aksonów oraz przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów rządzących reakcjami ruchowymi stożków wzrostu i procesem wydłużania się neurytów.

*Słowa kluczowe:* Ukierunkowany wzrost, naprowadzanie aksonów, chemotropizm, elektrotropizm, komórki nerwowe.

*Summary:* In the present paper the process of guided outgrowth of neural cells is discussed. Factors influencing axon guidance are summarized, and current knowledge concerning the mechanisms controlling growth cones motility and neurite elongation is presented.

*Key words:* guided outgrowth, axon guidance, chemotropism, electrotropism, neural cells.

## WSTĘP

Komórki nerwowe mają zdolność tworzenia wypustek nerwowych (neurytów), których długość niejednokrotnie jest tysiące razy większa niż średnica ich ciała. Wypustki te tworzą między sobą skomplikowaną architekturę precyzyjnych połączeń, przenoszących informację między komórkami nerwowymi nieraz na bardzo dużą odległość. Wielu badaczy prowadzi badania zmierzające do wyjaśnienia, jak neuryty odnajdują miejsca docelowe i co je do tych miejsc naprowadza.

\*Praca częściowo finansowana w ramach grantu KBN 6 P204 057 07

Jednym z pierwszych, który postawił to pytanie, był fizjolog Santiago Ramón y Cajal w 1892 roku. (cyt. za Baier H., Bonhoefer F. [3]). Zaobserwował on w utrwalonych skrawkach pochodzących z embrionalnej tkanki nerwowej ameboidalne zgrubienia, które uważał za wydłużające się wypustki (aksony i dendryty). Ramón y Cajal nazwał te zgrubienia stożkami wzrostu i intuicyjnie przypisał im rolę w odnajdywaniu ścieżek migracji oraz rozpoznawaniu miejsc docelowych wzrostu komórek nerwowych. Zaproponował on również tropiczny mechanizm naprowadzania komórek nerwowych przez substancje uwalniane z komórek docelowych. W 1909 roku Harrison po raz pierwszy zaobserwował wzrost stożków wzrostu pochodzących z ektodermy *Rana salvatica* [34]. Obserwacje swoje prowadził on *in vitro* w hodowlach w kropli odwróconej i potwierdził zdolności stożków wzrostu do wykonywania ruchów, ciągłej zmiany kształtów, wydłużania się i wycofywania.

Komórki nerwowe odpowiadają na lokalne zmiany środowiska zewnętrznego aktywnymi reakcjami ruchowymi czubków neurytów (stożków wzrostu). Ostateczny kierunek wzrostu, jaki przyjmują aksony, a w szczególności te, które przewodzące impulsy do ciała komórki nerwowej, jest wypadkową wielu zmiennych, przez które środowisko zewnętrzne oddziałuje na neurony [18, 51, 73]. Zmiennymi tymi mogą być zarówno anizotropowe podłoże, na którym rosną komórki, o zmieniających się: adhezywności [6, 11, 54, 77] lub zróżnicowanej rzeźbie [10], jak i gradient stężeń substancji chemicznej [3, 94]. Anizotropia podłoża może polegać również na ekspresji różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, które stanowią podłoże dla wydłużających się aksonów [40]. Podłożem dla wzrostu neuronów może być także powierzchnia komórek, takich jak: komórki nabłonka nerwowego, mezenchymy, komórki mięśni, neurony oraz inne komórki napotkane na drodze przez wydłużające się aksony [37, 73].

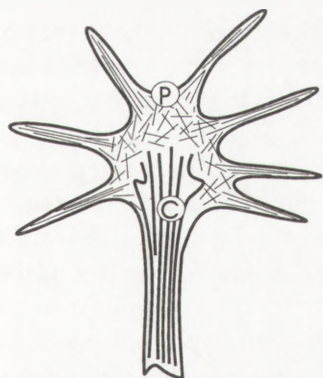
Obecnie uwaga badaczy skoncentrowana jest na poznaniu molekularnego mechanizmu oddziaływania białek naprowadzających stożki wzrostu z ich receptorami w komórce [47, 51]. O ile o budowie tych białek wiadomo stosunkowo dużo, to wiadomości na temat mechanizmu aktywacji ich receptora, transdukcji sygnału w błonie i w konsekwencji dynamicznych zmian w cytoszkielecie stożka wzrostu są mimo licznych badań stosunkowo skąpe [52, 58].

## BUDOWA STOŻKA WZROSTU NEURYTÓW

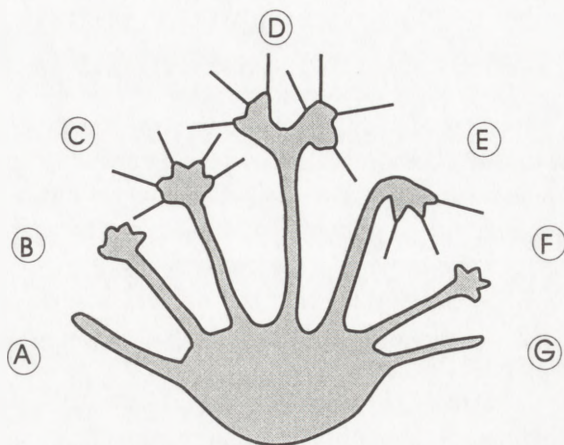
Podczas wzrostu embrionalnych komórek nerwowych stożki wzrostu są tymi strukturami, które wykazują największą aktywność ruchową. Aktywność ta objawia się jako wydłużanie i wycofywanie wypustek, skręcanie (ang. *turning*), czyli odchylenie wypustek od pierwotnej osi wzrostu, rozgałęzianie (ang. *branching*) i na koniec tworzenie synaps (rys. 1). Stożki wzrostu mają zdolność do przemieszczania się, wydłużania i tworzenia rozgałęzień nawet po odcięciu ich od ciała komórki [89]. Ta duża ruchliwość stożków wzrostu neurytów związana jest ściśle z ich

budową. Mają one, co zaobserwował ich odkrywca Ramón y Cajal (1892) ameboidalny kształt. Można wyróżnić w nich dwie domeny: centralną i peryferyjną [101].

Domena centralna (C, rys. 2) sąsiaduje z trzonem neurytu i jej struktura jest wzmocniona przez wiązkę mikrotubul wchodzących do stożka wzrostu i kończących się w nim na kształt wachlarza. Na domenę peryferyjną (P, rys. 2) składa się zewnętrzna część stożka wzrostu. Jest ona pozbawiona organelli komórkowych, szeroka, wachlarzowato rozplaszczona [30]. Stanowi najbardziej dynamiczny obszar stożka wzrostu, ulegający cyklicznym ruchom, którym towarzyszy tworzenie i wycofywanie cienkich (o średnicy 0,2–0,5  $\mu\text{m}$ ), długich na



Rys. 2. W stożku wzrostu można wyróżnić dwie domeny: centralną (C) i peryferyjną (P). Domena centralna sąsiaduje z trzonem neurytu, natomiast peryferyjna znajduje się w położeniu dystalnym w stosunku do czubka neurytu (schemat wg [101] zmieniony)



Rys. 1. Schemat ilustrujący różne typy aktywności ruchowej stożków wzrostu. Początkowym etapem jest wydłużanie się neurytu (A) i tworzenie na czubku rozplaszczonego lamellipodium (B). Stożki wzrostu występują najczęściej w postaci lamellipodium z licznymi, długimi i cienkimi filopodiami (C). Po zadziałaniu bodźca naprowadzającego dochodzi często do rozgałęziania (D) (ang. *branching*) lub skręcania stożka wzrostu (E) (ang. *turning*). Reakcje: zatrzymania (F) i wycofania (ang. *retraction*) (G) stożka wzrostu są typowymi reakcjami na działające bodźce hamujące (wg różnych autorów)

kilka do kilkudziesięciu mikrometrów filopodiów (ang. *filopodial protrusions*). Wzrost i retrakcja filopodiów są stosunkowo szybkie i odbywają się ze średnią prędkością 12  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Domenę peryferyjną tworzy szerokie, rozplaszczone lamellipodium, zajmujące proksymalne położenie w stosunku do filopodiów. Lamellipodium porusza się ruchem porównywalnym z ruchem pseudopodiów ameb.

Filopodia i lamellipodia pełnią kilka ważnych funkcji związanych z naprowadzaniem neurytów. Ich zadaniem jest badanie (eksploracja) środowiska zewnętrznego i przekazywanie informacji do ciała komórki [31, 51, 60] oraz udział w ruchliwości i adhezji neurytów do podłoża [6, 37, 56, 57].



## ZMIANY W CYTOSZKIELECIE PODCZAS NAPROWADZANIA STOŻKÓW WZROSTU

Cytoszkielelet odgrywa główną rolę w procesach wydłużania i naprowadzania wypustek komórek nerwowych. Organizacja poszczególnych elementów cytoszkieletu, na który składają się filamenty aktynowe (mikrofilamenty) oraz mikrotubule, zmienia się gwałtownie wewnątrz stożka wzrostu, zanim jeszcze zostaną zaobserwowane zmiany jego kształtu [96].

Wewnętrzny szkielet filopodiów stanowią wiązki filamentów aktynowych (ang. *actin bundles*) [57, 61] oraz pojedyncze filamenty aktynowe, zróżnicowane pod względem kształtu i ustawienia [61] (rys. 7 A). Dłuższe filamenty aktynowe (od 3 do 6  $\mu\text{m}$ ) są zebrane w wiązki i ustawione prostopadle względem krawędzi pełzającego lamellipodium. Drugą populację mikrofilamentów stanowią krótsze filamenty, często rozgałęzione, tworzące gęstą sieć, wypełniającą całą objętość lamellipodium.

Komponent aktynowy cytoszkieletu ulega ciągłym przemianom we wnętrzu stożka. Istnieje wiele wskazówek na to, że to głównie aktyna jest zaangażowana w ruchy pełzające neurytów [93]. Monomery aktyny znakowanej biotyną są dobudowywane do mikrofilamentów tuż przy krawędzi rosnącego stożka wzrostu (w części dystalnej stożka), do dodatnich końców filamentów (ang. *barbed ends*), które kontaktują się z białkami błony komórkowej [76]. Wyznakowane mikrofilamenty przemieszczają się do wnętrza stożka, gdzie albo są wbudowywane do cytoszkieletu, albo ulegają dysocjacji do monomerów aktyny. Aktyna bierze również udział w ruchach związanych z naprowadzaniem stożków wzrostu, takich jak "pełzanie" lamellipodium, wydłużanie i wycofywanie filopodiów, tworzenie wstęgowatych struktur między filopodiami (ang. *veils*). Zaobserwowano *in situ*, że podczas rozwoju embrionalnego konika polnego neurony Ti1 wykazują zróżnicowane nagromadzenie aktyny w poszczególnych obszarach stożka wzrostu [74]. Filopodia wychodzące z tego samego stożka wzrostu mogą mieć różną ilość F-aktyny. Najwięcej jest jej w filopodiach kontaktujących się z komórkami docelowymi, a akumulacja aktyny w poszczególnych obszarach towarzyszy zmianie kierunku rosnącego stożka.

Wydłużanie się aksonu (elongacja) jest uzależnione od organizacji mikrotubul [93]. Wypustki komórek nerwowych są zdolne do wydłużania *in vitro* bez udziału filopodiów i lamellipodiów. Po podaniu cytochalazyny B (która powoduje rozpad mikrofilamentów i retrakcję filopodiów) nadal obserwuje się wydłużanie aksonów. Neurony hodowane w obecności cytochalazyny B mają neurofilamenty i mikrotubule typowe dla nie zmienionych komórek nerwowych [67]. Również doświadczenia przeprowadzone *in vivo* potwierdzają, że dezorganizacja mikrofilamentów nie zakłóca procesu elongacji, ma natomiast wpływ na odnajdywanie ścieżek migracji przez stożki wzrostu. Aksony pozbawione filopodiów tracą zdolność odnajdywania

ścieżek migracji, a ich wzrost *in vivo* jest zaburzony [8]. Wydłużanie się aksonów jest hamowane przez leki blokujące polimeryzację tubuliny: nokodazol i kolcemid.

Mikrotubule w stożkach wzrostu, inaczej niż w aksonach, nie tworzą jednorodnej wiązki, lecz są ułożone w sposób nieregularny. Doświadczenia przeprowadzone *in situ* na neuronach T11 pochodzących z embrionów konika polnego wykazują, że mikrotubule tworzą w stożkach wzrostu pętle i wiązki, które utrzymują rozgałęzienia stożka, nie wnikając jednak do filopodiów [87]. W stożkach wzrostu obserwowany jest ciągły obrót mikrotubul kontrolowany przez zmienne warunki środowiska zewnętrznego [87]. Neurony zachowują zdolność do tworzenia krótkich wypustek pomimo zahamowania polimeryzacji tubuliny nokodazolem. Nawet wcześniejsze zadziałanie toxolem (który stabilizuje mikrotubule) i zablokowanie polimeryzacji mikrotubul przez nokodazol nie hamuje tworzenia krótkich wypustek przez neurony współczulne *in vitro*. Sugeruje to, że początkowy etap tworzenia neurytów nie zależy od polimeryzacji mikrotubul [92].

W stożkach wzrostu zachodzi również intensywne dobudowywanie składników błony komórkowej. Zaobserwowano przemieszczanie się prekursora fosfolipidów (glicerolu) do dystalnych obszarów w izolowanych stożkach wzrostu. Znakowany radioaktywnie glicerol towarzyszył charakterystycznym pęcherzykom, które licznie występują w stożkach wzrostu [83]. Także preferencyjna egzocytoza białek jest obserwowana w stożku wzrostu. Nowo syntetyzowane białka egzogenne pojawiają się najpierw na powierzchni czubków aksonów i niedojrzałych dendrytów. Receptory limfocytów CD8 $\alpha$  wprowadzone do komórek nerwowych z hipokampów zarodków szczura przy użyciu wektora herpesvirus-CD8 $\alpha$  były wykrywalne w ograniczonym obszarze stożków wzrostu już po 8 godzinach od transfekcji komórek. Po 20 godzinach białko CD8 $\alpha$  było obecne na powierzchni całego neuronu [13].

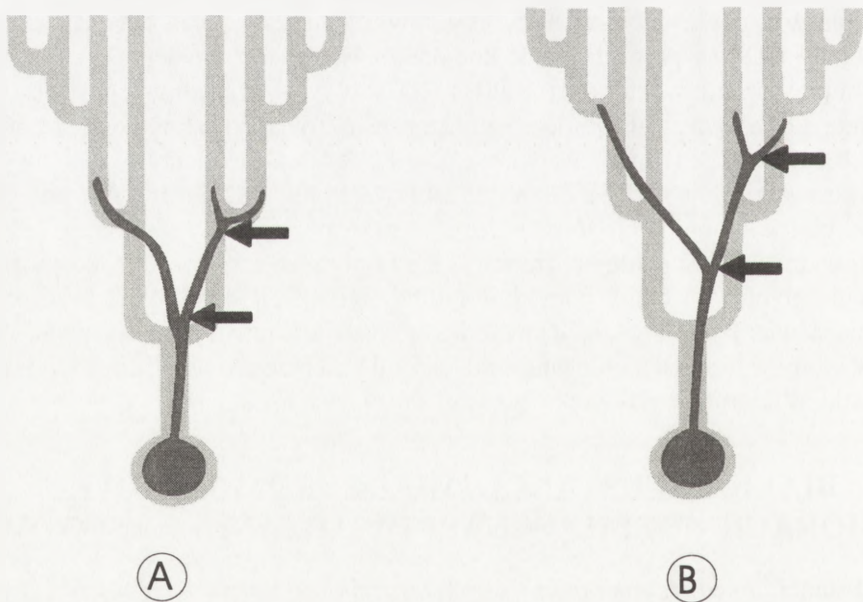
Zastosowanie techniki SPT (ang. *single particle tracking*), która polega na tym, że białka lub lipidy błonowe znakuje się przeciwciałami związanymi z kulkami lateksowymi lub koloidalnym złotem o średnicy mniejszej niż 1  $\mu\text{m}$ , umożliwia śledzenie przepływu błony komórkowej oraz dyfuzji jej składników w rosnącym aksonie. Stwierdzono, stosując tę metodę, że występuje intensywna wymiana składników błony w aksonach polegająca na ich szybkim przepływie (7  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) wzdłuż wypustki w kierunku od stożka wzrostu do ciała komórki [14].

## **BIAŁKA SUBSTANCJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ BIORĄCE UDZIAŁ W NAPROWADZANIU AKSONÓW**

Substancja międzykomórkowa (ang. *extracellular matrix* – ECM) ma złożony skład chemiczny, a zatem różne właściwości fizykochemiczne. Tworzy ją wiele różnych białek, do których zaliczane są białka kolagenowe i niekolagenowe glikoproteiny, takie jak: lamininy, fibronektyny, trombospondina, tenascyny i inne

[48]. Migracja neuronów (komórek grzebieni nerwowych) jest ukierunkowana przez białka substancji międzykomórkowej [72]. Fromherz *in vitro* wykazał, że wzrost neurytów z neuronów pijawek (*Hirudo medicinalis*) jest kontrolowany przez wzór na podłożu pokrytym ekstraktem białek ECM [27]. Dowiódł on też, że białka ECM regulują rozgałęzianie i naprowadzanie stożków wzrostu, ale końcowa (ostateczna) arboryzacja jest niezależna od podłoża [28]. Stożki wzrostu neurytów wędrują po śladach wyznaczonych przez białka ECM (rys. 3 A), natomiast neuryty nie rosną po śladach wyznaczonych przez migrujące stożki. Mają tendencje do skracania się (rys. 3 B), a ich kontakt z podłożem wydaje się być zerwany przez siły, które naprężają neuryty i wpływają na ich przyczepność do podłoża.

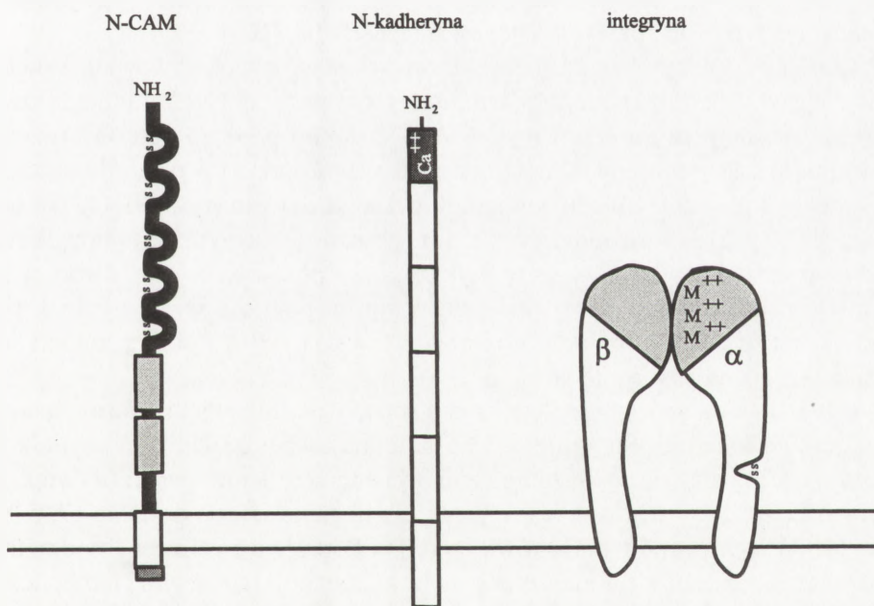
Receptorami w komórkach dla białek substancji międzykomórkowej są **integryny** – białka integralne błon komórkowych, które biorą udział w adhezji komórek do białek ECM oraz w adhezji typu komórka-komórka (rys. 4). Nazwa integryny została wprowadzona dla tych receptorów ponieważ łączą one (integrują) cytoszkielet komórki z substancją międzykomórkową [86]. Integryny są dużymi heterodimerami zbudowanymi z dwóch podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$ . Masa cząsteczkowa dla większej podjednostki  $\alpha$  waha się od 120 do 180 kD, a mniejszej  $\beta$  od 90 do 110 kD [49]. Znanych jest około 20 rodzajów heterodimerów integryn, które są utworzone przez połączenia jednej z 8 podjednostek  $\beta$  i jednej z 15 podjednostek  $\alpha$  [41, 86]. Pod-



Rys. 3. Schemat ilustrujący, w jaki sposób neuryty komórek nerwowych pijawek są naprowadzane przez białka substancji międzykomórkowej (ECM). Stożki wzrostu neurytów wędrują po śladach wyznaczonych przez białka ECM (A), natomiast neuryty mają tendencje do skracania się (rys. 3 B), a ich kontakt z podłożem wydaje się być zerwany przez siły, które naprężają neuryty i wpływają na ich przyczepność do podłoża (wg [28] zmieniony)

jednostki  $\alpha$  i  $\beta$  tworzą w integrynach zewnętrzną domenę o charakterze globularnym. Na domenie tej znajduje się obszar wiążący ligand (białka ECM lub receptor z nadrodziny immunoglobulin), a powinowactwo i swoistość wiązania ligandów zależy od dwudodatnich kationów: jonów wapniowych, magnezowych i manganowych (w zależności od rodzaju integryn).

Heterodimery integryny nie są wysoce specyficzne, co oznacza, że każda pojedyncza integryna może wiązać się z więcej niż jednym ligandem, a naturalne ligandy mogą wiązać więcej niż jeden rodzaj integryny. Pierwszym odkrytym miejscem wiązania receptorów jest sekwencja RDG (Arg-Gly-Asp), która występuje u większości ligandów integryn: w fibronektynie, fibrynogenie, kolagenie, trombospondinie i w wielu różnych białkach [41, 86]. W komórkach nerwowych główną rolę w kontakcie z białkami ECM odgrywiają kompleksy integryn, które zawierają podjednostkę  $\beta_1$ . Stwierdzono, że w stożkach wzrostu neuronów czuciowych podjednostka  $\beta_1$  jest zlokalizowana na powierzchni komórki wzdłuż filopodiów, a jej największa koncentracja obserwowana jest na czubkach filopodiów [60]. Przeciw-



Rys. 4. Białka biorące udział w adhezji komórek nerwowych. Białko N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*) występujące w neuronach należy do licznej nadrodziny CAM. Wyróżnić można w nim 5 domen immunoglobulinowych oraz dwie domeny fibronektyny typu III, które wystają na zewnątrz komórki. N-cadheryna jest białkiem, którego funkcja zależy od obecności jonów wapniowych. Przy N-końcu cząsteczki, we fragmencie wystającym na zewnątrz komórki znajduje się domena wiążąca jony wapniowe. Cechą wspólną obu tych białek jest udział w homotypowych oddziaływaniach między komórkami. Heterodimer integryny zbudowany jest z dwóch podjednostek:  $\alpha$  i  $\beta$ , w miejscu ich połączenia znajduje się region wiążący ligandy, stabilizowany w obecności jonów dwuwartościowych ( $M^{++}$ ) (wg różnych autorów)

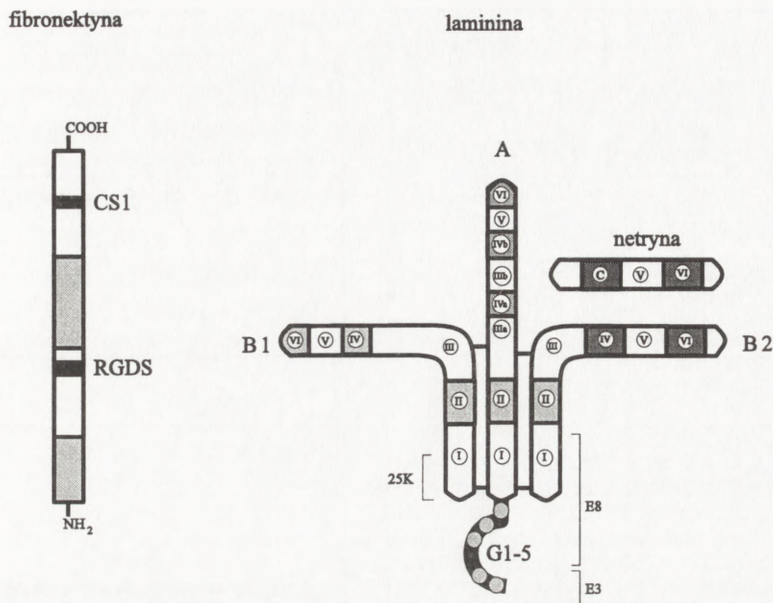
ciała skierowane przeciwko tej podjednostce hamują wydłużanie neurytów i naprowadzanie stożków wzrostu *in vitro* [1, 25, 51].

Adhezja komórkowa za pośrednictwem integryn jest bardzo ważna zarówno w procesie migracji komórek nerwowych, jak i organogenezie układu nerwowego. Integryny mogą warunkować kierunek i odległość przemieszczania się komórek. Podanie *in vivo* peptydów zawierających sekwencje RDG albo przeciwciał przeciwko integrynom hamuje całkowicie migrację komórek grzebieni nerwowych w embriionach kurzych [100].

Komórki nerwowe są zdolne do ekspresji różnych integryn, mogą więc ulegać adhezji na kilku różnych białkach. Wśród białek ECM, będących naturalnymi ligandami dla integryn, **laminina** (rys. 5) ma silne właściwości indukowania wzrostu neurytów w wielu różnego typu neuronach [18, 40]. Podobny efekt wywołuje **merozyna**, która jest izoformą lamininy [23, 25]. *In vitro* laminina wpływa na zależny od jej dawki wzrost szybkości migrujących neuronów współczulnych [62]. Badania z zastosowaniem metod immunofluorescencyjnych wykazują, że laminina występuje wzdłuż ścieżek wzrostu wydłużających się aksonów, zarówno w centralnym [59] jak i w obwodowym układzie nerwowym [85]. Jej rozmieszczenie nie jest jednak ograniczone tylko do miejsc występowania nerwów [103].

P. Clark i wsp. [11] w swoich doświadczeniach *in vitro* zaobserwowali, że neurony rozpoznają wzór podłoża pokrytego lamininą, kiedy pasy pokryte lamininą są szerokie na 6  $\mu\text{m}$  z odstępem co 6  $\mu\text{m}$  (rys. 6 A). Na takim podłożu neurony rozciągają się wzdłuż pasów lamininy. Węższe pasy, o szerokości 2 i 3  $\mu\text{m}$ , gdy są ułożone gęsto (co 2 i 3  $\mu\text{m}$ ) nie powodują ukierunkowanego wzrostu (rys. 6 B, C). Natomiast gdy wąskie (2  $\mu\text{m}$ ) pasy są oddalone o 25  $\mu\text{m}$ , obserwuje się wyraźne uporządkowanie wzrostu (rys. 6 D). Obserwacje te wykazują, że precyzja, z jaką stożki wzrostu mogą być naprowadzane, zależy od adhezywności podłoża. Istnieją jednak pewne ograniczenia ze strony komórki nerwowej dotyczące możliwości rozpoznania wzoru oddziałującego na nią podłoża.

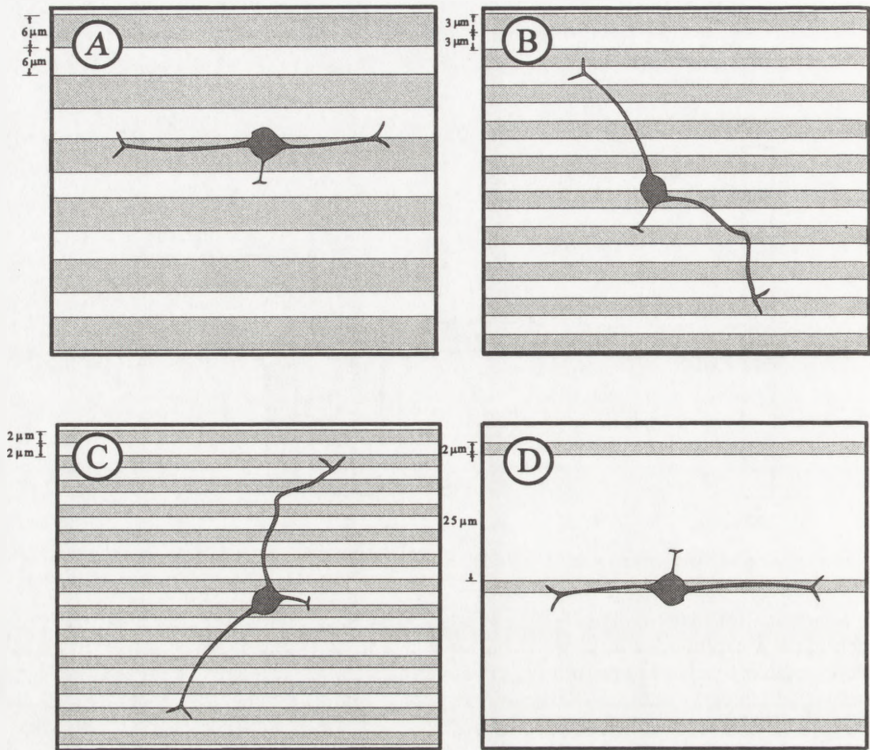
Nie jest do końca rozstrzygnięte, w jaki sposób laminina i jej izoforma merozyna oddziałują na komórki. Sugeruje się, że laminina może działać jako czynnik antyadhezyjny, który ułatwia wydłużanie aksonów i migrację neuronów przez zwiększanie ruchliwości stożków wzrostu, a nie przez przyleganie ich do podłoża [7, 51, 62]. Stożki wzrostu neuronów z siatkówki zarodka kurczenia rosnące na podłożu z lamininy charakteryzują się mniejszym lamellipodium oraz dłuższymi i mniej licznymi filopodiami niż rosnące na podłożach o większej adhezywności [6]. Doświadczenia Kuhna i wsp. [51] pokazują, że laminina powoduje trwały wzrost prędkości migracji stożków wzrostu neuronów pochodzących ze zwojów rdzeniowych (ang. *dorsal roots ganglions* – DRG). Neurony DRG rosnące na podłożu pokrytym fibronektyną były naprowadzane przez rozmieszczone w płaszczyźnie kulki o średnicy 4,5  $\mu\text{m}$  pokryte lamininą. Kontakt stożka wzrostu neuronu DRG za pośrednictwem filopodiów z kulką pokrytą lamininą powodował gwałtowne przyspieszenie migracji



Rys. 5. Schemat ilustrujący budowę białek substancji międzykomórkowej (fibronektyny i lamininy) biorących udział w naprowadzaniu komórek nerwowych. **Fibronektyna** ma dwie domeny odpowiedzialne za przyczepianie, rozplaszczanie i migrację komórek nerwowych: znajdującą się przy C-końcu domenę CS1 oraz wiążącą integryny domenę RDGS. W cząsteczce **lamininy** domena wiążąca integryny znajduje się w łańcuchu B2 (nazwana domeną E8). Również domeny 25K (w łańcuchu B1) i E3 (w łańcuchu A) mają udział w regulacji wzrostu neurytów. Na schemacie przedstawiono również proporcje i podobieństwo między netrynami a lamininą. Cząsteczki netryny 1 i 2 wykazują 40% homologii w regionie domeny VI, a w regionie domeny V 47–48% homologii do łańcucha B2 heterodimeru lamininy (wg [21, 88] zmieniony)

stożka (wydłużania neurytu). Jeżeli w płaszczyźnie rozmieszczonych było kilka kulek, to neuryty wydłużały się po ścieżce wyznaczonej przez kulki. Efekt naprowadzania i przyspieszania wzrostu był obserwowany jedynie wtedy, gdy kontakt komórki nerwowej z kulką zachodził za pośrednictwem stożka wzrostu i filopodiów.

Również udział lamininy w rozwoju neurytów nie jest oczywisty. Przeciwciała skierowane przeciwko domenie łańcucha B2 lamininy, która jest odpowiedzialna za przyczepianie komórek i pobudzanie wzrostu neuronów, hamują migrację neuronów ziarnistych z mózdzka myszy w kokulturach *in vitro* [63]. Domena łańcucha B2 zwana domeną E8 jest miejscem wiązania receptora komórkowego –  $\alpha_6\beta_1$  integryny i znajduje się przy C-końcu cząsteczki lamininy, w tak zwanym długim ramieniu białka (rys. 5) [24]. E8 nie jest jedyną domeną oddziałującą na wzrost neurytów. W łańcuchu B1 znajduje się domena 25K, a w łańcuchu A domena E3 wiążąca heparynę i siarczan heparyny. Przeciwciała skierowane przeciwko tym sekwencjom hamują wzrost neurytów [22, 25]. Peptydy zawierające sekwencję IK-VAV, która znajduje się w łańcuchu A lamininy i odpowiada za wydłużanie się



Rys. 6. Clark i wsp. [11] uzyskali efekt naprowadzania neurytów hodując neurony z mózgu zarodka kury na podłożu pokrytym pasami lamininy. (A) Neurony rozciągają się wzdłuż pasów lamininy o szerokości 6  $\mu\text{m}$ . (B, C) Kiedy podłoże jest węższymi pasami lamininy, o szerokości 2 i 3  $\mu\text{m}$ , w odstępach 2 i 3  $\mu\text{m}$ , nie obserwuje się efektu ukierunkowanego wzrostu neurytów. (D) Wąskie pasy lamininy o szerokości 2  $\mu\text{m}$ , oddalone od siebie o 25  $\mu\text{m}$ , ukierunkowują wydłużanie się neurytów wzdłuż pasów

neurytów, hamują rozrost wypustek z neuronów z obwodowego układu nerwowego [1]. Przypuszcza się, że domeny znajdujące się przy karboksylowym końcu cząsteczki lamininy odgrywają decydującą rolę w reakcji naprowadzania stożków wzrostu neuronów DRG przez lamininę [51].

Yip i Yip [103] wykorzystując swoje doświadczenia *in situ* zasugerowali, że laminina nie jest czynnikiem decydującym w rozwoju obwodowego układu nerwowego. Mikroiniekcja antylamininy do zarodków kury nie wpływa na kierunek wzrostu neuronów współczulnych obwodowego układu nerwowego. Podobnie mikroiniekcja blokerów funkcji lamininy: INO (monoklonalnego przeciwciała wiążącego się z kompleksem laminina-proteoglikan siarczanu heparyny) oraz JG22 (monoklonalnego przeciwciała rozpoznającego receptor komórkowy –  $\beta_1$  integrinę zaangażowaną w adhezję komórki do fibronektyny, kolagenu i lamininy) nie zakłóca normalnego wzrostu neuronów współczulnych. *In vitro* antylaminina i JG22 hamują

wzrost neuronów na podłożu z lamininy. Mikroiniekcja lamininy podczas eksperymentów *in vivo* z czynnikami blokującymi lamininę nie spowodowała tworzenia alternatywnych połączeń nerwowych.

Kolejnym białkiem biorącym udział w migracji i naprowadzaniu komórek nerwowych jest **fibronektyna**. Stwierdzono, stosując metody znakowania immunofluorescencyjnego, że rozmieszczenie fibronektyny i jej receptorów komórkowych jest zgodne ze ścieżkami migracji komórek grzebieni nerwowych kurczenia, nie jest jednak ograniczone tylko do tych miejsc [100]. Rozpoznano w fibronektynie dwie domeny wiążące integryny odpowiedzialne za przyczepianie, rozplaszczanie i migrację komórek nerwowych: RDGS i CS1 (rys. 5). Grupa pracująca pod kierunkiem J. P. Thiery'ego zbadała szczegółowo rolę tych domen we wroście i migracji komórek grzebieni nerwowych *in vivo* i *in vitro* [21, 100]. Stwierdzili oni, że polipeptydy działające kompetycyjnie na miejsce wiązania integryny (RDGS) obniżają zdolność komórek do przyczepiania się i rozplaszczania *in vitro*, obniżają znacznie ich persystencję ruchu (z 0,70 do 0,08) oraz *in vivo* zakłócają migrację komórek cewki nerwowej. Natomiast zablokowanie domeny CS1 wpływa na szybkość przemieszczania się neuronów. Wynika z tego, że komórki grzebieni nerwowych potrzebują dwóch miejsc wiązania na fibronektynie, aby móc się przemieszczać w sposób prawidłowy.

Z doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* przez grupę Letourneau [31, 60] wynika, że stożki wzrostu neuronów DRG wykazują zróżnicowaną reakcję ruchową po kontakcie z granicą między podłożem pokrytym lamininą (LM) a podłożem pokrytym fibronektyną (FN). 79% stożków wzrostu rosnących na lamininie zmieniło swój kierunek wzrostu po zetknięciu się z granicą LM/FN. Zmiana kierunku polegała na tym, że stożki wzrostu skręcały na granicy LM/FN o  $90^{\circ}$  i rosły dalej wzdłuż granicy pozostając na pierwotnym podłożu (LM) lub rosły dalej na nowym podłożu (FN), ale ich kierunek wzrostu był zmieniony o co najmniej  $40^{\circ}$  w stosunku do pierwotnego. Natomiast kontakt stożków wzrostu neuronów DRG z dyskretnym źródłem fibronektyny, jakim są kulki pokryte fibronektyną, powoduje wyraźne spowolnienie wydłużania neurytu. Nie zauważono natomiast "unikania" przez stożki wzrostu źródła fibronektyny [51].

Głównym budulcem substancji międzykomórkowej są **białka kolagenowe**. Występują one obficie wzdłuż ścieżek migracji komórek nerwowych i przypuszcza się, że mają duży udział w rozwoju układu nerwowego. Zauważono, że jednorodne, równoległe uporządkowanie włókien kolagenu w okolicach cewy nerwowej związane jest z przemieszczaniem się komórek grzebieni nerwowych, ich polaryzacją kształtu i ukierunkowaną migracją *in vivo* [72]. Również *in vitro* zbadano, że białka kolagenowe silnie oddziałują na komórki grzebieni nerwowych [80]. Stwierdzono, że spośród wielu typów kolagenu, typy: I, IV i VI wywołują ruchliwość komórek grzebieni nerwowych, która jest niezależna od innych białek substancji międzykomórkowej [80, 81]. Perris i wsp. poświęcili wiele uwagi na zbadanie mechanizmów



przyczepiania się i migracji komórek nerwowych na kolagenach [80, 81, 82]. Komórki grzebieni nerwowych oddziałują z kolagenem I za pośrednictwem receptora  $\alpha_1\beta_1$  integryny przez wiązanie z fragmentem CNBr3 kolagenu, natomiast oddziaływanie komórek z kolagenem IV odbywa się przy udziale klasy  $\beta_1$  integryny, ale innej niż  $\alpha_1\beta_1$ . Przeciwciała skierowane przeciwko  $\beta_1$  integrynie hamują przyczepianie i migrację neuronów również do kolagenu VI. Reakcję ruchową komórek grzebieni nerwowych obserwuje się po ich kontakcie z różnymi fragmentami kolagenu IV i VI: znajdującymi się przy C-końcu w łańcuchach  $\alpha_1(VI)$  i  $\alpha_2(VI)$  oraz przy N-końcu w łańcuchu  $\alpha_3(VI)$ . Perris sugeruje kooperatywne oddziaływanie miejsc wiążących w kolagenie oraz że migracja i przyczepianie komórek nerwowych *in vitro* są silnie uzależnione od supramolekularnej organizacji kolagenu.

## UDZIAŁ BIAŁEK ADHEZJI MIĘDZYKOMÓRKOWEJ

Do białek zaangażowanych w adhezję typu komórka-komórka zaliczane są białka z nadrodziny immunoglobulin – **białka CAM** (ang. *cell adhesion molecules* – CAM) i zależne od jonów wapnia **kadheryny** (rys. 4). Jak stwierdzono, oba typy białek mają udział w naprowadzaniu i ukierunkowaniu wzrostu neuronów [40].

Istnieją tak zwane pierwotne i wtórne białka CAM. Do tych pierwszych zaliczane jest między innymi białko **N-CAM** (ang. *neural cell adhesion molecule*). Jest to glikoproteina integralna błony, która występuje w postaci różnych izoform w rozwoju zarodkowym między innymi w ektodermie, w komórkach grzebieni nerwowych oraz nabłonku epitelialnym otaczającym neurony [100]. N-CAM odpowiada za adhezję neuronów do innych komórek, które stanowią dla nich podłoże, a jego rola we wzroście neuronów polega na tym, że białko to tworzy warunki dla wydłużania się aksonów oraz ma udział w procesie tworzenia wiązek nerwów [18, 29]. Podczas rozwoju zarodkowego ekspresja embrionalnej formy N-CAM (200–230 kD) charakteryzującej się dużą ilością reszt kwasów sjałowych (tzw. **PSA-CAM**), zmienia się w kierunku form bardziej adhezywnych, z mniejszą ilością reszt sjałowych o masach cząsteczkowych 120, 140, i 180 kD, które występują w wykształconym układzie nerwowym [44]. Na przykład w neuronach czuciowych pochodzących z DRG zarodka kurczęcia ekspresja białek CAM jest bardzo zróżnicowana [38]. Neurony unerwiające skórę oraz mięśnie (odpowiednio: *cutaneous sensory neurons* i *muscle sensory neurons*) wykazują znaczne różnice w rozmieszczeniu na ich powierzchni CAM i kadheryn [91]. W stożkach wzrostu *muscle s. n.* zauważono większe ilości N-CAM, PSA-N-CAM, SC1/DM-GRASP/BEN i **N-kadheryny** niż w *cutaneous s. n.* Natomiast poziom **axoniny-1** (białka biorącego udział w tworzeniu wiązek nerwów) jest w obu typach komórek jednakowy. Wydaje się więc bardzo prawdopodobne, że ekspresja różnych CAM w układzie nerwowym podczas rozwoju zarodkowego jest związana z tworzeniem precyzyjnych sieci nerwów i połączeń nerwowych.

Białko **Ng-CAM** (ang. *neuron-glia cell adhesion molecule*) zaliczane jest do białek wtórnych, jego ekspresja zachodzi w późniejszych stadiach rozwoju organizmu i jest ograniczona do niektórych typów komórek. Białko to występuje w rdzeniu kręgowym zarodków kury w miejscach kontaktu z nabłonkiem neuroepitelialnym i innymi neuronami, wzdłuż aksonów i w stożkach wzrostu. Natomiast nie ma go w miejscu kontaktu aksonów i stożków wzrostu z błoną podstawną (*basal lamina*) okalającą rdzeń kręgowy [90]. Neurony z siatkówki rosnące na podłożu pokrytym białkami CAM (L1/8D9) charakteryzują się tworzeniem szerokich, rozplaszczonych lamellipodiów oraz nielicznymi krótkimi filopodiami [6].

Stwierdzono, że N-CAM mają udział w procesie regeneracji nerwów *in vivo* [53]. Podanie poliklonalnych przeciwciał przeciwko N-CAM zakłóca i opóźnia regenerację nerwów u myszy. Przypuszcza się, że białka adhezji komórkowej, podobnie jak **tenascyna**, są zaangażowane w proces naprowadzania aksonów podczas reinerwacji.

## CHEMOTROPIZM KOMÓREK NERWOWYCH

Pierwsze obserwacje ukierunkowanego wzrostu neurytów w gradiencie stężeń substancji poczynił *in vitro* Letourneau w 1978 roku [55]. Zaobserwował on dodatnią odpowiedź komórek nerwowych na rozwijający się gradient NGF (czynnika wzrostu nerwów, ang. *nerve growth factor*). Późniejsze doświadczenia przeprowadzone w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych przyniosły więcej dowodów na to, że istnieją drobno- i wielkocząsteczkowe substancje, które mają wpływ na ukierunkowany wzrost komórek nerwowych. Zaczęto przeprowadzać eksperymenty *in vitro*, w których eksplanty pochodzące z tkanki nerwowej hodowano w kokulturach z komórkami docelowymi w żelu kolagenowym. Obserwowano, czy wydłużające się aksony są naprowadzane przez komórki docelowe, czy też te ostatnie wywołują efekt hamujący wzrost [3]. Doświadczenia te przyczyniły się do odkrycia nowych czynników białkowych powodujących efekt chemotropiczny [16, 65, 98]. Również doświadczenia *in vivo* potwierdzają tezę, że gradient rozpuszczalnej substancji chemicznej jest odpowiedzialny za naprowadzanie aksonów i tworzenie właściwych połączeń z komórkami docelowymi znajdującymi się w pokrywie wzrokowej (*tectum opticum*), nawet jeżeli zostaną przeszczepione w inne miejsce mózgu [33].

Do substancji wielkocząsteczkowych mających wpływ na naprowadzanie rosnących aksonów zaliczyć należy rozpuszczalne białka, takie jak: NGF, netryny, kolapsyna, RAGS itp. NGF, jak stwierdzono, działa naprowadzająco na komórki nerwowe pochodzące z obwodowego [55] i centralnego układu nerwowego [4] powodując *in vitro* wydłużanie się aksonów w kierunku źródła NGF. Nie stwierdzono natomiast jego udziału w rozwoju układu nerwowego [97] ani w procesach regeneracyjnych *in vivo* [17].

Grupa badaczy pod kierunkiem M. Tessier-Lavigne [46, 88] wyizolowała i sklonowała białka, które mają charakter neurotropiczny w rozwoju centralnego układu nerwowego. Białkami tymi są **netryny**: netryna 1 i netryna 2, o masie cząsteczkowej odpowiednio 78 kD i 75 kD, które oczyszczono z frakcji błonowej mózgu zarodka kury. Białka te występują również w formie rozpuszczalnej, a *in vitro* wywołują ukierunkowany wzrost aksonów spoidłowych z rdzenia kręgowego. Stwierdzono, że aksony spoidłowe zmieniają pierwotny kierunek wzrostu i obierają nowy, w stronę źródła netryn, jakim mogą być eksplanty z blaszki brzusznej cewy nerwowej (ang. *floor-plate*) lub transfekowane komórki COS uwalniające rekombinantowe netryny [46]. Przypuszcza się, że netryna 1 jest chemoatraktantem uwalnianym przez komórki blaszki brzusznej cewy nerwowej, które są celem pośrednim aksonów spoidłowych rosnących do środka (*ventral midline*) rdzenia kręgowego. Stwierdzono bowiem, że w komórkach blaszki brzusznej zachodzi ekspresja mRNA dla netryny 1 oraz że komórki COS transfekowane cDNA dla netryny 1 oddziałują *in vitro* w podobny sposób jak eksplanty pochodzące z blaszki brzusznej na aksony spoidłowe. T. Serafini i wsp. [88] wykazali również, że netryny odznaczają się dużą homologią do łańcucha B<sub>2</sub> heterodimeru lamininy (rys. 5). Homologia ta w regionie domeny VI jest rzędu 40%, a w regionie domeny V 47–48%. Jeszcze większą homologią autorzy zaobserwowali między netrynami a białkiem UNC-6 (51%), które jest odpowiedzialne za naprowadzanie stożków wzrostu neuronów i migrację komórek mezodermy u *Coenorhabditis elegans* [42, 102]. Ostatnie doświadczenia grupy M. Tessier-Lavigne dowodzą dwufunkcyjnej roli netryny 1 w naprowadzaniu aksonów [12, 77]. Białko to działa jako chemorepelent na aksony z nerwu błoczkowego unerwiającego mięsień skośny górny gałki ocznej, powodując *in vivo* naprowadzanie aksonów w kierunku przeciwnym do źródła netryny 1 [19]. Podobny efekt autorzy zaobserwowali *in vitro* hodując eksplanty z brzusznej części rdzenia kręgowego zarodka szczura w obecności komórek blaszki brzusznej cewy nerwowej i komórek COS wydzielających netrynę 1.

W ostatnich latach odkryto i opisano również inne białka powodujące naprowadzanie aksonów w malejącym gradiencie stężeń [84]. Jednym z tych białek jest **RAGS** (ang. *repulsive axon guidance signal* – RAGS), glikoproteina błonowa o masie cząsteczkowej 25 kD [20] sprzężona z GPI (glikozylfosfatydilinozytolem). Białko RAGS wykazuje dużą homologię do ligandów receptorów podklasy Eph (receptorów kinazy tyrozynowej – RTKs) [47]. Stwierdzono metodą hybrydyzacji *in situ* stopniowe rozmieszczenie mRNA dla białka RAGS w części tylnej płata wzrokowego, w czasie powstawania połączeń nerwowych między pęczkiem wzrokowym a pokrywą wzrokową. Sugeruje to, że podczas rozwoju zarodkowego utrzymywany jest gradient RAGS dzięki zróżnicowaniu jego ekspresji. Doświadczenia *in vitro* wykazują, że rekombinantowy RAGS oraz frakcje błonowe pochodzące z tkanki biorącej udział w naprowadzaniu aksonów siatkówkowych powodują zahamowanie się struktury stożków wzrostu – wycofywanie filopodiów i zahamowanie

wzrostu [2, 20]. Uzyskano również efekt ukierunkowanego wzrostu aksonów *in vitro* hodując neurony z pęczków wzrokowych na podłożu pokrytym pasami rekombinantowego RAGS [20]. Aksony wydłużały się wzdłuż pasów unikając kontaktu z białkiem RAGS. Znane jest też inne białko, które podobnie jak RAGS jest sprzężone z GPI i powoduje zahamowanie wzrostu neuronów. Glikoproteina błonowa **GP55** o masie cząsteczkowej 55 kD została oczyszczona z frakcji szkieletu błonowego mózgu kurczęcia [9]. Jak stwierdzono, GP55 utrudnia adhezję neuronów do podłoża pokrytego tym białkiem oraz blokuje wydłużanie się neurytów z neuronów DRG i pochodzących z mózgu zarodka kury.

Kolejnym białkiem biorącym udział w naprowadzaniu aksonów przez hamowanie ich ruchliwości jest **kolapsyna** [19, 47]. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 100 kD wyizolowana z frakcji błonowej mózgu kury, która *in vitro* powoduje załamanie się struktury (ang. *collapse*) stożków wzrostu neuronów [66]. Sugeruje się, że kolapsyna działa jako ligand, który naprowadza specyficzne stożki wzrostu hamując ich wzrost i ruchliwość. Zewnątrzkomórkowa domena kolapsyny wykazuje dużą homologię do białek z rodziny **semaforyn**: pochodzącego od *Drosophila* białka **D-Sema II** (dawniej nazywanego **fasciną IV**) [66] i ludzkiego białka **H-Sema III** [50]. W tak zwanej domenie Sema obejmującej ok. 500 aminokwasów homologia między tymi trzema białkami wynosi 93%. Białko D-Sema II (semaforyna II) jest rozpuszczalną proteiną, która jest wydzielana w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz przez niektóre mięśnie tułowia. Jej ekspresja przez specyficzne komórki mięśniowe podczas rozwoju motorycznych połączeń nerwowych sugeruje, że semaforyna II działa jako specyficzny przekaźnik, który hamuje tworzenie synaps i końcowych rozgałęzień przez wrażliwe na nią stożki wzrostu neuronów [68]. Opisano ostatnio białko pośredniczące prawdopodobnie w przekazywaniu sygnału między receptorem kolapsyny a białkami G [32]. **CRMP-62** (ang. *collapsin response mediator protein* – CRMP) o masie cząsteczkowej 62 kD wykazuje dużą homologię do białka UNC-33 niezbędnego w rozwoju układu nerwowego nicieni. Ekspresja mRNA dla CRMP-33 w mózgu zarodka kury jest najwyższa w siódmym dniu rozwoju i spada o 95% po osiągnięciu dojrzałości. Funkcja tego białka prawdopodobnie nie jest ograniczona tylko do odpowiedzi komórki na kolapsynę, gdyż wykryto je w siatkówce, której komórki nie są na kolapsynę wrażliwe [32].

Kolejną grupą rozpuszczalnych związków chemicznych mających właściwości chemoatrakcyjne są **neurotransmitery**. Jeszcze do niedawna nie było przekonujących dowodów na to, że neurotransmitery mogą regulować ukierunkowany wzrost neuronów. Jednak ostatnie doświadczenia przeprowadzone *in vitro* pokazują, iż przekaźniki nerwowe zmieniają kierunek wzrostu aksonów oraz wpływają na właściwości ruchowe stożków wzrostu [45, 94]. Zheng i wsp. [105] stwierdzili, że gradient chemiczny **acetylocholino** (ACh) powoduje odchylenie aksonów od pierwotnej osi wzrostu w stronę rosnącego stężenia ACh. Reakcję tę poprzedza zwiększenie liczby filopodiów w stożku wzrostu od strony rosnącego gradientu

oraz wzrost stężenia jonów  $[Ca^{2+}]$  w cytoplazmie stożka. Pozytywną reakcją na gradient ACh zakłóca podanie D-tubukuraryny (antagonisty nikotyny), co sugeruje, że w odpowiedź neuronów zaangażowane są kanały jonowe związane z nikotynowym receptorem ACh. Należy jednak zaznaczyć, iż reakcja komórek nerwowych na gradient przekazników jest wysoce specyficzna. Acetylocholina nie powoduje zmian w ruchliwości stożków wzrostu neuronów B19 pochodzących ze ślimaka *Helisoma trivolvis* [94], znosi natomiast hamujący wpływ serotoniny na ruchliwość tych stożków. Na to, iż na ten sam czynnik rozmaite neurony mogą różnie reagować, wskazuje obserwacja, że komórki nerwowe z rdzenia kręgowego zarodka myszy reagują na obecność ACh zahamowaniem wzrostu i wycofywaniem filopodiów [78].

Nie ma dotychczas bezpośrednich dowodów na to, że gradient neurotransmiterów powoduje ukierunkowany wzrost neuronów *in vivo*. Istnieją jednak pewne przypuszczenia, iż przekazniki regulują chemotropiczną odpowiedź komórek nerwowych podczas rozwoju centralnego układu nerwowego. Stwierdzono na przykład, że w rdzeniu kręgowym zarodka szczura są populacje neuronów spoidłowych, które produkują substancję P. Receptory dla **substancji P** (receptory NK1) wykryto w komórkach blaszki brzusznej cewy nerwowej, które są celem pośrednim dla rosnących aksonów spoidłowych [16]. Przeprowadzone testy *in vitro* na eksplantach hodowanych w żelu kolagenowym wykazały, że dodanie substancji P (lub jej agonisty GR 73632) do hodowli zwiększa ilość włókien tworzonych przez eksplant grzbietowej części rdzenia kręgowego (zawierającego aksony spoidłowe) w stronę eksplantu blaszki brzusznej. Sugeruje się, że substancja P może modulować produkcję lub uwalnianie przez komórki blaszki brzusznej cewy nerwowej chemoatraktanta (netryn?), który oddziałuje na aksony spoidłowe.

## ELEKTROTROPIZM KOMÓREK NERWOWYCH

Istnieje wiele dowodów na to, że endogenne pole elektryczne jest zaangażowane w regulację rozwoju zarodkowego zwierząt [39]. Komórki nerwowe reagują *in vitro* na zewnętrzne pole elektryczne o niewielkim natężeniu (0,7 V/cm). Zjawisko elektrotaksji i kierunkowego wzrostu komórek, w tym także neuronów zostało szerzej omówione przez autorkę tego artykułu we wcześniejszej pracy przeglądowej [95]. Odpowiedź neuronów na zewnętrzne pole elektryczne objawia się kierunkowym wzrostem neuronów w stronę katody oraz tworzeniem większej liczby rozgałęzień neurytów po stronie katodalnej komórki [70, 71]. Miejscami, gdzie zostaje zapoczątkowana reakcja na zewnętrzne pole elektryczne, są stożki wzrostu, podobnie jak w wielu innych rodzajach reakcji tropicznych.

Doświadczenia ostatnich lat, a szczególnie prace wykonane przez C. D. McCaiga i współpracowników [26, 69] wskazują na duży udział jonów dwuwartościowych ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) w reakcji ukierunkowanego wzrostu komórek nerwowych w polu elektrycznym. Nieorganiczne blokery kanałów wapniowych ( $Co^{2+}$ ,  $La^{3+}$ ) hamują

reakcję naprowadzania aksonów w polu elektrycznym, natomiast blokery organiczne, takie jak nifedypina i diltiazem, nie powodują zmiany odpowiedzi komórek nerwowych pochodzących z embrionów *Xenopus* [69]. Różnica ta wynika z tego, jak sugeruje McCaig, że w stożkach wzrostu embrionalnych komórek nerwowych *Xenopus* nie występują zależne od nifedypiny kanały wapniowe typu L. Podanie jonoforu A23187 z nieorganicznymi blokerami kanałów wapniowych powoduje naprowadzanie aksonów w stronę anody, a więc odwrócenie reakcji elektrotropicznej. Stwierdzono również, że antybiotyki z rodzaju aminoglikozydów, takie jak: neomycyna i gentamycyna, całkowicie hamują asymetryczny wzrost neuronów w polu elektrycznym [26]. Aminoglikozydy, które są polikationami, mogą zmieniać orientację neuronów przez wpływ na rozkład integralnych białek błonowych na powierzchni komórki, przez hamowanie rozpadu fosfatydyloinozytoli [35] lub kompetytywne blokowanie potencjałowo zależnych kanałów wapniowych [79].

W 1989 roku C. D. McCaig [69] zaproponował, że w zewnętrznym polu elektrycznym dochodzi do asymetrycznego rozkładu integralnych białek błonowych (ang. *internal membrane proteins* – IMP) w stożkach wzrostu neurytów na skutek dyfuzji lateralnej. Kierunek migracji IMP zależy od ich ładunku względem średniego ładunku powierzchni komórki. Wiele białek błonowych ma ładunek ujemny, jednak ich akumulacja po stronie katody jest możliwa dzięki istnieniu sił elektroosmotycznych, niejednokrotnie silniejszych niż elektroforeza białek w błonie wywołana polem elektrycznym. Aminoglikozydy oraz inne polikationy, a także podwyższone stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  mogą zmieniać elektrotropizm komórek nerwowych drogą modulacji rozkładu IMP, takich jak na przykład kanały jonowe, co w konsekwencji powoduje inny niż wywołany polem elektrycznym napływ jonów do stożka wzrostu neurytu [26].

## MECHANIZMY NAPROWADZANIA AKSONÓW

W ciągu ostatnich kilkunastu lat zaprezentowano kilka modeli wyjaśniających mechanizmy naprowadzania aksonów. Ich wspólną cechą jest wskazywanie na znaczącą rolę stożków wzrostu, a w szczególności filopodiów w procesie ukierunkowanego wydłużania się aksonów. Jednym z pierwszych jest zaproponowany w 1981 roku przez P. C. Letourneau [57], a następnie poparty doświadczeniami S. R. Heidemanna i R. E. Buxbauma [36, 104] model holowania (ang. *pulling*) stożków wzrostu. Zakłada on, że filopodia przyczepiając się do podłoża o silnych właściwościach adhezyjnych wywołują naprężenia, które ciągną (holują) stożek wzrostu w kierunku większej adhezywności. Inny model zaproponowany przez D. J. Goldberga i D. W. Burmeistera [30] sugeruje, że filopodia są platformą do tworzenia wstęgowatych, pozbawionych pęcherzyków struktur (ang. *veils*) między filopodiami, czego konsekwencją jest powiększanie się płaszczyzny zajmowanej przez stożek wzrostu w sposób asymetryczny. Goldberg i Burmeister zakładają, że kierunek

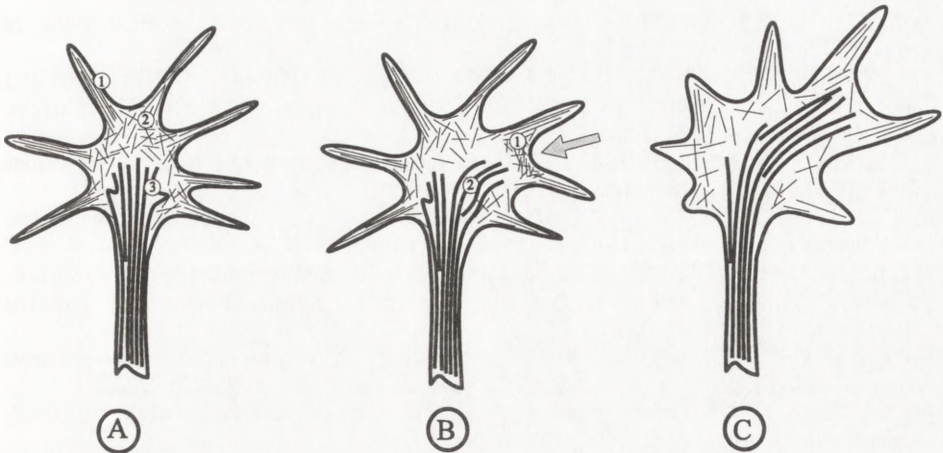
wydłużania się aksonu jest uzależniony od selektywnego tworzenia tych struktur oraz od procesu ich "dojrzwania", to znaczy wypełniania przez organella komórkowe oraz elementy cytoszkieletu (mikrotubule).

Na podstawie doświadczeń *in vitro* i *in situ* dotyczących oddziaływania stożków wzrostu poszczególnych neurytów z tak zwanymi komórkami naprowadzającymi (ang. *guidepost cells*) można przypuszczać, że decydującą rolę w wyborze drogi przez dany stożek wzrostu ma kontakt pojedynczych filopodiów z powierzchnią komórki naprowadzającej [73, 75, 99]. Sygnały, jakie odbierają filopodia po zetknięciu się z komórkami znajdującymi się na szlaku wzrostu neurytów, powodują bardzo zróżnicowane reakcje ruchowe i wzrostowe, na przykład rozgałęzianie aksonów [5], wycofywanie stożków wzrostu lub przeciwnie – "wchodzenie" stożków wzrostu na powierzchnię komórki naprowadzającej i badanie jej za pomocą filopodiów [37, 73]. Pozytywny bodziec, to znaczy taki, który powoduje wzmocnienie aktywności ruchowej neurytów, pobudza stożek wzrostu do tworzenia nowych filopodiów, pogrubienia ich oraz do zwiększenia powierzchni lamellipodium w okolicach kontaktu ze źródłem bodźca [73]. Bodziec negatywny powoduje załamanie się struktury stożków wzrostu [37, 66, 73], wycofywanie filopodiów i zmniejszenie ich liczby [2, 19, 20, 43, 73], a w konsekwencji zmianę kierunku wydłużania się neurytu w celu uniknięcia źródła bodźca [20, 73].

Na podstawie obserwacji różnych układów doświadczalnych *in vitro* i *in situ* można podzielić reakcję zmiany kierunku ruchu stożka wzrostu na trzy oddzielne etapy: *badanie* (ang. *exploration*), *wyбір kierunku wzrostu* (ang. *site selection*) oraz ostatni etap – *stabilizacja struktury i tworzenie aksonu* (ang. *site stabilization*) [96]. Podczas pierwszego etapu zachodzi intensywne badanie środowiska otaczającego stożki wzrostu za pośrednictwem filopodiów i lamellipodiów, które są swego rodzaju antenami odbierającymi bodźce zewnętrzne [15, 30, 31, 51, 73, 75]. Te ciągle zmiany kształtu stożka wzrostu są uzależnione od przebudowy szkieletu aktynowego. Zarówno w filopodiach, jak i w lamellipodiach dodatnie końce filamentów aktynowych znajdują się przy zewnętrznej błonie stożka wzrostu [61] (rys. 7 A). Podczas drugiego etapu zmiany w kształcie stożka wzrostu nie są jeszcze zauważalne, natomiast występują szybkie zmiany w strukturze cytoszkieletu na skutek zadziałania bodźca naprowadzającego (rys. 7 B). Zauważalne jest nagromadzenie filamentów aktynowych w miejscu kontaktu [64, 74] oraz wycofywanie ich z obszaru sąsiedniego. Obserwowane jest również wydłużanie mikrotubul w stronę miejsca nagromadzenia aktyny [64, 87]. Etap trzeci to stabilizacja struktury cytoszkieletu i w konsekwencji zmiana kierunku wzrostu aksonu (rys. 7 C).

## PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich kilku lat dokonał się duży postęp w badaniach nad zjawiskami ukierunkowanego wzrostu komórek nerwowych. Zastosowanie kombinacji nowych



Rys. 7. (A) Szkielet stożka wzrostu stanowią filamenty aktynowe i mikrotubule. *Filamenty aktynowe* ustawione są dodatnimi końcami (tam gdzie zachodzi polimeryzacja monomerów aktyny) na zewnątrz stożka wzrostu. W filopodiach często są zebrane w wiązki ustawione prostopadle względem krawędzi lamellipodium (1). Natomiast wewnątrz lamellipodium ich układ jest bardziej chaotyczny (2). *Mikrotubule* wchodzą do środka stożka wzrostu, gdzie mogą być ułożone w sposób nieregularny (3), czasem mikrotubule wnikają głęboko w strukturę lamellipodium. (B) Po zadziaaniu bodźca naprowadzającego (strzałka) następuje nagromadzenie filamentów aktynowych (1) w miejscu kontaktu z bodźcem, oraz przemieszczenie ich z obszaru sąsiedniego. Występuje również wydłużanie mikrotubul w kierunku miejsca kontaktu (2). (C) Stabilizacja struktury cytoszkieletu i zmiana kierunku wzrostu (wg [96] zmienione)

technik badań: metody trwałego przyżyciowego barwienia fluorescencyjnego komórek i elementów cytoszkieletu, techniki poklatkowej rejestracji obrazu, mikroskopii konfokalnej oraz komputerowej analizy obrazu pozwala na wielogodzinne obserwacje żywych stożków wzrostu *in situ* i *in vitro*. Wykorzystanie technik rekombinantowych umożliwiło oznaczenie nowych białek warunkujących naprowadzanie neurytów oraz poznanie mechanizmów ich oddziaływania na komórkę nerwową. Badanie tych zjawisk jest ważne dla postępu wiedzy w embriologii i neurobiologii, stąd można oczekiwać nowych, ciekawych odkryć i dalszego postępu badań w tych dziedzinach.

*Składam podziękowania panu prof. Włodzimierzowi Korohodzie za cenne uwagi merytoryczne, bardzo pomocne przy pisaniu tego artykułu.*

## LITERATURA

- [1] AGIUS E, SAGOT Y, DUPRAT AM, COCHARD P. Antibodies directed against the beta 1-integrin subunit and peptides containing the IKVAV sequence of laminin perturb neurite outgrowth of peripheral neurons on immature spinal cord substrata. *Neurosci* 1996; **71**: 773–786.
- [2] BAIER H, BONHOEFFER F. Axon guidance by gradients of target-derived component. *Science* 1992; **255**: 427–475.



- [3] BAIER H, BONHOEFFER F. Attractive axon guidance molecules. *Science* 1994; **265**: 1541–1542.
- [4] BEHAR TN, SCHAFFNER AE, COLTON CA, SOMOGYI R, OLAH Z, LEHEL C, BARKER JL. GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J Neurosci* 1994; **14**(1): 29–38.
- [5] BERMAN SA, MOSS D, BURSZTAJN S. Axonal branching and growth cone structure depend on target cells. *Dev Biol* 1993; **159**: 153–162.
- [6] BURDEN-GULLEY SM, PAYNE HR, LEMMON V. Growth cones are actively influenced by substrate-bound adhesion molecules. *J Neurosci* 1995; **15** (6): 4370–4381.
- [7] CALOF AL, LANDER AD. Relationship between neuronal migration and cell substratum adhesion: laminin and merosin promote olfactory neuronal migration but are anti-adhesive. *J Cell Biol* 1991; **115**: 1281–1288.
- [8] CHIEN CB, ROSENTHAL DE, HARRIS NA, HOLT CE. Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain. *Neuron* 1993; **11**: 237–251.
- [9] CLARK GA, MOSS DJ. Identification of a novel protein from adult chicken brain that inhibits neurite outgrowth. *J Cell Sci* 1994; **107**: 3393–3402.
- [10] CLARK P, CONNOLLY P, CURTIS ASG, DOW JAT, WILKINSON CDW. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *J Cell Sci* 1991; **99**: 73–77.
- [11] CLARK P, BRITLAND S, CONNOLLY P. Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. *J Cell Sci*. 1993; **105**: 203–212.
- [12] COLAMARINO SA, TESSIER-LAVIGNE M. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 1995; **81**: 621–629.
- [13] CRAIG AM, WYBORSKI RJ, BANKER G. Preferential addition of newly synthesized membrane protein at axonal growth cones. *Nature*. 1995; **375**: 592–594.
- [14] DAI J, SHEETZ MP. Axon membrane flows from the growth cone to the cell body. *Cell* 1995; **63**: 693–701.
- [15] DAVENPORT RW, DOU P, REHDER V, KATER SB. A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Science* 1993; **361**: 721–724.
- [16] DE FELIPE C, PINNOCK RD, HUNT SP. Modulation of chemotropism in the spinal cord by substance P. *Science* 1995; **267**: 899–902.
- [17] DIAMOND TN, FOESTER A, HOLMES M, COUGHLIN M. Sensory nerves in adult rats regenerate and restore sensory function to the skin independently of endogenous NGF. *J Neurosci* 1992; **12**: 1467–1476.
- [18] DODD J, JESSELL TM. Axon guidance and patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science* 1988; **242**: 692–699.
- [19] DODD J, SCHUCHARDT A. Axon guidance: a compelling case for repelling growth cones. *Cell* 1995; **81**: 471–474.
- [20] DRESCHER U, KREMOSER C, HANDWERKER C, LÖSCHINGER J, NODA M, BONHOEFFER F. *In vitro* guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995; **82**: 359–370.
- [21] DUFOUR S, DUBAND J-L, HUMPHRIES MJ, OBARA M, YAMADA KM, THIERY JP. Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules. *EMBO J* 1988; **7**: 2661–2671.
- [22] EDGAR D, TIMPL R, THOEN H. The heparin-binding domain of laminin is responsive for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival. *EMBO J* 1984; **3**: 1463–1468.
- [23] EHRIG K, LEIVO I, ARGRAVES SW, RUOSLAHTI E, ENGVALL E. The tissue-specific basement membrane protein merosin is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3264–3268.
- [24] ENGEL J. Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* 1992; **31**: 10643–10651.

- [25] ENGVALL E, EARWICKER D, DAY A, MUIR D, MANTHORPE M, PAULSSON M. Merosin promote cell attachment and neurite outgrowth and is a component of the neurite-promoting factor of RNA Schwanoma cells. *Exp Cell Res* 1992; **198**: 115–123.
- [26] ERSKINE L, STEWART R, McCAIG CD. Electric field-directed growth and branching of cultured frog nerves: effects of aminoglycosides and polycations. *J Neurobiol* 1995; **26**: 523–536.
- [27] FROMHERZ P, SCHADEN H, VETTER T. Guided outgrowth of leech neurons in culture. *Neurosci Lett* 1991; **129**: 77–80.
- [28] FROMHERZ P, SCHADEN H. Defined neuronal arborizations by guided outgrowth of leech neurons in culture. *European J Neurosci* 1994; **6**: 1500–1504.
- [29] GARROD DR. Cell to cell and cell to matrix adhesion. *British Med J* 1993; 703–705.
- [30] GOLDBERG DJ, BURMEISTER DW. Stages in axon formation: observations of growth of *Aplysia* axons in culture using video-enhanced contrast-differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol* 1986; **103**: 1921–1931.
- [31] GOMEZ TM, LETOURNEAU PC. Filopodia initiate choices made by sensory neuron growth cones at laminin/fibronectin borders *in vitro*. *J Neurosci* 1994; **14**: 5959–5972.
- [32] GOSHIMA Y, NAKAMURA F, STRITTMATTER P, STRITTMATTER SM. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 1995; **376**: 509–514.
- [33] HARRIS W. Homing behavior of axons in the embryonic vertebrate brain. *Nature* 1986; **320**: 266–269.
- [34] HARRISON RG. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J Exp Zool* 1910; **9**: 787–846.
- [35] HEDBERG KM, BENGSTON T, SAFIEJKO-MROCZKA B, BELL PB, LINDROTH M. PDGF and neomycin induce similar changes in the actin cytoskeleton in human fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 1993; **24**: 139–149.
- [36] HEIDEMANN SR, BUXBAUMRE. Mechanical tension as a regulator of axonal development. *Neuro Toxicology* 1994; **15**: 95–108.
- [37] HONIG MG, BURDEN SM. Growth cones respond in diverse ways upon encountering neurite in cultures of chick dorsal root ganglia. *Dev Biol* 1993; **156**: 454–472.
- [38] HONIG MG, KUETER J. The expression of cell adhesion molecules on the growth cones of chick cutaneous and muscle sensory neurons. *Dev Biol* 1995; **167**: 563–583.
- [39] HOTARY KB, ROBINSON KR. Evidence of role for endogenous electrical fields in chick embryo development. *Development* 1992; **114**: 985–996.
- [40] HYNES RO, LANDER AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations and targeting of cell and axons. *Cell* 1992; **68**: 303–322.
- [41] HYNES RO. Integrins: versality, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; **69**: 11–25.
- [42] ISHII N, WADSWORTH WG, STERN BD, CULOTTI JG, HEDGECOCK EM. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron* 1992; **9**: 873–881.
- [43] JESUTHASAN S. Contact inhibition/collapse and pathfinding of neural crest cells in the zebrafish trunk. *Dev* 1996; **122**: 381–389.
- [44] JOOSTEN EAJ. Developmental expression of N-CAM epitopes in the rat spinal cord during corticospinal tract axon outgrowth and target innervation. *Dev. Brain Res* 1994; **78**: 226–236.
- [45] KATER SB, SCHIBATA A. The unique and shared properties of neuronal growth cones that enable navigation and specific pathfinding. *J Physiology*. 1994; **88**: 155–163.
- [46] KENNEDY TE, SERAFINI T, DE LA TORRE JR, TESSIER-LAVIGNE M. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 1994; **78**: 425–435.
- [47] KEYNES R, COOK GMW. Axon guidance molecules. *Cell* 1995; **83**: 161–169.

- [48] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Macierz zewnątrzkomórkowa [w] Cytobiochemia. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN 1995; 164–202.
- [49] KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. Błona plazmatyczna oraz białka powierzchni komórkowej. Integryny [w] Cytobiochemia. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN 1995; 250–253.
- [50] KOLODKIN AL, MATTHES DJ, GOODMAN CS. The *semaphorin* genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993; **75**: 1389–1399.
- [51] KUHN TB, SCHMIDT MF, KATER SB. Laminin and fibronectin guideposts signals sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 1995; **14**: 275–285.
- [52] LANDMESSER L. Axonal outgrowth and pathfinding. *Progress in Brain Research* 1994; **103**: 67–73.
- [53] LANGENFELD-OSTER B, FAISSNER A, IRINTCHEV A, WERNIG A. Polyclonal antibodies against N-CAM and tenascin delay endplate reinnervation. *J Neurocytol* 1994; **23**: 591–604.
- [54] LETOURNEAU PC. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev Biol* 1975; **44**: 92–101.
- [55] LETOURNEAU PC. Chemotactic response of nerve fiber elongation to nerve growth factor. *Dev Biol* 1978; **66**: 183–196.
- [56] LETOURNEAU PC. Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation. *Exp Cell Res* 1979; **124**: 127–138.
- [57] LETOURNEAU P C. Immunocytochemical evidence for colocalization in neurite growth cones of actin and myosin and their relationship to cell-substratum adhesion. *Dev Biol* 1981; **85**: 113–122.
- [58] LETOURNEAU PC, CYPHER C. Regulation of growth cone motility. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991; **20**: 267–271.
- [59] LETOURNEAU PC, MADSEN AM, PALM SL, FURCHT LT. Immunoreactivity for laminin in the developing ventral longitudinal pathway of the brain. *Dev Biol* 1988; **125**: 135–144.
- [60] LETOURNEAU PC, SNOW DM, GOMEZ TM. Growth cone motility: substratum-bound molecules, cytoplasmic  $[Ca^{2+}]$  and  $Ca^{2+}$ -regulated proteins. *Progress in Brain Res* 1994; **102**: 35–48.
- [61] LEWIS AK, BRIDGMAN PC. Nerve growth cone lamellipodium contain two population of actin filaments that differ in organization and polarity. *J Cell Biol* 1992; **119**: 1219–1243.
- [62] LIANG S, CRUTCHER KA. Movement of embryonic chick sympathetic neurons on laminin *in vitro* is preceded by neurite extension. *J Neurosci Res* 1993; **36**: 607–620.
- [63] LIESI P, SEPPÄLÄ I, TRENKER E. Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. *J Neurosci Res* 1992; **33**: 170–176.
- [64] LIN C-H, FORSCHER P. Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J Cell Biol* 1993; **121**: 1369–1383.
- [65] LUMSDEN A, DAVIES A. Earliest sensory nerve fibers are guided to their peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; **306**: 786–788.
- [66] LUO Y, RAIBLE D, RAPER JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 1993; **75**: 217–227.
- [67] MARSH L, LETOURNEAU PC. Growth of neurite without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. *J Cell Biol* 1984; **99**: 2041–2047.
- [68] MATTHES DJ, SINK H, KOLODKIN AL, GOODMAN CS. Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* 1995; **81**: 631–639.
- [69] McCAIG CD. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small applied electric field. *J Cell Sci* 1989; **93**: 723–730.
- [70] McCAIG CD. Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *J Cell Sci* 1990; **95**: 605–615.
- [71] McCAIG CD, ALLAN DW, ERSKINE L, RASNICEK AM, STEWART R. Growing nerves in an electric field. *Neuroprotocols* 1994; **4**: 134–141.

- [72] NEWGREEN DF. Physical influences on neural crest cell migration in avian embryos: contact guidance and spatial restriction. *Dev Biol* 1989; **131**: 136–148.
- [73] OAKLEY RA, TOSNEY KW. Contact-mediated mechanisms of motor axon segmentation. *J Neurosci* 1993; **13**: 3773–3792.
- [74] O'CONNOR TP, BENTLEY D. Accumulation of actin in subsets in pioneer growth cone filopodia in response to neural and epithelial guidance cues *in situ*. *J Cell Biol* 1993; **123**: 935–948.
- [75] O'CONNOR TP, DUERR JS, BENTLEY D. Pioneer growth cone steering decisions mediated by single filopodial contact *in situ*. *J Neurosci* 1990; **10**: 3935–3946.
- [76] OKABE S, HIROKAWA N. Actin dynamics in growth cones. *J Neurosci* 1991; **11** (7): 1918–1929.
- [77] O'LEARY DDM. Attractive guides for axons. *Nature* 1994; **371**: 15–16.
- [78] OWEN A, BIRD M. Acetylcholine as a regulator of neurite outgrowth motility in cultured embryonic mouse spinal cord. *NeuroReport* 1995; **6**: 2269–2272.
- [79] PARSONS TD, OBAID AL, SALZBERG BM. Aminoglikoside antibiotics block voltage-dependent calcium channels in intact vertebrate nerve terminals. *J Gen Physiol* 1992; **99**: 491–504.
- [80] PERRIS R, KROTOSKI D, BRONNER-FRASER M. Collagens in avian neural crest development: distribution *in vivo* and migration promoting ability *in vitro*. *Development* 1991; **113**: 969–984.
- [81] PERRIS R, KUO H-J, GLANVILLE RW, LEIBOLD S, BRONNER-FRASER M. Neural crest cell interaction with type VI collagen is mediated by multiple cooperative binding sites within triple-helix and globular domains. *Exp Cell Res* 1993; **209**: 103–117.
- [82] PERRIS R, SYFRIG J, PAULSSON M, BRONNER-FRASER M. Molecular mechanisms of neural crest cell attachment and migration on types I and IV collagen. *J Cell Sci* 1993; **106**: 1357–1368.
- [83] PFENNIGER KH, FRIEDMAN LB. Sites of plasmalemmal expansion in growth cones. *Dev Brain Res* 1993; **71**: 181–192.
- [84] PINI A. Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 1993; **261**: 95–98.
- [85] ROGERS SL, EDSON KJ, LETOURNEAU PC, MCLOON SC. Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. *Dev Biol* 1986; **113**: 429–435.
- [86] RUOSLAHTI E, NOBLE NA, KAGAMI S, BORDER WA. Integrins. *Kidney Int* 1994; **45** (Supl. 44): 17–22.
- [87] SABRY JH, O'CONNOR TP, TOROIAN-RAYMOND A, KIRSHNER M, BENTLEY D. Microtubule behavior during guidance of pioneer neuron growth cones *in situ*. *J Cell Biol* 1991; **115**: 381–395.
- [88] SERAFINI T, KENNEDY TE, GALKO MJ, MIRZAYAN C, JESSELL TM, TESSIER-LAVIGNE M. The netrins define a family of axons outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 1994; **78**: 409–424.
- [89] SHAW G, BRAY D. Movement of isolated growth cones. *Exp Cell Res* 1977; **104**: 55–62.
- [90] SHIGA T, SHIRAI T, GRUMET M, EDELMAN GM, OPPENHEIM RW. Differential expression of neuron-glia cell adhesion molecule (Ng-CAM) on developing axons and growth cones of interneurons in the chick embryo spinal cord: an immunoelectron microscopic study. *J Comp Neurol* 1993; **329**: 512–518.
- [91] SHIMURA K, TAKAHASHI T, TAKEICHI M. E-cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. *Dev Biol* 1992; **152**: 242–254.
- [92] SMITH CL. The initiation of neurite outgrowth by sympathetic neurons grown *in vitro* does not depend on assembly of microtubules. *J Cell Biol* 1994; **127**: 1407–1418.
- [93] SMITH JS. Neuronal cytomotility: the actin based motility of growth cones. *Science* 1988; **242**: 708–715.
- [94] SMITH SJ. Just a chemical attraction. *Nature* 1994; **368**: 101–102.

- [95] STĘPIEŃ E. Elektrotaksje i kierunkowy wzrost neuronów w polu elektrycznym. *Post Biol Kom* 1993; Supl. 2: 143–154.
- [96] TANAKA E, SABRY J. Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cones guidance. *Cell* 1995; **83**: 171–176.
- [97] TESSIER-LAVIGNE M, PLACZEK M. Target attraction: are developing axons guided by chemotropism? *Trends Neurosci* 1991; **14**(7): 303–310.
- [98] TESSIER-LAVIGNE M, PLACZEK M, LUMSDEN AGS, DODD J, JESSELL TM. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature* 1988; **336**: 775–778.
- [99] TOSNEY KW. Cells and cell-interactions that guide motor axons in the developing chick embryo. *BioEssays* 1991; **13**: 17–23.
- [100] TUCKER GC, DUBAND J-L, DUFOUR S, THIERY JP. Cell-adhesion and substrate adhesion molecules: their instructive roles in neural crest cell migration. *Development* 1988; **103**: 82–84.
- [101] VAN VEEN MP, VAN PELT J. Dynamic mechanisms of neuronal outgrowth. *Progress in Brain Res* 1994; **102**: 95–108.
- [102] WHITINGTON PM. Axon guidance factors in invertebrate development. *Pharmac Ther* 1993; **58**: 263–299.
- [103] YIP JW, YIP YPL. Laminin – developmental expression and role in axonal outgrowth in the peripheral nervous system of the chick. *Dev Brain Res* 1992; **68**: 23–33.
- [104] ZHENG J, BUXBAUM RE, HEIDEMANN SR. Investigation of microtubule assembly and organization accompanying tension-induced neurite initiation. *J Cell Sci* 1993; **104**: 1239–1250.
- [105] ZHENG JQ, FELDER M, CONNOR JA, POO M-M. Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 1994; **368**: 140–144.

Redaktor prowadzący: Jerzy Kawiak

Otrzymano: 01.07.1996 r.

Przyjęto: 03.09.1996 r.

Adres autora: Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Molekularnej  
im. J. Zurzyckiego UJ, Al. A Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

## RECEPTOR BETA-ADRENERGICZNY: BUDOWA I ISTOTNE MOTYWY SEKWENCYJNE\*

### BETA-ADRENERGIC RECEPTOR: STRUCTURE AND ESSENTIAL SEQUENCE MOTIFS

Elżbieta WYROBA i Liliana SURMACZ

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

*Streszczenie:* W pracy omówiono budowę i topologię receptora beta-adrenergicznego ze szczególnym uwzględnieniem nowo poznanych motywów sekwencyjnych. Dotyczy to przede wszystkim sekwencji uczestniczących w wiązaniu ligandów, interakcji z białkami G oraz ulegających fosforylacji przez kinazy białkowe typu A i GRK w trakcie procesu desensytyzacji receptora. Opisano również cechy wspólne receptora beta-adrenergicznego i innych receptorów sprzężonych z białkami G. Zaliczyć do nich można: 1) palmitylację reszty cysteinowej w C-końcowym odcinku receptorów, co umożliwia "zakotwiczenie" receptora w dwuwarstwie lipidowej i reguluje interakcję z białkiem G; 2) fosforylację receptora związanego z agonistą przez kinazę GRK2 (= BARK); 3) obecność motywu sekwencyjnego Asn-Pro-X-X-Tyr umożliwiającego szybkie usunięcie receptora z powierzchni komórki; 4) mechanizm umożliwiający "przełączenie" między dwoma głównymi szlakami przekazywania informacji w komórce, czyli szlakiem kinaz tyrozynowych i receptorów sprzężonych z białkami G w wyniku fosforylacji reszty tyrozynowej w drugiej pętli cytoplazmatycznej receptora.

*Słowa kluczowe:* receptor beta-adrenergiczny, wiązanie ligandów, interakcja z białkami G, fosforylacja receptora, desensytyzacja, resensytyzacja

*Summary:*  $\beta$ -adrenergic receptor (BAR) structure and topology has been described. The essential sequence motifs involved in ligand binding, G-protein interaction, desensitization and receptor sequestration have been recently identified in BAR. A number of similarities between the BAR and other G-protein coupled receptors exist such as: 1) palmitoylation of Cys residue located in C-terminal region of the receptors that plays a key role in their membrane localization and G-protein interaction; 2) phosphorylation by GRK2 (=BARK) which recognizes only the agonist-occupied receptor; 3) presence of sequestration motif: Asn-Pro-X-X-Tyr enabling a rapid internalization of the receptor; 4) cross-talks

\*Praca finansowana w ramach funduszy statutowych IBD oraz Grantu KBN Nr 6PO4A 05910.

between the G-protein-linked receptors and tyrosine kinase growth factor receptors: when the former are the substrates for the latter ones and tyrosine residue in the second loop of the receptor is phosphorylated.

*Key-words* :  $\beta$ -adrenergic receptor, ligand binding, G-protein activation, receptor phosphorylation, desensitization, resensitization

*Wykaz stosowanych skrótów*:  $\alpha$ AR – receptor alfa-adrenergiczny;  $\beta$ AR – receptor beta-adrenergiczny; MChR (MR) – receptor cholinergiczny muskarynowy; 5HT<sub>1</sub>R – receptor serotoninowy; DR – receptor dopaminowy; MSHR – receptor melanotropowy; FSHR – receptor hormonu folikulotropowego; BARK – kinaza receptora beta-adrenergicznego; PKA – kinaza białkowa A; GRK – kinaza receptorów sprzężonych z białkami G; AC – cyklaza adenylanowa.

## WSTĘP

100 lat temu odkryto adrenalinę (w terminologii anglosaskiej – epinefrynę) i był to pierwszy hormon otrzymany w czystej postaci. 10 lat temu Dixon i współpracownicy opublikowali sekwencję receptora  $\beta$ -adrenergicznego ( $\beta$ AR) wyizolowanego z tkanek chomika [5] i wykazali jego homologię do rodopsyny. Spowodowało to lawinowy rozwój badań nad strukturą i funkcją receptorów typu beta oraz ich homologią do innych receptorów błonowych przekazujących informacje ze środowiska do wnętrza komórki [6,7,15]. Reakcja receptora  $\beta$ -adrenergicznego z agonistą umożliwia jego interakcję z białkiem G<sub>s</sub> i aktywację cykazy adenylanowej. Powoduje to wytworzenie cAMP jako wtórnego przekaźnika informacji [15,16].

Naturalnymi agonistami receptora  $\beta$ -adrenergicznego są katecholaminy: adrenalina i noradrenalina. Adrenalina pełni liczne funkcje w organizmie m.in. w lipolizie i transporcie cukrów, zwęża naczynia obwodowe, podnosi ciśnienie krwi, uczestniczy w uruchamianiu rezerwy glikogenowej zwiększając poziom glukozy we krwi.

Noradrenalina (norepinefryna) jest wydzielana przez włókna nerwowe adrenergiczne (pozażwojowe sympatyczne), wzmacnia skurcze mięśni gładkich, zwiększa częstość skurczów oraz pobudliwość i przewodnictwo mięśnia sercowego, rozszerza oskrzela i zwęża tętnice.

Pod kontrolą systemu  $\beta$ -adrenergicznego znajdują się różnorodne funkcje w komórkach ssaków, włącznie z syntezą DNA i proliferacją komórek [29].

Zidentyfikowano trzy podtypy receptorów beta-adrenergicznych :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  [24]. U ssaków receptory  $\beta_1$  i  $\beta_2$  mogą występować jednocześnie w tych samych tkankach, a nawet w tej samej komórce, spełniając nieco odmienne funkcje [15]. Najlepiej poznana jest struktura receptora  $\beta_2$ .

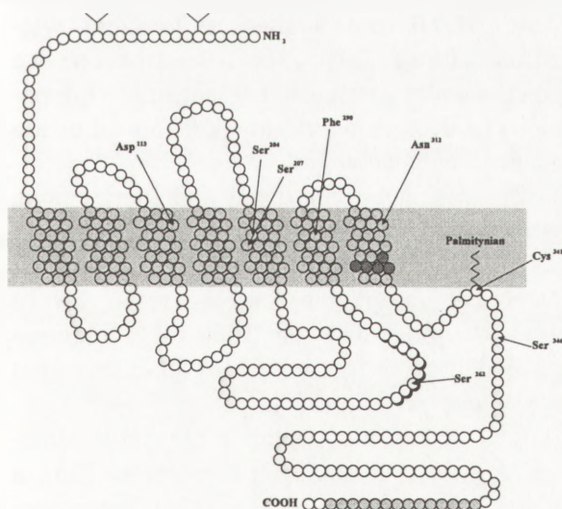
## TOPOLOGIA I STRUKTURA RECEPTORA BETA-ADRENERGICZNEGO

Receptor  $\beta$ -adrenergiczny (zaliczany do klasy receptorów metabotropowych sprzężonych z białkami G) zbudowany jest z 7 hydrofobowych domen transbł-

nowych połączonych ze sobą 3 pętlami cytoplazmatycznymi i 3 pętlami zewnątrzkomórkowymi. N-koniec łańcucha peptydowego skierowany jest do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a C-końcowy fragment ku wnętrzu komórki [7,15]. Topologię  $\beta$ -receptora w błonie komórkowej ilustruje rysunek 1 [2,4,7,15,27,37,34,38,41]. Dodatkowa "czwarta" pętla w odcinku C-końcowym utworzona jest przez zakotwiczenie receptora w błonie w miejscu palmitylacji, której ulega reszta cysteiny w pozycji 341 (rys. 1). Dotychczas nie wykryto określonego motywu sekwencyjnego warunkującego ten typ modyfikacji potranslacyjnej. Okazało się jednak, że w C-końcowym odcinku większości receptorów sprzężonych z białkami G znajduje się jedna lub dwie reszty cysteinowe (odległe o około 12 reszt aminokwasowych od siódmej domeny transbłonowej) ulegające palmitylacji (tab. 1) [19].

Palmitylacja Cys 341 w receptorze  $\beta_2$  prawdopodobnie gra istotną rolę w utrzymaniu receptora w stanie umożliwiającym regulację białka  $G_s$  i tym samym całego systemu efektorowego. Mutacja tej reszty cysteinowej powoduje bardzo słabą stymulację cykazy adenylanowej w obecności agonisty. Obserwowano też, że w trakcie aktywacji receptora  $\beta_2$  przez związki agonistyczne następuje zwiększona inkorporacja  $[H^3]$ -palmitynianu do receptora, co sugerowałoby, że receptor może istnieć w formach: aktywnej palmitylowanej i nieaktywnej bez reszty acylowej [19].

Reszty cysteinowe w hydrofilnych regionach  $\beta$ -receptora (Cys 106, 184, 190, 191) tworzące mostki dwusiarczkowe, są istotne w utrzymaniu i stabilizacji prawidłowej konformacji tego białka [8].



Rys.1. Topologia receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego w błonie komórkowej (wg [2,4,7,15,27,34,37,38,41] zmodyfikowano): YY – miejsca N-glikozylacji, O – region interakcji z białkiem  $G_s$  ⊕ – region ulegający fosforylacji przez  $\beta$ ARK (= GRK2), • – domena umożliwiająca endocytozę receptora, pozostałe objaśnienia w tekście



Tabela 1. Położenie reszty cysteinowej ulegającej palmitylacji w receptorach błonowych sprzężonych z białkami G (wg [19] zmodyfikowano)

Typ receptora	Sekwencja aminokwasowa
$\alpha_2$ AR	...Ile Leu Cys Arg Gly Asp Arg Lys Arg Ile...
$\beta_2$ AR	...Leu Leu Cys Leu Arg Arg Ser Ser Leu Lys...
Rodopsyna	...Thr Ile Cys Cys Gly Lys Asn Pro Leu Gly...
M <sub>2</sub> ChR	...Leu Met Cys His Tyr Lys Asn Ile Gly Ala...
D <sub>1</sub> R	...Leu Gly Cys Tyr Arg Leu Cys Pro Ala Thr...
5HT <sub>1B</sub> R	...Phe Lys Cys Thr Ser...

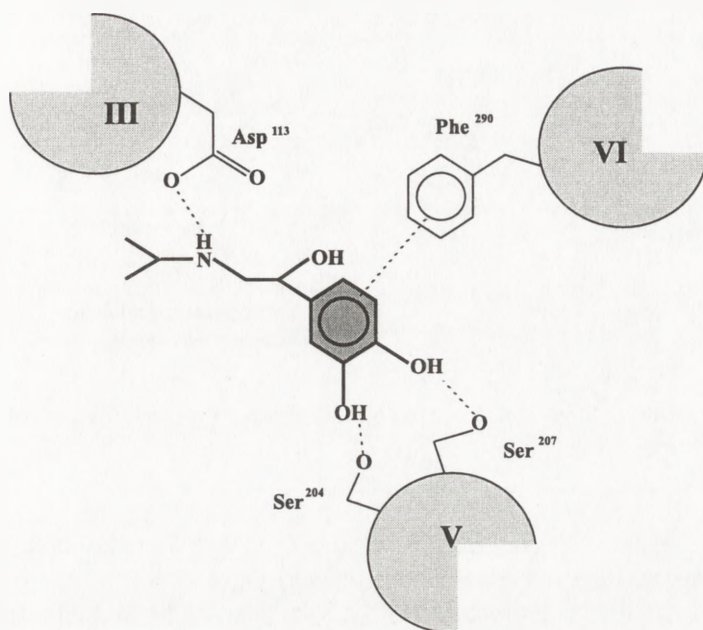
## WIĄZANIE LIGANDÓW PRZEZ RECEPTOR BETA-ADRENERGICZNY

Zastosowanie badań biochemicznych, genetycznych i biofizycznych pozwoliło na ustalenie miejsc wiązania ligandów przez beta-receptor. Okazało się, że asparaginian w pozycji 113 w trzeciej domenie transbłonowej tworzy wiązania jonowe z grupami aminokwasowymi zarówno antagonistów, jak i agonistów, natomiast reszty serynowe w pozycji 204 i 207 (rys. 2) tworzą wiązania wodorowe z grupami hydroksylowymi w pozycji meta- i para-pierścienia katecholowego agonistów [33,34].

Z badań nad modelem przestrzennym cząsteczki receptora wynika, że reszty Ser 204 i Ser 207 (rys. 1) są oddalone od siebie o jeden skręt helisy w piątej domenie transbłonowej, co sugeruje, że jednoczesna interakcja pierścienia katecholowego ligandów z resztami hydroksylowymi tychże seryn i z Phe 290 w helisie szóstej (rys. 2) umożliwiłaby specyficzne zorientowanie agonisty w "kieszeni" wiążącej (*binding pocket*) receptora [35]. Reszty Ser 204 i Ser 207 są obecne we wszystkich receptorach wiążących katecholaminy (receptory adrenergiczne i dopaminergiczne), a zastąpienie którejkolwiek z tych reszt innymi aminokwasami obniżało zarówno powinowactwo, jak i skuteczność agonistów [8].

Podstawienie Asp 113 glutaminą lub asparaginą w receptorze  $\beta_2$ -adrenergicznym chomika powodowało, że do uzyskania takiej samej stymulacji cyklazy adenylanowej potrzebne było 100–10 000 razy większe stężenie agonisty, a wiązanie większości antagonistów nie zachodziło [32]. Natomiast zastąpienie Asp 113 resztą kwasu glutaminowego obniżało stymulujący efekt agonistów około 1000 razy. Sugeruje to, że obecność ładunku ujemnego (pochodzącego z reszty kwasu glutaminowego) częściowo przywracała funkcję zmutowanego receptora [8].

Najistotniejszym elementem oddziaływania ligand-receptor w przypadku antagonistów jest centralna część siódmej domeny transbłonowej  $\beta$ -receptora [35], a szczególnie asparagina w pozycji 312 (rys. 1): zastąpienie Asn 312 w receptorze  $\beta_2$  aminokwasami nie tworzącymi wiązań wodorowych (np. alaniną i fenyloalaniną) uniemożliwia wiązanie antagonistów, np. alprenololu i propranololu. Świadczy to

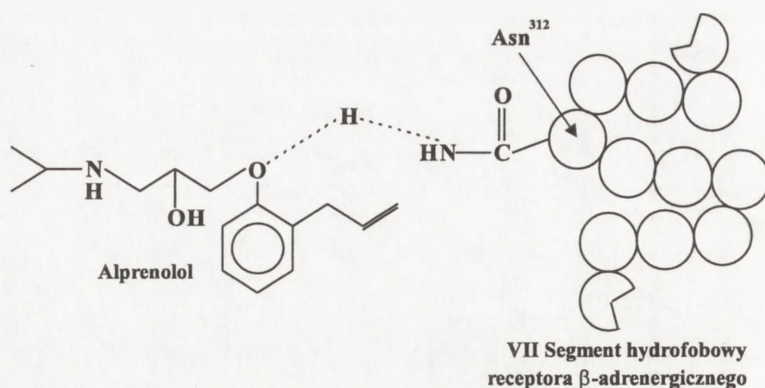


Rys. 2. Wiązanie agonisty – izoproterenolu przez receptor  $\beta$ -adrenergiczny (wg [33,34] zmodyfikowano) wzór izoproterenolu zaciemniony i narysowany grubszą linią; III, V, VI – domeny transbłonowe receptora

o tym, że asparagina w tej pozycji tworzy wiązania wodorowe z tlenem grupy fenoksylowej (rys. 3) typowe dla tej klasy ligandów, gdyż jej zastąpienie innymi aminokwasami zdolnymi do wytworzenia takiego wiązania (treoniną lub glutaminą) podtrzymywało wiązanie antagonistów [36]. Miejsce wiązania ligandu znajduje się w regionie hydrofobowym, co zgodne jest z danymi eksperymentalnymi wskazującymi, że hydrofobowe blokery  $\beta$ -adrenergiczne są wiązane znacznie silniej niż fizjologiczne hydrofilowe katecholaminy: stałe dysocjacji dla epinefryny i norepinefryny wynoszą 2–3  $\mu\text{M}$ , a dla lipofilnego propranololu 0,0012  $\mu\text{M}$  [16].

## INTERAKCJA RECEPTORA BETA-ADRENERGICZNEGO Z BIAŁKIEM $G_s$

Aktywacja białka  $G_s$  przez receptor  $\beta$ -adrenergiczny jest procesem dwuetapowym i obejmuje:



Rys. 3. Wiązanie antagonisty – alprenololu przez receptor  $\beta$ -adrenergiczny (wg [36] zmodyfikowano)

1) rozpoznanie receptora i wstępną aktywację będącą wynikiem kontaktu między receptorem i C-końcowym odcinkiem podjednostki  $G_{s\alpha}$ ;

2) interakcję receptora z regionem Thr - Cys - Ala - Thr podjednostki  $G_{s\alpha}$ , co prowadzi do uwolnienia GDP [3,14,28].

W badaniach nad sekwencją aktywującą białka  $G_s$  brano pod uwagę różne obszary ludzkiego receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego [22,23]. Najwięcej badań poświęcono fragmentowi trzeciej pętli wewnątrzkomórkowej (259–273) i uznaje się go za najważniejszą domenę aktywującą białko  $G_s$ . Region ten to 15 następujących aminokwasów: Arg - Arg - Ser - Ser - Lys - Phe - Cys - Leu - Lys - Glu - His - Lys - Ala - Leu - Lys (rys. 1) [23,37]. O ważności tego regionu świadczą m.in. badania Okamoto i współpracowników, którzy metodami chemicznymi zsyntetyzowali peptyd odpowiadający resztom 259–273 ludzkiego  $\beta_2$ AR. Aktywował on białko  $G_s$  i cyklazę adenylanową tylko w błonach komórek S49, a nie w ich mutantach (unc), w których białko  $G_s$  nie jest sprzężone z systemem  $\beta$ -adrenergicznym [23]. Natomiast Samama i współpracownicy dokonując mutagenyzy w obrębie regionu zawierającego reszty 266–272 i tworząc chimery receptora  $\beta_2/\alpha_{1B}$  uzyskali ciągłą aktywację cyklazy adenylanowej w nieobecności agonisty [30].

Wiązanie agonisty powoduje zmiany konformacyjne w receptorze, prowadząc do utworzenia kompleksu agonista-receptor-białko G o wysokim powinowactwie, co inicjuje kaskadę przekazywania sygnału [21,31,35]. Ostatnio wykazano, stosując specyficzne znaczniki fluorescencyjne, że jedną ze zmian konformacyjnych receptora wywołaną wiązaniem agonisty (izoproterenolu) jest rotacja domeny transbłonowej [12].

## DESENSYTYZACJA JAKO NEGATYWNA REGULACJA FUNKCJI RECEPTORA

### Desensytyzacja homologiczna i heterologiczna

Podstawową cechą systemów przekazywania sygnału w komórce jest stopniowa utrata odpowiedzi na bodziec w trakcie przedłużającej się stymulacji, którą określa się jako proces desensytyzacji – odczulenia receptora. Wyróżnia się 2 typy krótkotrwałej desensytyzacji: homologiczną i heterologiczną.

W procesie desensytyzacji homologicznej  $\beta$ -receptor nie odpowiada na stymulację katecholaminową, lecz nadal reaguje na inne hormony (neurotransmitery) oddziałujące na tę samą tkankę przez stymulację cykazy adenylanowej. Natomiast w trakcie desensytyzacji heterologicznej obserwuje się spadek wrażliwości w odpowiedzi na inne czynniki stymulujące, które aktywują cyklazę adenylanową przez inne receptory [16]. Głównym mechanizmem desensytyzacji receptorów  $\beta$ -adrenergicznych jest fosforylacja przez dwie różne kinazy: PKA i  $\beta$ ARK, co zaburza sprzężenie receptora z białkiem G [2].

Istnieją dwie istotne różnice pomiędzy desensytyzacją heterologiczną a homologiczną. Desensytyzacja heterologiczna – indukowana wiązaniem z agonistą – będąca wynikiem fosforylacji receptora przez PKA, zachodzi wolniej ( $t_{1/2}$  2 min) niż proces pośredniczony przez  $\beta$ ARK (15 s), ale jest bardziej wrażliwa na stężenie agonisty ( $EC_{50} \approx 10$  nM) niż desensytyzacja homologiczna ( $EC_{50} \approx 300$  nM) [18].

Desensytyzacja homologiczna receptora zachodzi tylko w obecności dużych ilości agonisty ( $\mu$ M), co najprawdopodobniej ma miejsce *in vivo* tylko w synapsach nerwowych [8].

### Rola PKA w desensytyzacji

Receptor  $\beta_2$ -adrenergiczny zawiera dwa, a  $\beta_1$ -adrenergiczny jedno miejsce fosforylacji dla PKA, co powoduje, że desensytyzacja heterologiczna zachodząca w wyniku fosforylacji przez PKA jest słabsza dla receptora  $\beta_1$  niż dla receptora  $\beta_2$  [18]. Jedno miejsce fosforylacji dla PKA w receptorze  $\beta_2$  znajduje się w trzeciej pętli cytoplazmatycznej i jest to Ser 262, a drugie w odcinku C-terminalnym – Ser 346 (rys. 1). Delecja reszt aminokwasowych 259–262 uniemożliwiała heterologiczną desensytyzację receptora [4].

Doświadczenia przeprowadzone na fibroblastach chomika chińskiego i komórkach 293 (komórki nerkowe z embrionów ludzkich) wykazały, że desensytyzacja receptora  $\beta_1$  w obecności agonisty zachodziła w ciągu 3–5 minut i była skorelowana z ponad dwukrotnym wzrostem fosforylacji receptora, wywołanej w równym stopniu przez PKA i  $\beta$ ARK, bowiem gdy zahamowano aktywność PKA desensytyzacja spadała o 50% [11]. Najnowsze dane uzyskane na komórkach mysiej linii białaczkowej

(badania porównawcze na linii dzikiej i kin-S49 – nie mającej kinazy białkowej A) sugerują, że enzym ten może też uczestniczyć w procesie desensytyzacji homologicznej [25], tzn. specyficznej wobec agonisty i zależnej od jego wiązania z  $\beta$ -receptorem. Rozbieżności dotyczące ewentualnej roli PKA w homologicznej desensytyzacji wynikać mogą z faktu, że ilość receptora w różnych typach zmutowanych komórek znacznie się różni, co wpływa na ocenę szybkości i zakresu procesu desensytyzacji [41].

Mechanizm procesu "rozprężenia" receptora od białka G w wyniku fosforylacji receptora nie jest znany. Reszty serynowe fosforylowane przez PKA w receptorze  $\beta_2$ -adrenergicznym znajdują się w pobliżu kationowej domeny receptora zaangażowanej w oddziaływanie z białkiem G (rys. 1). Tak więc fosforylacja mogłaby doprowadzić do desensytyzacji receptora przez wprowadzenie ujemnie naładowanej grupy fosforanowej blisko regionu asocjującego z białkiem G [8].

### Rola GRK w desensytyzacji

GRK (*G protein-coupled receptor kinases*) to rodzina kinaz białkowych specyficznie rozpoznających i fosforylujących receptory związane z agonistą. Wykryto 6 różnych kinaz GRK u ssaków [27]. Początkowo enzym fosforylujący receptor  $\beta$ -adrenergiczny związany z agonistą nazywano  $\beta$ ARK, czyli kinazą receptora beta-adrenergicznego i była to pierwsza znana kinaza fosforylująca receptor wyłącznie wtedy, gdy jest on związany z agonistą. Przymuszczalnie substratami tego enzymu – obecnie sklasyfikowanego jako GRK2 – mogą być również inne receptory sprzężone z białkami G, w których istnieją potencjalne miejsca fosforylacji, czyli reszty serynowe i treoninowe w III pętli cytoplazmatycznej lub odcinku C-końcowym receptorów (tab. 2) [9]. Fosforylacja receptora przez kinazę GRK2 kończy przekazywanie sygnału. Receptor nie może ulec ponownemu sprzęgnięciu z białkiem G, bo natychmiast wiąże się z nim  $\beta$ -arestyna – białko homologiczne do arestyny z siatkówki – o masie cząsteczkowej około 45 kD [17].

Uważa się, że region ulegający fosforylacji przez GRK2 jest zlokalizowany w obrębie C-końcowego cytoplazmatycznego odcinka receptora (rys. 1), bogatego w reszty seryny i treoniny [11], ponieważ jego enzymatyczne usunięcie przy użyciu karboksypeptydazy Y eliminuje fosforylację, podczas gdy jego mutageneza – usuwająca potencjalne miejsca fosforylacji – zmniejsza zdolność receptora do homologicznej desensytyzacji [26]. Kinazy typu GRK w komórkach niestymulowanych są enzymami cytozolowymi i ulegają przemieszczeniu do błony komórkowej w momencie zadziałania bodźca – agonisty na receptor [27].

Interakcja podjednostek  $\beta$  białek G z  $\beta$ ARK może ukierunkować kinazę do błony plazmatycznej i zwiększyć jej aktywność wobec zaktywowanego receptora. Domenę  $\beta$ ARK wiążącą podjednostkę  $\beta$  zlokalizowano jako odcinek 125 aminokwasów znajdujących się w C-terminalnym regionie enzymu. Ostatnio opisano,

Tabela 2. Potencjalne miejsca fosforylacji receptorów sprzężonych z białkami G przez BARK = GRK2 (wg [9] zmodyfikowano)

Typ receptora	Sekwencja	Region cząsteczki
$\beta_1$ AR (ludzki)	...Asp-Ser-Asp-Ser-Ser...	C-koniec
$\beta_2$ AR (ludzki)	...Glu-Gln-Ser.....Asp-Ser.....Asp-Ser...	C-koniec
$\alpha_{2A}$ AR (ludzki)	...Glu-Glu-Ser-Ser-Ser-Ser...	III pętla
$\alpha_{2C}$ AR (ludzki)	...Glu-Ser-Ser...	II pętla
$\alpha_{2C}$ AR (oposa)	...Glu-Glu-Ser-Ser-Thr-Ser...	III pętla
M <sub>4</sub> R(ludzki)	...Glu-Ser-Ser-Ser-Gly-Ser.....Glu-Leu-Ser..	III pętla
M <sub>5</sub> R(ludzki)	...Glu-Pro-Ser-Thr...	C-koniec
D <sub>1</sub> R (ludzki)	...Glu-Ser-Ser..	III pętla

że poza rozpuszczalną frakcją GRK, która ulega przemieszczeniu do błony plazmatycznej, istnieje też frakcja związana z błonami mikrosomalnymi, którą wykryto w różnych tkankach i liniach komórkowych [20].

## ENDOCYTOZA RECEPTORA $\beta$ -ADRENERGICZNEGO

Zastrow i współpracownicy wykazali, że w nieobecności agonisty cząsteczki receptora  $\beta_2$ -adrenergicznego znajdują się na błonie plazmatycznej transformowanych ludzkich fibroblastów nerkowych przez około 60 minut. Natomiast po dodaniu agonisty w ciągu 10 minut następuje endocytoza (sekwestracja) receptora, która uzależniona jest od temperatury i obecności ATP [44]. W badaniach nad szlakiem endocytotycznym  $\beta$ -receptora wykazano, że wkrótce po zadziałaniu agonisty (izoproterenolu) zlokalizować go można w tej samej populacji wewnątrzkomórkowych pęcherzyków, w której obserwuje się receptor transferyny [42] – "marker" endocytozy zachodzącej za pośrednictwem receptorów (ang. *receptor-mediated endocytosis*) [39]. Tak więc kolokalizacja receptora  $\beta_2$  oraz receptora transferyny wskazuje na klasyczny "szlak endosomalny" [43], na który skierowany zostaje receptor. Dokładny mechanizm całego zjawiska nie jest znany, zapewnia jednak bardzo selektywne usunięcie receptora z powierzchni komórek, o czym świadczy "rozsortowanie" różnych podtypów receptorów adrenergicznych w komórkach Cos-7 i K293 do odmiennej populacji endosomów [43]. Barak i współpracownicy [2] porównali sekwencję kilku receptorów sprzężonych z białkami G poszukując motywu strukturalnego odpowiedzialnego za endocytozę wywołaną obecnością agonisty. Okazało się, że takim motywem jest wysoce konserwatywna sekwencja aminokwasowa Asn-Pro-X-X-Tyr (tab. 3) zlokalizowana w siódmej domenie transbłonowej  $\beta$ -receptora (rys. 1). Co ciekawe, motyw ten wykazuje homologię do sekwencji uważanej za istotną w endocytozie konstytucyjnej [13]. Reszta tyrozyny (Tyr 326 w receptorze  $\beta_2$  – rys. 1 i tab. 3) w tym motywie jest niezbędna do szybkiej endocytozy receptora

Tabela 3. Konserwatywny motyw sekwencji aminokwasowej Asn-Pro-X-X-Tyr istotny w endocytozie receptorów sprzężonych z białkami G (wg [2] zmodyfikowano)

β <sub>2</sub> AR	...Asn-	Ser-	Gly-	Phe-	<b>Asn-</b>	<b>Pro-</b>	<b>Leu-</b>	<b>Ile-</b>	<b>Tyr-</b>	Cys-	Arg-	Ser-	Pro...
D <sub>2</sub> R	...Asn-	Ser-	Ala-	Val-	<b>Asn-</b>	<b>Pro-</b>	<b>Ile-</b>	<b>Ile-</b>	<b>Tyr-</b>	Thr-	Thr-	Phe-	Asn...
M <sub>4</sub> R	...Asn-	Ser-	Thr-	Ile-	<b>Asn-</b>	<b>Pro-</b>	<b>Ala-</b>	<b>Cys-</b>	<b>Tyr-</b>	Ala-	Leu-	Cys-	Asn...
FSHR	...Asn-	Ser-	Cys-	Ala-	<b>Asn-</b>	<b>Pro-</b>	<b>Phe-</b>	<b>Leu-</b>	<b>Tyr-</b>	Ala-	Ile-	Phe-	Thr...
Rodopsyna	...Ala-	Ala-	Ile-	Thr-	<b>Asn-</b>	<b>Pro-</b>	<b>Val-</b>	<b>Leu-</b>	<b>Tyr-</b>	Ile-	Met-	Met-	Asn...

Wszystkie wymienione w tabeli receptory pochodzą z tkanek człowieka.

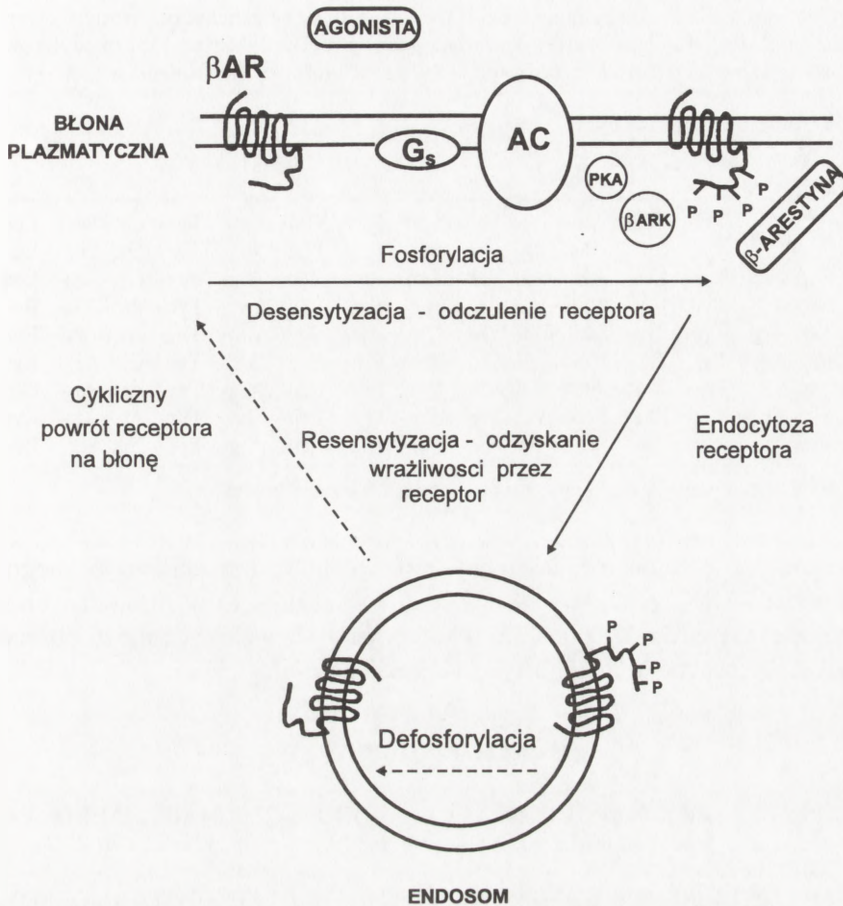
z powierzchni komórki. Kiedy zastąpiono ją alaniną, proces ten był całkowicie zahamowany. Zmutowany receptor aktywował cyklazę adenylanową, ulegał desensytyzacji i w obecności agonisty ubywało go na plazmolemie (*down regulation*), jednakże zatracił zdolność resensytyzacji, czyli odzyskania wrażliwości. Świadczy to o tym, że proces endocytozy jest szlakiem umożliwiającym przywrócenie utraconych funkcji receptora. Prawdopodobnie w wyniku defosforylacji, która zachodzi w obrębie endosomów, następuje powtórne uwrażliwienie (*resensitization*) receptora [2]. Z endosomów receptor powraca cyklicznie na powierzchnię błony komórkowej (rys. 4) i ponownie może związać agonistę, co umożliwia sprzężenie z białkiem G i uruchomienie kolejnej kaskady przekazywania sygnału.

Ostatnie badania wskazują, że β-arestyny ("rozprzęgające" receptory od białek typu G) mają dodatkową funkcję i prawdopodobnie służyć mogą również jako białka adaptorowe, pośredniczące w endocytozie receptora. Wynika to z faktu, że nadekspresja arestyn (w komórkach nerkowych embrionów ludzkich) umożliwiała proces endocytozy receptora β<sub>2</sub> u mutantu niezdolnego do tego procesu [10].

## RECEPTOR β-ADRENERGICZNY JAKO SUBSTRAT KINAZY TYROZYNOWEJ RECEPTORA INSULINY

Receptory sprzężone z białkami G i receptory czynników wzrostu stanowią wprawdzie dwa odmienne, główne szlaki przekazywania informacji w komórce, ale istnieją między nimi wzajemne oddziaływania (*cross talks*).

Okazało się, że insulina przeciwdziała ("*counter-regulates*") β-adrenergicznej stymulacji katecholaminowej: w jej obecności β-receptor wykazywał zmienioną funkcję i stawał się substratem kinazy tyrozynowej receptora insuliny, co wykazano *in vitro* badając produkty fosforylacji receptora beta-adrenergicznego [1]. Kiedy fibroblasty chomika chińskiego transfekowane cDNA receptora β<sub>2</sub> poddano działaniu insuliny (1 h), wówczas zawartość ufosforylowanej tyrozyny (Tyr 141) w tym receptorze wzrosła ponad dwukrotnie, a aktywność cyklazy adenylanowej o 47%. Podstawienie reszty Tyr 141 fenyloalaniną w cząsteczce βAR znosiło oba efekty [1].



Rys. 4. Mechanizm desensytyzacji i resensytyzacji receptora  $\beta$ -adrenergicznego (wg [40] zmodyfikowano), objaśnienia w tekście

Tyr 141 zlokalizowana jest w drugiej pętli cytoplazmatycznej BAR i – co ciekawe – w większości receptorów sprzężonych z białkami G znaleziono jej odpowiednik w tym samym położeniu (tab. 4). Sugerować by to mogło, że ewentualna fosforylacja tej reszty tyrozynowej może stanowić przełącznik (*cross-talk*) pomiędzy dwoma głównymi szlakami przekazywania informacji: szlakiem kinaz tyrozynowych i receptorów sprzężonych z białkami G [38].

## UWAGI KOŃCOWE

Regulacja aktywności receptora  $\beta$ -adrenergicznego jest skomplikowanym procesem, w którym uczestniczą 3 typy kinaz.



Tabela 4. Porównanie sekwencji aminokwasowej drugiej pętli cytoplazmatycznej różnych receptorów – lokalizacja konserwatywnej reszty Tyr odpowiadającej Tyr 141 w  $\beta_2$ AR (wg [38] zmodyfikowano) – uniwersalny "przełącznik" szlaków przekazywania informacji (objaśnienia w tekście)

Typ receptora	Sekwencja aminokwasowa													
$\beta_2$ AR	..Asp-Arg-	Tyr-	Phe-	Ala-	Ile-	Thr-	Ser-	Pro-	Glu-	Lys-	<b>Tyr-</b>	Gln-Ser-	Leu-	Leu...
$\beta_1$ AR	..Asp-Arg-	Tyr-	Leu-	Ala-	Ile-	Thr-	Ser-	Pro-	Phe-	Arg-	<b>Tyr-</b>	Gln-Ser-	Leu-	Leu...
$\beta_3$ AR	..Asp-Arg-	Tyr-	Leu-	Ala-	Val-Thr-	Asn-	Pro-	Leu-	Arg-	<b>Tyr-</b>	Gly-Ala-	Leu-	Val...	
$\alpha_1$ AR	..Asp-Arg-	Tyr-	Val-	Gly-	Val-Arg-	His-	Ser-	Leu-	Lys-	<b>Tyr-</b>	Pro-Ala-	Ile-	Met...	
$\alpha_2$ AR	..Asp-Arg-	Tyr-	Trp-	Ser-	Ile-Thr-	Gln-	Ala-	Ile-	Glu-	<b>Tyr-</b>	Asn-Leu-	Lys-	Arg...	
D <sub>1</sub> R	..Asp-Arg-	Tyr-	Trp-	Ala-	Ile-	Ser-	Ser-	Pro-	Phe-	Arg-	<b>Tyr-</b>	Glu-Arg-	Lys-	Met...
D <sub>4</sub> R	..Asp-Arg-	Phe-	Val-	Ala-	Val-Ala-	Val-	Pro-	Leu-	Arg-	<b>Tyr-</b>	Asn-Arg-	Gln-	Gly...	
M <sub>1</sub> R	..Asp-Arg-	Tyr-	Phe-	Ser-	Val-Thr-	Arg-	Pro-	Leu-	Ser-	<b>Tyr-</b>	Arg-Ala-	Lys-	Arg.	
M <sub>5</sub> HR	..Asp-Arg-	Tyr-	Ile-	Ser-	Ile-Phe-	Tyr-	Ala-	Leu-	Arg-	<b>Tyr-</b>	His-Ser-	Ile-	Val...	

Wszystkie wymienione w tabeli receptory pochodzą z tkanek człowieka.

Szczególne znaczenie ma desensytyzacja receptora beta-adrenergicznego wywołana przez  $\beta$ ARK, gdyż najnowsze badania wskazują, że w chronicznych schorzeniach mięśnia sercowego poziom tego enzymu wzrasta. Być może obserwacje te okażą się pomocne w diagnostyce i terapii kardiologicznej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] BALTENSPERGER K, KAROOR V, PAUL H, RUOHO A, CZECH MP, MALBON CC. The  $\beta$ -adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 1061–1064.
- [2] BARAK LS, TIBERI M, FREEDMAN NJ, KWATRA MM, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. A highly conserved tyrosine residue in G protein-coupled receptors is required for agonist-mediated  $\beta_2$ -adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem* 1994; **269**: 2790–2795.
- [3] BARAŃSKA J, Białka G – nagroda Nobla 1994. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 479–488.
- [4] CLARK RB, FRIEDMAN J, DIXON RAF, STRADER CD. Identification of a specific site required for rapid heterologous desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor by cAMP-dependent protein kinase. *Molec Pharmacol* 1989; **36**: 343–348.
- [5] DIXON RAF, KOBILKA BK, STRADER DJ, BENOVIĆ JL, DOHLMAN HG, FRIELLE T, BOLANOWSKI MA, BENNETT CD, RANDS E, DIEHL RE, MUMFORD RA, SLATER EE, SIGAL IS, CARON MG, LEFKOWITZ RJ, STRADER CD. Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986; **321**: 75–79.
- [6] DIXON RAF, SIGAL IS, RANDS E, REGISTER RB, CANDELORE MR, BLAKE AD, STRADER CD. Ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* 1987; **326**: 73–76.
- [7] DOHLMAN HG, BOUVIER M, BENOVIĆ JL, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. The multiple membrane spanning topography of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1987; **262**: 14282–14288.
- [8] DOHLMAN HG. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**: 653–688.

- [9] EASON MG, MOREIRA SP, LIGGETT SB. Four consecutive serines in the third intracellular loop are the sites for  $\beta$ -adrenergic receptor kinase-mediated phosphorylation and desensitization of the  $\alpha_{2A}$  adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4681–4688.
- [10] FERGUSON SSG, DOWNEY III WE, COLAPIETRO A-M, BARAK LS, MNARD L, CARON MG. Role of  $\beta$ -arrestin in mediating agonist-promoted G-protein coupled receptor internalization. *Science* 1996; **271**: 363–366.
- [11] FREEDMAN NJ, LIGGETT SB, DRACHMAN DE, PEI G, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Phosphorylation and desensitization of the human  $\beta_1$  adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 17953–17961.
- [12] GETHER U, LIN S, KOBILKA BK. Fluorescent labeling of purified  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1995; **270**: 28268–28275.
- [13] HOPKINS CR. Selective membrane protein trafficking: vectorial flow and filter. *TIBS* 1992; **17**: 27–32.
- [14] KWIATKOWSKA-KORCZAK J. Białka G – budowa i rola w przekazywaniu sygnału. [w] Konarska L [red.] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN Warszawa 1995: 104–116.
- [15] LEFKOWITZ RJ, BENOVIĆ JL, KOBILKA B, CARON MG.  $\beta$ -adrenergic receptors and rhodopsin: shedding new light on an old subject. *TIPS* 1986; **7**: 444–448.
- [16] LEVITZKI A. From epinephrine to cyclic AMP. *Science* 1988; **241**: 800–806.
- [17] LOHSE MJ, BENOVIĆ JL, CODINA J, CARON MG, LEFKOWITZ RJ.  $\beta$ -arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function. *Science* 1990; **248**: 1547–1550.
- [18] LOHSE MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *BBA* 1993; **1179**: 171–188.
- [19] MILLIGAN G, PARENTI M, MAGEE AI. The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *TIBS* 1995; **20**: 181–186.
- [20] MURGA C, RUIZ-GOMEZ A, GARCIA-HIGUERA I, KIM CK, BENOVIĆ JL, MAYOR F Jr. High affinity binding of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. *J Biol Chem* 1996; **271**: 985–994.
- [21] NOWAK JZ. Układy generujące cykliczny AMP i cykliczny GMP: zróżnicowanie form, regulacja i rola w przekazywaniu sygnałów. [w] Konarska L [red.] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN Warszawa 1995: 117–137.
- [22] O'DOWD BF, HNATOWICH M, REGAN JW, LEADER WM, CARON MG, LEFKOWITZ RJ. Palmitoylation of the human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1988; **263**: 15985–15992.
- [23] OKAMOTO T, MURAYAMA Y, HAYASHI Y, INAGAKI M, OGATA E, NISHIMOTO I. Identification of a  $G_s$  activator region of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* 1991; **67**: 723–730.
- [24] PIETRI-ROUXEL F, LENZEN G, KAPOOR A, DRUMARE M-F, ARCHIMBAULT Ph, STROBERG AD, MANNING B St J. Molecular cloning and pharmacological characterization of the bovine  $\beta_3$ -adrenergic receptor. *Science* 1995; **230**: 350–358.
- [25] POST SR, AGUILA-BUHAIN O, INSEL PA. A key role for protein kinase A in homologous desensitization of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor pathway in S49 lymphoma cells. *J Biol Chem* 1996; **271**: 895–900.
- [26] PREMONT RT, KOCH WJ, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ. Identification, purification, and characterization of GRK5, a member of the family of G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 1994; **269**: 6832–6841.
- [27] PREMONT RT, INGLESE J, LEFKOWITZ RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995; **9**: 175–182.
- [28] RASENICK MM, WATANABE M, LAZAREVIC MB, HATTA S, HAMM HE. Synthetic peptides as probes for G protein function. *J Biol Chem* 1994; **269**: 21519–21525.
- [29] REHNMARK S, NEDERGAARD J. DNA synthesis in mouse brown adipose tissue is under  $\beta$ -adrenergic control. *Exp Cell Res* 1989; **180**: 574–579.

- [30] SAMAMA P, COTECCHIA S, COSTA T, LEFKOWITZ RJ. A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 4625–4636.
- [31] SKANGIEL-KRAMSKA J. Receptory błonowe: klasyfikacja, struktura, funkcje. [w] Konarska L [red.] Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. PWN Warszawa 1995: 45–61.
- [32] STRADER CD, SIGAL IS, REGISTER RB, CANDELORE MR, RANDS E, DIXON RAF. Identification of residues required for ligand binding to the  $\beta$ -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 4384–4388.
- [33] STRADER CD, CANDELORE MR, HILL WS, SIGAL IS, DIXON RAF. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; **264**: 13572–13578.
- [34] STRADER CD, SIGAL IS, DIXON RAF. Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor function. *FASEB* 1989; **3**: 1825–1832.
- [35] STRADER CD, TUNG MING FONG, GRAZIANO MP, TOTA MR. The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995; **9**: 745–754
- [36] SURYANARAYANA S, KOBILKA BK. Amino acid substitutions at position 312 in the seventh hydrophobic segment of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor modify ligand-binding specificity. *Molec Pharmacol* 1993; **44**: 111–114.
- [37] TAKAHASHI K, MURAYAMA Y, OKAMOTO T, YOKOTA T, IKEZU T, TAKAHASHI S, GIAMBARELLA U, OGATA E, NISHIMOTO I. Conversion of G-protein specificity of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor by exchanging of a short region with  $\beta$ -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11772–11776.
- [38] VALIQUETTE M, PARENT S, LOISEL TP, BOUVIER M. Mutation of tyrosine-141 inhibits insulin- promoted tyrosine phosphorylation and increased responsiveness of human  $\beta_2$ -adrenergic receptor. *EMBO J* 1995; **14**: 5542–5549.
- [39] WYROBA E. Proces endo- i egzocytozy [w] Przewłocka B. [red.] Fizjologia i farmakologia błony komórkowej. Zakład Narodowy im. Ossolińskich Wrocław 1989: 75–101.
- [40] YU SS, LEFKOWITZ RJ, HAUSDORFF WP.  $\beta$ -adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J Biol Chem* 1993; **268**: 337–341.
- [41] YUAN N, FRIEDMAN J, WHALEY BS, CLARK RB. cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the  $\beta$ -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 23032–23038.
- [42] ZASTROW M, KOBILKA BK. Ligand-regulated internalization and recycling of human  $\beta_2$ -Adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* 1992; **267**: 3530–3538.
- [43] ZASTROW M, LINK R, DAUNT D, BARSH G, KOBILKA B. Subtype-specific differences in the intracellular sorting of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 1993; **268**: 763–766.
- [44] ZASTROW M, KOBILKA BK. Antagonist-dependent and - independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18448–18452.

Redaktor prowadzący: Maciej Zabel

Otrzymano: 20.08.1996 r.

Przyjęto: 15.10.1996 r.

Adres autora: Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3

## BUDOWA I FUNKCJE RECEPTORÓW LIPOPROTEIN ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM RODZINY RECEPTORA LDL

### THE STRUCTURE AND FUNCTIONS OF THE LIPOPROTEIN RECEPTORS WITH A PARTICULAR CONSIDERATION OF LDL RECEPTOR FAMILY MEMBERS

Katarzyna PUCICKA-HOFFMANN, Ewa KOPIECZNA-GRZEBIENIAK

Katedra i Zakład Biochemii i Chemii, Śląska Akademia Medyczna w Katowicach

*Streszczenie:* Receptory lipoprotein uczestniczą nie tylko w metabolizmie lipidów. Biorą one udział między innymi w regulacji gromadzenia lipoprotein w ścianie naczyń, proliferacji komórek naczyń krwionośnych oraz tworzeniu depozytów fibryny. Najlepiej poznaną grupą receptorów lipoprotein jest rodzina receptora LDL. Należą do niej wieloligandowe białka o podobnej, wielodomenowej strukturze. Uczestniczą one w katabolizmie wielu molekuł, między innymi lipoprotein wzbogaconych apoE, lipoprotein wzbogaconych lipazą lipoproteinową, białek macierzy czy aktywatorów plazminogenu. Zaburzenia funkcji rodziny receptora LDL, a także innych receptorów lipoprotein, między innymi receptorów *scavenger*, prowadzić mogą do zmian patologicznych. W pracy wspomniano o potencjalnej roli receptorów lipoprotein w patogenezie miażdżycy i choroby Alzheimera.

*Słowa kluczowe:* rodzina receptora LDL, receptor HDL, receptory zmiatające, miażdżycy, choroba Alzheimera

*Summary:* Lipoprotein receptors play many biological roles in addition to mediating lipoprotein metabolism. They are responsible among other things for regulation of the lipoprotein accumulation within vascular cells, the proliferation of the vascular cells, and the fibrin deposition. The LDL receptor family is the best known group of the lipoprotein receptors. It consists of multiligand proteins made up of several domains. They mediate the catabolism of a number of molecules such as apolipoprotein E-enriched lipoproteins, lipoprotein lipase-enriched lipoproteins, matrix proteins and plasminogen activators. Dysfunctions of the LDL receptor family and the other receptors lead to various diseases. For example, they may play role in the pathophysiology of Alzheimer disease and atherosclerosis.

*Key words:* LDL receptor family, HDL receptor, scavenger receptors, atherosclerosis, Alzheimer disease.

Wykaz skrótów: **LRP** (ang. *low density lipoprotein receptor related protein*) – białko pokrewne do receptora LDL;  **$\alpha$ 2M** –  $\alpha$ 2 makroglobulina; **tPA** (ang. *tissue-type plasminogen activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu; **uPA** (ang. *urokinase type plasminogen activator*) – urokinazowy aktywator plazminogenu; **uPAR** – receptor dla uPA; **PAI-1** (ang. *plasminogen activator inhibitor type-1*) – typ 1 inhibitora aktywatora plazminogenu; **PE** (ang. *Pseudomonas exotoxin A*) – egzotoksyna A bakterii *Pseudomonas*; **RAP** (ang. *receptor associated protein*) – proteina towarzysząca receptorowi; **EGF** (ang. *epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostowy; **LPL** – lipaza lipoproteinowa; **RER** – szorstka siateczka endoplazmatyczna; **LDL** – lipoproteiny o małej gęstości; **LDLR** – receptor dla LDL; **IDL** – lipoproteiny o pośredniej gęstości; **VLDL** – lipoproteiny o bardzo małej gęstości; **VLDLR** – receptor dla VLDL; **apoE/VLDL** – VLDL wzbogacone apoE; **OVR** (ang. *oocyte-specific 95-kDa very low density lipoprotein/vitellogenin receptor*) – receptor witelogeninowy; **HDL** – lipoproteiny o dużej gęstości; **HDLR** – receptor dla HDL; **HBP** (ang. *HDL binding protein*) – białko wiążące HDL; **gp330** – glikoproteina 330; **HSPG** (ang. *heparan sulfate proteoglycans*) – proteoglikany siarczanu heparanu; **PZP** (ang. *pregnancy zone protein*) – białko ciążowe; **PDGF** – płytkowy czynnik wzrostowy; **NGF** – nerwowy czynnik wzrostowy; **TGF** – transformujący czynnik wzrostowy; **IL-1, IL-6** – interleukiny; **b-FGF** – zasadowy czynnik wzrostowy fibroblastów; **TNF** – czynnik martwicy nowotworów; **PKC** (ang. *protein kinase C*) – kinaza białkowa C; **TSP** – trombospondyna; **TFPI** (ang. *tissue factor pathway inhibitor*) – inhibitor czynnika tkankowego; **AGEP-LDL** (ang. *advanced glycation end products LDL*) – LDL zmodyfikowane końcowymi produktami zaawansowanej glikacji; **CSP** (ang. *calcium sensing protein*) – białko wyczuwające wapń.

Wyniki najnowszych prac wskazują, że lipoproteiny nie są jedynymi ligandami receptorów lipoprotein. Receptory te wykazują powinowactwo do wielu, często strukturalnie odmiennych ligandów. Wieloligandowość niektórych receptorów lipoprotein przemawia za tym, że uczestniczą one także w procesach innych niż katabolizm lipoprotein. Funkcje tych receptorów, nie związane z metabolizmem lipoprotein, jak również ich ligandy, są dopiero poznawane. Wykaz ligandów rodziny receptora LDL, które dotąd poznano przedstawiono w tabeli 1. Spośród receptorów lipoprotein dość dobrze poznana została rodzina receptora LDL.

## OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA RODZINY RECEPTORA LDL

Do tej pory poznano 7 białek zaliczanych do rodziny LDLR [30,34]. Są nimi: receptor LDL; dwa receptory VLDL – VLDR-1 i VDLR-2, LRP, glikoproteina 330, białko *C. elegans* (proteina podobna do gp330, której gen zidentyfikowano niedawno u *Caenorhabditis elegans*) oraz receptor witelogeninowy. Na rysunku 1 przedstawiono schemat budowy większości członków rodziny receptora LDL.

Cechą wszystkich białek należących do rodziny receptora LDL jest budowa wielodomenowa [35]. Kolejność domen od przestrzeni pozakomórkowej do światła komórki przedstawia się następująco:

- 1) domena wiążąca ligand,
- 2) domena będąca homologiem czynnika wzrostowego,
- 3) domena cukrowa mająca miejsce O-glikozylacji, która jednak nie występuje we wszystkich receptorach tej rodziny,

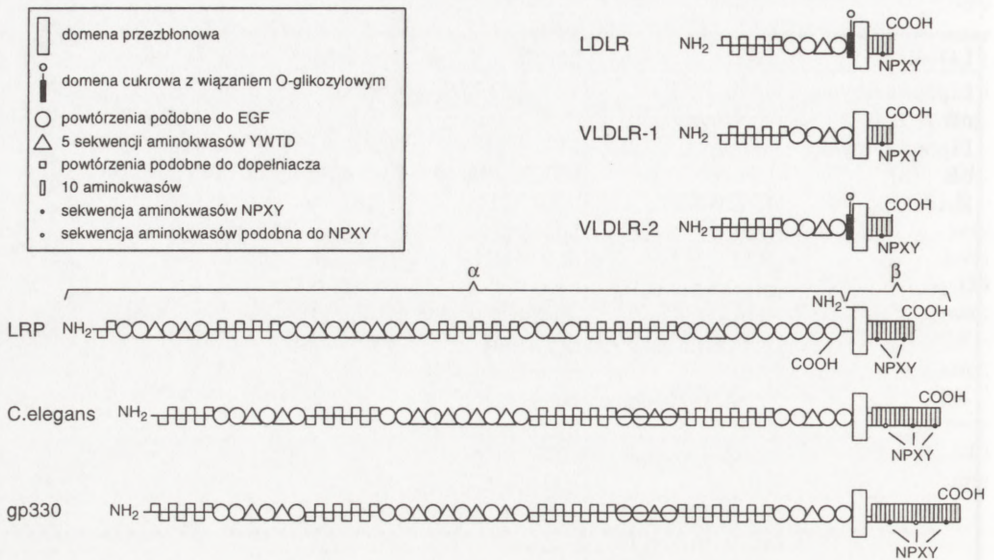
Tabela 1. Ligandy dla receptorów rodziny LDLR

LDLR	LRP	gp330	VLDLR	OVR
Lipoproteiny/apoE [20]	apoE [35]	apoE/ $\beta$ -VLDL [35]	VLDL [18]	VLDL [18]
Lipoproteiny/apoB [18]	apoE/remnanty lipoprotein [20]	LPL [35]	IDL [18]	witelogenina [18]
RAP [35]	LPL [10]	LPL/VLDL [35]	LDL [18]	apoE [18]
	LPL/ $\beta$ -VLDL [35]	RAP [31]	apoE/lipoproteiny [18]	$\alpha$ 2M [13]
	RAP [35]	laktoferyna [35]	triglicerydy/lipoproteiny [27]	
	proteinaza- $\alpha$ 2M [10]	tPA-PAI-1 [35]	RAP [35]	
	proteinaza-PZP [10]	uPA-PAI-1 [35]	LPL [3]	
	$\alpha$ 2M-metylamina [10]	serpiny [2]: tPA i uPA [34]	uPA-PAI-1 [3]	
	$\alpha$ 2M-trypsyna [10]	proteinazy serynowe [2]		
	tPA-PAI-1 [10]	plazminogen [24]		
	uPA-PAI-1 [10]	CSP [8]		
	PE [20]	leki wielozasadowe [22]		
	laktoferyna			
	serpiny [2]: tPA [10] i uPA [35]			
	proteinazy serynowe [2]			
	niektóre ludzkie rhinowirusy [35]			
	trombospondyna [34]			
	TFPI [34]			
	elastaza			
	$\alpha$ 1-antytrypsyna [34]			
	kurza witelogenina [6]			
	leki wielozasadowe [22]			

4) domena przezbłonowa oraz

5) domena cytoplazmatyczna.

Dwie pierwsze domeny są bardzo bogate w reszty cysteinowe [18]. Wiązania dwusiarczkowe pomiędzy resztami cysteiny nadają receptorowi stabilną strukturę, dzięki której nie ulega on zniszczeniu w swojej wędrówce pomiędzy powierzchnią komórki a kwaśnym środowiskiem endosomów, nawet gdy wędrówka ta powtarza się wielokrotnie. Domena wiążąca ligand jest odpowiedzialna za przyłączanie skład-



Rys. 1. Schemat struktury niektórych receptorów z rodziny receptora LDL, dokładny opis w tekście (wg [31] zmodyfikowany)

nika białkowego lipoprotein. Rozpoznawanie i wiązanie apolipoprotein różnych lipoprotein jest prawdopodobnie modulowane przez inne apolipoproteiny jak również lipidy. Zadaniem domeny będącej homologiem czynnika wzrostowego jest utrzymywanie pierwszej domeny w konformacji pozwalającej na przyłączenie ligandów [35]. Prawdopodobnie jest ona także potrzebna receptorowi do jego kwasowo-zależnej przemiany strukturalnej, która uwalnia ligandy wewnątrz endosomów, pozwalając wolnemu receptorowi powrócić na powierzchnię komórki [38]. Rola domeny cukrowej nie została jeszcze do końca wyjaśniona [35]. Domena czwarta umożliwia receptorowi utrzymanie się w błonie komórkowej. W jej skład wchodzi aminokwasy hydrofobowe o łańcuchu rozgałęzionym [38]. Domena cytoplazmatyczna (ogon cytoplazmatyczny) wszystkich członków rodziny receptora LDL zawiera sekwencję aminokwasów Asp-Pro-X-Tyr (NPXY), która jest rozpoznawana przez adaptyny – złożone białka znajdujące się w miejscach pokrytych klatryną [18]. Białka te ułatwiają interakcję klatryny z receptorem i pośredniczą w jego szybkiej endocytozie. Receptory, które nie mają domeny cytoplazmatycznej są wydalane na zewnątrz komórki.

Właściwości immunologiczne i genetyczne jednego rodzaju receptora w komórkach różnych tkanek są takie same [38].

## BUDOWA I ROLA RECEPTORA LDL

Receptor LDL, zwany także receptorem apo B100/E, jest glikoproteiną zawierającą 839 aminokwasów [38]. Domena wiążąca ligand tego receptora, zlokalizowana w okolicy N-końca proteiny, składa się z 292 aminokwasów, wśród których są aż 42 reszty cysteinowe [18]. Wszystkie cysteiny tworzą wiązania dwusiarczkowe, co stabilizuje strukturę receptora i chroni go przed degradacją podczas recyrkulacji pomiędzy powierzchnią komórki a kwaśnym środowiskiem endosomów. Receptor LDL ulega ponad 100 cyklom recyrkulacji. W skład domeny wiążącej ligand wchodzi 7 powtórzeń podobnych do dopełniacza, po 40 aminokwasów każde. Pierwsze z tych powtórzeń nie uczestniczy w wiązaniu ligandów, natomiast wykazuje ono silne właściwości immunogenne. W okolicy C-końca każdego powtórzenia znajdują się aminokwasy kwaśne – kwas asparaginowy i glutaminowy [38]. Ich ujemny ładunek umożliwia przyłączenie dodatnio naładowanych aminokwasów wchodzących w skład ligandów receptora, którymi w apo B100 są arginina i lizyna.

Druga domena zawiera 3 powtórzenia podobne do naskórkowego czynnika wzrostowego, rozdzielone pięcioma kopiami sekwencji Tyr-Trp-Thr-Asp [35].

Domena cukrowa receptora LDL to 58 aminokwasów, w tym 18 reszt serynowych i treoninowych [18]. W komórkach ze zmutowanym receptorem LDL, które nie potrafią syntetyzować łańcuchów N- i O-glikozydowych, receptory te ulegają degradacji. Domena przezłonowa jest zbudowana z 22 aminokwasów hydrofobowych [38]. W skład piątej domeny wchodzi 50 reszt aminokwasowych, w tym jedna sekwencja NPXY [35].

Receptor LDLR znajduje się na powierzchni wszystkich komórek ustroju, a w największej ilości na powierzchni hepatocytów [18]. Najważniejszą funkcją tego receptora jest udział w metabolizmie lipoprotein i homeostazie cholesterolu [38]. Receptor ten wiąże lipoproteiny zawierające apo B100 i apo E. Największe powinowactwo do LDLR wykazują frakcje LDL i IDL.

## BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORÓW VLDL

Niedawno poznanyimi członkami rodziny receptora LDL są receptory VLDL [20]. Nazwa ich wywodzi się z dużego powinowactwa do VLDL, natomiast małe jest ich powinowactwo do LDL. VLDLR-1 różni się od VLDLR-2 brakiem domeny cukrowej [26,31]. Struktura tych receptorów i receptora LDL jest podobna (rys. 1) [40]. Receptory VLDL różnią się od LDLR dodatkową sekwencją bogatą w cysteinę wewnątrz domeny wiążącej ligand, która kodowana jest przez dodatkowy ekson [18]. Prawdopodobnie sekwencja ta utrudnia przyłączanie LDL, a sprzyja wiązaniu VLDL i innych lipoprotein zawierających apo E [18,26,39]. VLDLR-2



u ludzi jest glikoproteina składającą się z 846 aminokwasów i wykazuje w 97% homologię z króliczym odpowiednikiem [26,27]. Receptory VLDL są obecne we wszystkich tkankach poza wątrobą i jelitem cienkim [26,40]. Wysokie stężenie mRNA VLDLR wykazano w sercu i mięśniach szkieletowych, a także w nerkach, mózgu, płucach, jajnikach, jądrach, łożysku i tkance tłuszczowej [9,10,39,40]. Prawdopodobnie VLDLR wychwytuje lipoproteiny bogate w triglicerydy, uczestnicząc w ich katabolizmie, a także bierze udział w transporcie tłuszczów matczynych poprzez łożysko do płodu [9,10]. Wiązanie ligandów przez receptor VLDL jest modulowane przez RAP. Niedawno stwierdzono, że VLDLR znajdujący się w śródbłonku naczyń krwionośnych reguluje poziom LPL, co wpływa na katabolizm lipoprotein, a także bierze udział w regulacji fibrynolizy przez udział w endocytozie kompleksów uPA-PAI-1 [3].

## BUDOWA I FUNKCJA LRP

LRP, czyli proteina pokrewna do receptora LDL, jak wykazano niedawno, jest identyczna z receptorem  $\alpha$ 2-makroglobuliny [15,36,37]. Częsteczką LRP zawiera 4525 aminokwasów [18]. W skład domeny cytoplazmatycznej LRP wchodzi 100 reszt aminokwasowych z dwiema kopiami sekwencji NPXY (rys. 1). W LRP, w miejscu domeny cukrowej receptora LDL, znajdują się powtórzenia podobne do naskórkowego czynnika wzrostowego. LRP zawiera w sumie 22 takie powtórzenia oraz 31 powtórzeń podobnych do dopełniacza. Receptor ten jest syntetyzowany w postaci pojedynczego łańcucha prekursorowego, o masie cząsteczkowej 600 kDa, który ulega rozszczepieniu na łańcuch ciężki ( $\alpha$ ) o masie 515 kDa i łańcuch lekki ( $\beta$ ) o masie 85 kDa. Większa podjednostka, która zawiera regiony wiążące ligandy, asocjuje niekowalencyjnie z podjednostką mniejszą, zawierającą domenę przezbłonową i ogon cytoplazmatyczny. LRP zachowuje konserwatyzm u różnych gatunków: ludzki LRP jest w 83% identyczny z kurzym, a w 97% z mysim LRP.

LRP jest obecny w hepatocytach, fibroblastach, makrofagach, miocytach gładkich, a także w komórkach kory nadnerczy, pęcherzyków jajnika, splotu naczyniówkowego, ciała rzęskowego i niektórych neuronach [35]. W pewnych komórkach, głównie hepatocytach i komórkach kory nadnerczy, LRP jest zlokalizowany na ich powierzchni, w innych, takich jak: makrofagi, fibroblasty, komórki nabłonkowe splotu naczyniówkowego i ciała rzęskowego, jest obecny w całej komórce [18]. Lokalizacja LRP w różnych wyspecjalizowanych komórkach, takich jak: trofoblast, neurony i komórki mięśni gładkich, wskazuje, że receptor ten może także regulować funkcjonowanie tych komórek [35]. Przypuszcza się, że LRP bierze udział w rozwoju embrionalnym, ale jego rola w tym procesie nie jest znana.

Różnorodne funkcje LRP wynikają z jego zdolności do wiązania wielu ligandów (tab.1) [11,34]. Jedną z funkcji LRP jest jego udział w katabolizmie remnantów chylomikronów i pozostałości VLDL, czyli lipoprotein transportujących triglicerydy i inne lipidy z jelit i wątroby do pozostałych tkanek, np. do mięśni. Pozostałości lipoprotein są usuwane z krwi głównie przez komórki mięśniowe wątroby z udziałem receptora LDL. Remnanty lipoprotein są skutecznie katabolizowane także u homozygot z rodzinną hipercholesterolemią, u których brak receptorów LDL. Dowodzi to, że w ich katabolizmie uczestniczy również inny receptor i prawdopodobnie jest nim LRP [12,24]. Interakcja lipoprotein z LRP *in vitro* wymaga ich aktywacji z udziałem egzogennej apoE lub lipazy lipoproteinowej [34]. W łączeniu się remnantów chylomikronów wzbogaconych apoE z receptorem pośredniczą proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG), które znajdują się na powierzchni komórek [20]. Inicjują one wiązanie resztkowych lipoprotein z LRP i ułatwiają ich internalizację, ponieważ są miejscem akumulacji lipazy lipoproteinowej i/lub cząsteczek apoE. Nie zostało jeszcze do końca wyjaśnione, czy remnanty chylomikronów są przekazywane LRP z HSPG ani czy proteoglikany z LRP tworzą kompleks, który ulega internalizacji z udziałem tego receptora (rys. 2).

Inną, dość dobrze poznaną funkcją LRP, jest zdolność wiązania i internalizacji proteinaz i kompleksów proteinaza-inhibitor, co wskazuje na udział tego receptora w regulacji ekspresji aktywności proteinaz [35]. Usuwanie aktywatorów plazminogenu, tPA i uPA ze środowiska pozakomórkowego zmniejsza jego profibrynolityczny potencjał, prowadząc do tworzenia zakrzepów [34]. Może to być istotne w rozwoju zmian miażdżycowych, w których w makrofagach i miocytach gładkich wykazano ekspresję LRP. Receptor ten poprzez regulację aktywności proteinaz bierze udział w przemianach, w których uczestniczą te enzymy, takich jak migracja komórek i przebudowa tkanek.

Jednym z ligandów LRP jest  $\alpha 2$ -makroglobulina [11,15]. LRP wiąże także kompleksy  $\alpha 2$ -makroglobuliny np. z proteinazami, cytokinami i hormonami, a zatem receptor ten może uczestniczyć w regulacji usuwania tych substancji z krwi. Kompleksy  $\alpha 2$ -M z cytokinami nie są rozpoznawane przez receptory dla cytokin. W kompleksach z  $\alpha 2$ -M niektóre cytokiny (PDGF, NGF, IL6) zachowują swoją aktywność biologiczną, podczas gdy aktywność innych (IL-1, b-FGF, TGF) ulega obniżeniu. Hormonami, które ulegają związaniu przez  $\alpha 2$ -M, są insulina, luteotropina i hormon wzrostu.

Niedawno wykazano, że receptor LRP uczestniczy w katabolizmie trombospondyny [34]. Białko to wydaje się mieć wpływ na agregację trombocytów, proliferację, adhezję i migrację komórek oraz angiogenezę. Uważa się, że trombospondyna bezpośrednio aktywuje TGF, czynnik wzrostowy wydzielany w postaci latentnej przez komórki. TSP jest syntetyzowana przez komórki śródbłonna, fibroblasty, miocyty gładkie. Trombospondyna jest wydzielana do przestrzeni pozakomórkowej lub wiązana z powierzchnią komórki, ulegając szybko internalizacji i degradacji. Katabolizm

TSP jest całkowicie zahamowany przez RAP i przeciwciała przeciwko LRP. Katabolizm TSP z udziałem LRP, podobnie jak lipazy lipoproteinowej, wymaga udziału proteoglikanów związanych z powierzchnią komórki.

LRP wiąże i internalizuje także egzotoksynę A pałeczek rodzaju *Pseudomonas* (PE) [35]. Ta trójdomenowa toksyna jest letalna dla komórek z powodu nieodwracalnego blokowania syntezy protein. By tego dokonać, toksyna wnika do komórki w drodze endocytozy, za pośrednictwem LRP. Po internalizacji jest ona rozszczepiana przez komórkową proteinazę, redukowana i jej fragment o masie 37 kDa przemieszcza się do cytozolu, gdzie uczestniczy w ADP-rybozylacji czynnika elongacyjnego 2.

Niedawno wykazano, że wielozasadowe leki, takie jak: aprotynina, aminoglikozydy, czy polimyksyna B, mogą antagonizować wiązanie ligandów z LRP [22]. Odkrycie to może mieć wpływ na rozwój badań w kierunku zmniejszenia toksyczności tych leków.

## POTENCJALNA ROLA LRP W PATOGENEZIE MIAŻDŻYCY I CHOROBY ALZHEIMERA

Uczestnicząc w internalizacji aktywatorów plazminogenu, lipoprotein i trombospondyny LRP może odgrywać istotną rolę w rozwoju miażdżycy [34]. Obecność antygeny LRP wykazano w komórkach mięśni gładkich i makrofagach we wczesnych, jak również zaawansowanych zmianach miażdżycowych. Ekspresję mRNA dla LRP wykazano także w zmianach miażdżycowych u królików na diecie bogatocholesterolowej oraz u królików Watanabe, z wrodzoną hiperlipidemią. ApoE oraz lipaza lipoproteinowa są również obecne w zmianach miażdżycowych. Być może LPL i apoE, za pośrednictwem LRP, biorą udział w pobieraniu przez komórki lipoprotein bogatych w cholesterol i w tworzeniu komórek piankowych.

Antygen LRP wykazano w starczych blaszkach u pacjentów z chorobą Alzheimera [11,29]. Dziedziczenie allelu apoE4 jest czynnikiem ryzyka w późnej rodzinnej chorobie Alzheimera. Odkrycie to czyni prawdopodobnym udział receptorów, takich jak LRP, zdolnych do katabolizowania lipoprotein wzbogaconych apolipoproteiną E, w patogenezie tej choroby.

## BUDOWA I FUNKCJA RECEPTORA gp330

Członkiem rodziny receptora LDL jest również glikoproteina 330 (gp330) [30]. Jest ona głównym antygenem biorącym udział w błoniastym zapaleniu nerek u

szczurów, znanym jako zapalenie Heymanna. Początkowo sądzono, że masa cząsteczkowa tej proteiny wynosi 330 kDa, stąd nazwa tego receptora. Obecnie wiadomo, że gp330 w postaci dojrzałej składa się z 4660 aminokwasów, a jej masa cząsteczkowa wynosi 516,7 kDa. Jest ona zatem największym, dotąd opisanym białkiem błony plazmatycznej u kręgowców, zwanym także megaliną. Gp330 składa się z: peptydu N-końcowego zbudowanego z 25 aminokwasów, regionu zewnątrzkomórkowego złożonego z 4400 aminokwasów, domeny przezbłonowej utworzonej przez 22 aminokwasy oraz z ogona cytoplazmatycznego przy C-końcu, który ma 213 aminokwasów. Region zewnątrzkomórkowy zawiera 3 typy powtórzeń bogatych w cysteinę. Składa się na nie: 36 powtórzeń wiążących ligandy, analogicznych do tych, które występują w LDLR, zebranych w 4 domeny wiążące ligandy; 16 powtórzeń naskórkowego czynnika wzrostowego, podzielonych ośmioma regionami o sekwencji Tyr-Trp-Thr-Asp; dwa powtórzenia czynnika wzrostowego przy C-końcu. Ogon cytoplazmatyczny zawiera trzy [18], a według innych autorów [30] dwie kopie sekwencji NPXY i jedną sekwencję podobną do NPXY. Struktura gp330 jest zbliżona do struktury LRP (rys. 1).

Obecność gp330 wykazano w nabłonku znajdującym się w rąbku szczoteczkowym kanalików bliższych nerek, pneumocytach typu II pęcherzyków płucnych, ciałku rzęskowym oka, siatkówce, gruczole łzowym, tarczycy i przytarczycach, splocie naczyniówkowym, podocytach, najądrzu, wyściółce macicy, pęcherzyku żółtkowym, łożysku, ependymie, osierdziu, uchu wewnętrznym i jelicie [35]. Gp330 znajduje się głównie na powierzchni tych komórek, w zagłębieniach pokrytych klatryną, z wyjątkiem przytarczyc i siatkówki, gdzie prawdopodobnie receptor ten jest rozproszony wewnątrz całej komórki [28]. Związek gp330 z określoną grupą komórek nabłonkowych sugeruje jego unikalną funkcję, która jak dotąd nie została poznana [17,42]. Gp330 wiąże większość ligandów wchodzących w interakcję z LRP, również wielozasadowych leków, ale prawdopodobnie w innych przedziałach komórkowych [17,22,43]. Na przykład w nerce LRP kontaktuje się z osoczem, natomiast gp330 z moczem pierwotnym [15]. Różna lokalizacja gp330 i LRP przemawia za odrębną ich funkcją *in vivo* [14].

Fizjologiczna funkcja gp330 nie została jeszcze do końca poznana [30]. Podobnie jak inne receptory z rodziny LDLR umożliwia ona endocytozę wielu ligandom. Jej obecność w komórkach embrionów i raków embrionalnych sugeruje udział tej glikoproteiny w rozwoju embrionalnym. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że ludzkim odpowiednikiem gp330 może okazać się CSP – białko wyczuwające wapń, wrażliwe na zmiany stężenia zewnątrzkomórkowego wapnia, które obecne jest w ludzkich przytarczycach i komórkach cytotrofoblastu łożyska [8].

## RECEPTOR WITELOGENINOWY (OVR) I INNE RECEPTORY LIPOPROTEIN U KUR

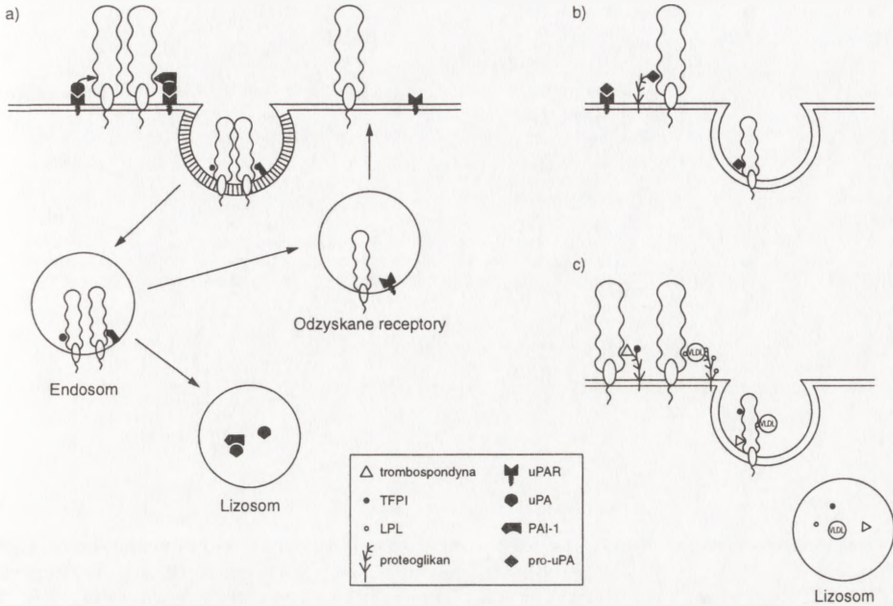
Receptor witelogeninowy, o masie cząsteczkowej 95 kDa, obecny u kur, jest wytwarzany w komórce jajowej [13,18]. Wiąże on prekursory żółtka, to jest VLDL i witelogeninę, a także  $\alpha$ 2-M. *In vitro* receptor ten wiąże także apoE, której nie ma u ptaków. U kur występuje także receptor, który jest odpowiednikiem LDLR u ssaków. Ma on masę cząsteczkową 130 kDa i obecny jest w innych komórkach niż komórka jajowa. Ponadto u kur znane są dwa duże białka odpowiadające LRP u ssaków. Jedno z nich jest związane z oocytem, a drugie z pozostałymi komórkami. Tak więc u kur istnieją dwa oddzielne systemy receptorów, z których jeden zapewnia homeostazę cholesterolu w komórkach somatycznych, a drugi pośredniczy w transporcie lipoprotein do oocytu. Dokładne mechanizmy działania tych receptorów nie są jeszcze znane.

## RAP I LPL MODULATORAMI RECEPTORÓW RODZINY LDLR

RAP (ang. *receptor associated protein*) to białko o masie 39 kDa, które zidentyfikowano podczas oczyszczania LRP i dlatego zostało ono nazwane proteiną związaną z receptorem (rys. 4). RAP u ludzi zawiera 323 reszty aminokwasowe. Reszta cukrowa jest związaną N-glikozydowo z 234 resztą aminokwasową [42]. RAP wiąże heparynę. Regiony wiązania heparyny znajdują się między resztami aminokwasowymi 261–323. RAP wykazuje niewielkie podobieństwo do innych ligandów rodziny receptora LDL, takich jak apoE czy LPL. Mysi odpowiednik RAP nosi nazwę proteiny wiążącej heparynę (HBP-44), która jest w 77% identyczna z ludzką RAP. RAP u szczurów to jedna z domen kompleksu, jakim jest antygen Heymanna. Jest ona w 73% identyczna z ludzką RAP.

Funkcja RAP i znaczenie interakcji tej proteiny z członkami rodziny receptora LDL nie zostały do tej pory całkowicie wyjaśnione [4,34]. Wiadomo, że RAP wiąże się z bardzo dużym powinowactwem z VLDLR, z dużym powinowactwem z LRP i gp330, natomiast ze słabym z receptorem LDL. Sugeruje to wspólną, funkcjonalną rolę RAP w modulowaniu wiązania ligandów z receptorami rodziny LDL. Uważa się, że RAP jest antagonistą receptorów rodziny LDLR. Egzogenny RAP lub jego zwiększona ekspresja hamują aktywność LRP, stąd koncepcje dotyczące funkcji RAP koncentrują się wokół jej zdolności blokowania miejsc wiążących ligand w receptorach rodziny LDLR.

RAP łączy się, z dużym powinowactwem, z łańcuchem ciężkim receptora LRP, w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [25]. Gdy pH środowiska obniża się z 7,0 do 5,0, maleje

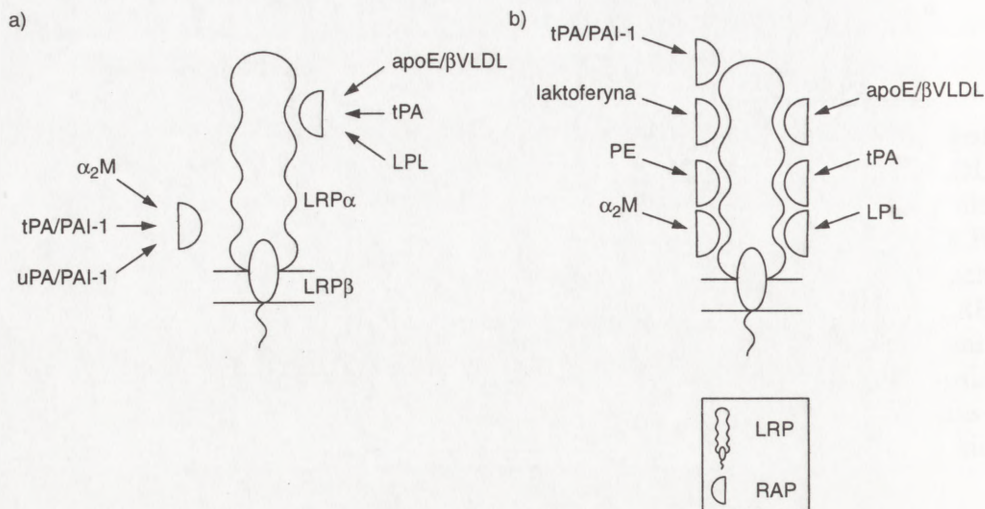


Rys. 2. Model roli LRP w pośredniczeniu w degradacji różnych ligandów: internalizacja uPA i kompleksów uPA-PAI-1. UPAR jest prawdopodobnie internalizowany łącznie z LRP, a następnie wraca na powierzchnię komórki. LRP uczestniczy w internalizacji pro-uPA wolnego lub związanego z proteoglikanami. Pro-uPA połączony z uPAR nie ulega internalizacji przez LRP. Endocytoziew drodze receptorowej, za pośrednictwem receptora LRP i proteoglikanów, ulegają także inne ligandy, takie jak trombospondyna, inhibitor czynnika tkankowego i lipaza lipoproteinowa. Rolą proteoglikanów w tym procesie jest akumulacja tych ligandów na powierzchni komórki (wg [34], zmodyfikowany)

zdolność LRP do wiązania RAP. Sugeruje to, że RAP może oddzielać się od LRP wewnątrz endosomów, gdzie pH jest niskie.

Istnieją dwie hipotezy wyjaśniające wpływ RAP na wiązanie ligandów z LRP. Jedna z nich opiera się na założeniu, że LRP ma dwa regiony wiążące ligandy. Zajęcie pierwszego z nich przez RAP uniemożliwia przyłączenie się  $\beta$ -VLDL do LRP, natomiast nie przeszkadza w wiązaniu z tym receptorem aktywowanej  $\alpha$ 2-M, która przyłącza się do drugiego miejsca wiązania. Zajęcie drugiego miejsca wiązania przez RAP blokuje przyłączenie aktywowanej  $\alpha$ 2-M, ale nie ma wpływu na wiązanie  $\beta$ -VLDL wzbogaconej apolipoproteiną E. Pozostałe ligandy wiążą się również z tymi dwoma miejscami. Według innej hipotezy RAP może wiązać się z wieloma miejscami LRP, hamując wiązanie innych ligandów w drodze bezpośredniego współzawodnictwa [18]. Hipotezy te zostały przedstawione na rysunku 3. RAP hamuje wiązanie wszystkich poznanych ligandów z LRP [25].

Odmierna jest lokalizacja w komórce receptorów rodziny LDLR i RAP [19]. RAP jest proteiną wewnątrzkomórkową, obecną w siateczce endoplazmatycznej, podczas gdy receptory znajdują się w pęcherzykach endosomalnych i na powierzchni



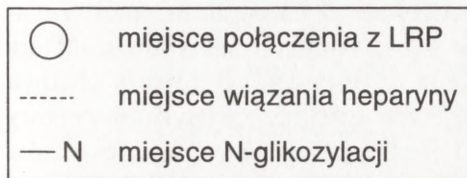
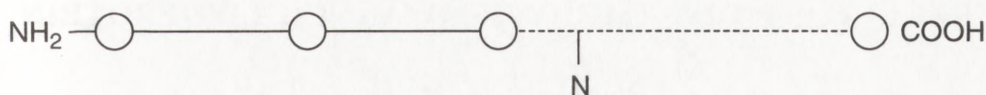
Rys. 3. Hamowanie wiązania ligandów z LRP przez RAP: a – model hipotezy, według której LRP ma dwa regiony wiążące ligandy. Zajęcie pierwszego z nich przez RAP uniemożliwia przyłączenie się β-VLDL do LRP, natomiast nie przeszkadza w wiązaniu z tym receptorem aktywowanej α<sub>2</sub>-M, która przyłącza się do drugiego miejsca wiązania. Zajęcie drugiego miejsca wiązania przez RAP blokuje przyłączenie aktywowanej α<sub>2</sub>-M, ale nie ma wpływu na wiązanie β-VLDL wzbogaconej apolipoproteiną E. Pozostałe ligandy wiążą się również z tymi dwoma miejscami; b – model hipotezy, według której RAP może wiązać się z wieloma miejscami LRP, hamując wiązanie innych ligandów w drodze bezpośredniego współzawodnictwa (wg [18] zmodyfikowany)

komórki [15,19,42]. Wewnątrzkomórkowa pula RAP może być uwalniana w rezultacie nieznanych jeszcze mechanizmów, co być może moduluje wiązanie ligandów z receptorami na powierzchni komórki.

Być może RAP uczestniczy także w regulacji transportu receptorów na powierzchnię komórki [1]. Funkcja ta może polegać na wewnątrzkomórkowym przemieszczaniu i dostarczeniu nowo powstałego receptora do błony plazmatycznej [1,43].

U ludzi mRNA kodujący RAP wykazano w sercu, mózgu, wątrobie, nerkach, trzustce, łożysku, płucach i mięśniach szkieletowych [35]. U myszy największe ilości mRNA dla RAP odkryto w nerkach, mózgu i jądrach, a najniższe w wątrobie i śledzionie. Wyniki badań immunohistochemicznych w tkankach myszy i szczura wykazują, że antygen RAP obecny jest we wszystkich komórkach zawierających gp330 lub LRP.

Oprócz RAP, modulatorem receptorów rodziny LDLR jest także lipaza lipoproteinowa [18]. Zwiększa ona wiązanie lipoprotein z tymi receptorami. Dodatkowym wzmocnieniem tego efektu jest obecność proteoglikanów. LPL rozpoczyna hydrolizę lipidów, przez co zwiększa dostępność lipoprotein dla receptora. Enzym ten może także uczestniczyć w wiązaniu lipoprotein z receptorami dzięki wiązaniu z lipidami



Rys. 4. Schemat struktury RAP (wg [42], zmodyfikowany)

w lipoproteinach oraz proteoglikanami na powierzchni komórki, a także z samym receptorem. LPL wzmacnia katabolizm lipoprotein z udziałem receptorów rodziny LDLR, nawet przy braku apoE.

Duży wpływ na wiązanie lipoprotein wzbogaconych w apoE z LRP ma także laktoferyna, która współzawodniczy w wiązaniu tych cząsteczek zarówno z LRP, jak i z HSPG [20].

## INNE RECEPTORY WIĄŻĄCE LIPOPROTEINY

Pozostałości chylomikronów są również wiązane przez receptor asjaloglikoproteinowy oraz receptor indukowany kwasami tłuszczowymi [18].

Receptor asjaloglikoproteinowy wiąże *in vitro* remnanty chylomikronów poprzez apoE, z powinowactwem 100 razy większym niż LDL, które zawierają jedynie apoB 100. Receptor ten jest obecny jedynie w wątrobie, ale jak dotąd nie wykazano, że uczestniczy on w klirensie remnantów chylomikronów *in vivo*. Receptor asjaloglikoproteinowy jest lektyną. Jest on specyficznie hamowany przez asjalofetuinę i inne asjaloproteiny.

Niedawno opisano receptor indukowany wolnymi kwasami tłuszczowymi. Homozygoty z rodzinną hipercholesterolemią, u których brak LDLR, mogą wiązać LDL po inkubacji tych lipoprotein z wolnymi kwasami tłuszczowymi lub z apoE. Miejscowe nagromadzenie wolnych kwasów tłuszczowych w następstwie lipolizy enzymatycznej może stanowić sygnał rekrutacji receptora indukowanego przez wolne kwasy tłuszczowe. Być może receptor indukowany wolnymi kwasami tłuszczowymi uczestniczy w klirensie lipoprotein ulegających szybkiej lipolizie, takich jak remnanty chylomikronów, a także w metabolizmie LDL niezależnym od LDLR.

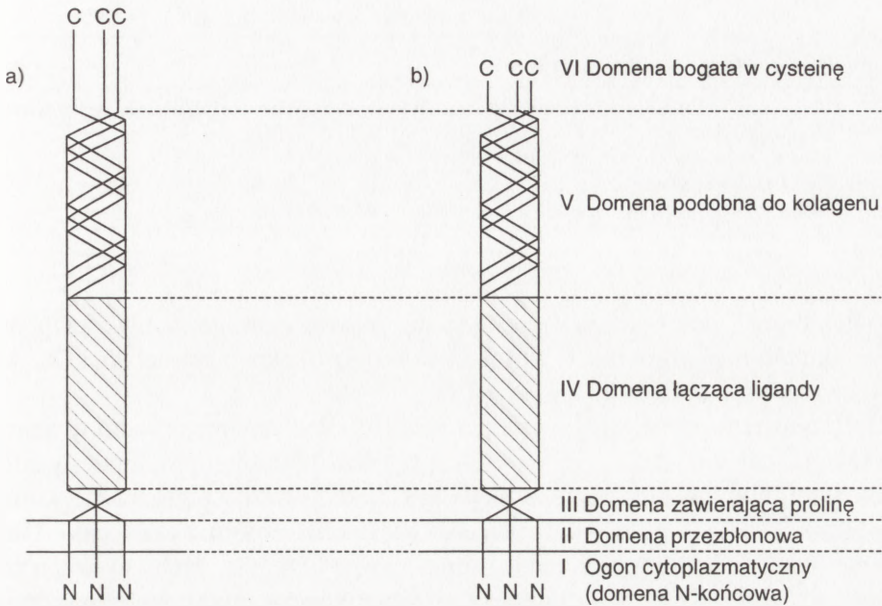


## RECEPTORY DLA ZMODYFIKOWANYCH LIPOPROTEIN

### Receptory zmiatające

W utylizacji zmodyfikowanych lipoprotein uczestniczą tak zwane receptory zmiatające (ang. *scavenger receptors*) [18]. Znana jest struktura dwóch typów receptora *scavenger*. Schemat ich budowy przedstawiono na rysunku 5. Receptory obydwu typów składają się z sześciu domen, wśród których jest 5 identycznych. Receptory te różnią się domeną C-końcową. Domena N-końcowa zawiera 50 aminokwasów i nie ma sekwencji Asn-Pro-X-Tyr, charakterystycznej dla rodziny LDLR. Zawiera ona natomiast sekwencję Tyr-X-Arg-Phe, która jest także obecna w ogonie cytoplazmatycznym receptora transferyny i jest prawdopodobnie odpowiedzialna za internalizację ligandów. Następną domeną jest odcinkiem hydrofobowym, składa się z 26 aminokwasów i spełnia funkcję domeny przezbłonowej. Kolejne 32 aminokwasy tworzą krótki odcinek zawierający prolinę i dwa miejsca N-glikozylacji. W skład następnej domeny wchodzi 163 aminokwasy, które tworzą 23 powtórzenia siedmioaminokwasowe. Domena ta ma strukturę potrójnej  $\alpha$ -helisy. Uczestniczy ona w wiązaniu ligandów z receptorem oraz w kwasowo-zależnej dysocjacji ligandów od receptorów zmiatających w niskim pH lizosomów. Dysocjację tę tłumaczy zmiana ładunku reszt histydynowych w niskim pH, co prowadzi do zmiany konformacji całego receptora. Kolejna domena jest podobna do kolagenu. U człowieka zawiera ona 23 powtórzenia tripletu Gly-X-Y, które tworzą potrójną spiralę. W obojętnym pH triplety te nie mają ładunku lub mają ładunek dodatni. Dodatni ładunek tej domeny umożliwi wiązanie polianionowych ligandów. Kolejna domena tworzy C-koniec receptora i nazywana jest domeną bogatą w cysteinę. W typie I składa się ona ze 110 aminokwasów, wśród których znajduje się 6 reszt cysteinowych. Domena C-końcowa w typie II receptora *scavenger* nie ma cysteiny i u człowieka zawiera tylko 17 reszt aminokwasowych. Wiązanie ligandów przez obydwa typy receptora *scavenger* odbywa się w podobny sposób, co sugeruje, że domena ta nie uczestniczy w tym procesie. Obydwa typy receptora wykazano w makrofagach obecnych w blaszkach miażdżycowych oraz w wielu narządach, takich jak: płuca, wątroba (komórki Kupffera), łożysko, mózg. W niektórych komórkach wiązanie utlenionych LDL jest całkowicie hamowane przez acetylowane LDL, a wiązanie acetylowanych LDL jest bardzo słabe przy nadmiarze utlenionych LDL. Nie jest wykluczone istnienie również innych receptorów zmiatających.

Incubacja makrofagów ze zmodyfikowanymi LDL prowadzi do wewnątrzkomórkowej degradacji części białkowej i do magazynowania w komórkach estrów cholesterolu. Ten proces przekształca makrofagi w komórki piankowate. Receptory zmiatające uczestniczą więc w patogenezie miażdżycy. W wątrobie receptory dla utlenionych LDL mogą odgrywać rolę protekcyjną przeciwko gromadzeniu we krwi zmodyfikowanych LDL. Zmodyfikowane LDL internalizowane przez komórki



Rys. 5. Schemat budowy receptorów zmiatających (wg [18] zmodyfikowany): a – receptor typu pierwszego, b – receptor typu drugiego

śródbłonna wątroby drogą receptora zmiatającego ulegają szybkiej hydrolizie. Wolny cholesterol jest kierowany do komórek parenchymalnych i tam jest przekształcany w kwasy żółciowe. W ten sam sposób komórki Kupffera metabolizują zmodyfikowane LDL. W monocytach jest niewiele receptorów zmiatających, w odróżnieniu od makrofagów. Estry forbolu, które są aktywatorami kinazy białkowej C, indukują przemianę monocytów w makrofagi *in vitro*, a tym samym znacznie zwiększają aktywność receptorów zmiatających przez pobudzenie syntezy mRNA i białka receptorowego. Efekt ten jest obserwowany także w innych komórkach, takich jak mięśnie gładkie czy fibroblasty.

Lipoproteiny inkubowane z hodowlami komórek śródbłonna ulegają oksydacji i są usuwane przez receptory dla chemicznie zmodyfikowanych LDL, podobne do receptora scavenger [7] LDL zmodyfikowane dialdehydem malonowym są usuwane przez ten sam receptor zmiatający, który wiąże zmodyfikowane chemicznie lipoproteiny o małej gęstości. Dla oksy-LDL zidentyfikowano odrębny receptor, który nie rozpoznaje acetylo-LDL. Receptory zmiatające usuwają również LDL zmodyfikowane w wyniku glikacji, karbamylicacji, etylacji oraz działania niektórych ksenobiotyków [41]. Wykaz poznanych dotąd ligandów receptorów *scavenger* podano w tabeli 2 [6]. Ich wspólną cechą jest polianionowy charakter, chociaż istnieje wiele polianionów, które nie są ligandami dla receptorów zmiatających.

Tabela 2. Ligandy dla receptorów zmiatających [6]

**Ligandy dla receptorów zmiatających**


---

lipoproteiny zmodyfikowane chemicznie (acetylowane, oksydowane glikowane, karbamylowane)  
 polirybonukleotydy  
 naturalne i zmodyfikowane polisacharydy  
 fosfolipidy anionowe  
 inne molekuly, takie jak: siarczan poliwinylu, azbest i endoksyny

---

W komórkach piankowatych pochodzenia makrofagowego w blaszkach miażdżycowych oraz w komórkach Kupffera wykryto białko o masie 95 kDa, które wykazuje swoistą interakcję z oksy-LDL.

Odrębny receptor makrofagów wiąże AGEp-LDL. Końcowe produkty zaawansowanej glikacji modyfikują różne białka, a także lipoproteiny o małej gęstości.

Lp(a), zmodyfikowana poprzez oksydację, jest usuwana przez różne komórki wątroby, w zależności od stopnia utlenienia i rozmiaru izoformy cząsteczki. Umiarowanie oksydowana lipoproteina (a) o masie 610 kDa jest wychwytywana przez komórki Kupffera. Komórki śródbłonka usuwają głównie intensywnie oksydowaną Lp(a) o masie 440 kDa.

**Receptor FcR<sub>II</sub>-B2 komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego**

W usuwaniu utlenionych LDL po ich agregacji uczestniczy receptor Fc, którego masa cząsteczkowa wynosi 50 kDa [18]. Wychwyt utlenionych LDL przez ten receptor nie jest blokowany przez acetylowane LDL. Wiązanie utlenionych LDL z receptorami Fc może wyzwać lub blokować odpowiedzi komórki, takie jak uwalnianie aktywnych odmian tlenu czy mediatorów procesu zapalnego. Receptor Fc uczestniczy także w usuwaniu kompleksów immunologicznych, rozpoznając region Fc IgG.

**Glikoproteina CD36**

W wiązaniu utlenionych LDL uczestniczy również CD36, glikoproteina o masie cząsteczkowej 88 kDa [6,18]. Znajduje się ona na powierzchni monocytów, płytek krwi oraz komórek śródbłonka i jest receptorem dla trombospondyny i kolagenu. Może ona wyzwać aktywację trombocytów i monocytów. Internalizacja oksy-LDL z udziałem CD36 nie jest blokowana ani przez acetylowane, ani przez natywne LDL. Utlenione LDL, które wiążą się z CD36 na powierzchni monocytów i komórek śródbłonka, mogą oddziaływać na przyleganie tych dwu typów komórek. Wiązanie oksy-LDL z CD36 trombocytów może modulować wytwarzanie czynników wzrostowych i oksydantów przyczyniających się do rozwoju uszkodzeń ściany naczyń.

## Receptor HDL

Lipoproteina HDL jest uważana za czynnik antyryzyka rozwoju miażdżycy. Uczestniczy ona w odwrotnym transporcie cholesterolu, z tkanek obwodowych do wątroby, a także jest związana z hamowaniem procesu utleniania LDL [41]. W komórkach wątroby, śródbłonna, miocytach gładkich, fibroblastach i makrofagach obecne są specyficzne miejsca wiążące HDL [18]. Z błony komórkowej tych komórek wyodrębniono białko wiążące HDL – HBP. Jego masa cząsteczkowa jest zależna od komórki, z której pochodzi. Według różnych autorów wynosi ona od 95 do 180 kDa, najczęściej 110 kDa. Struktura HBP nie jest podobna do poznanych dotąd receptorów przezbłonowych, co sugeruje także odmienne ich działanie. Wiązanie HDL z HBP zwiększa się, gdy komórki są wypełnione cholesterolem oraz wtedy, gdy ich wzrost jest zahamowany. Jest to wynikiem zarówno zwiększenia ilości mRNA kodującego HBP, jak i samego białka. Wiązanie HDL z powierzchnią komórki aktywuje kinazę białkową C (PK-C). Stymulacja PK-C powoduje proliferację komórek i wydzielanie apoE. Wiązanie HDL z adipocytami i trombocytami stymuluje wytwarzanie diacyloglicerolu (DAG) przez fosfolipazę C związaną z białkiem Go lub Gi. Po związaniu HDL z receptorem następuje translokacja PK-C z cytoplazmy do błony plazmatycznej. Inhibitory PK-C zapobiegają wpływowi cholesterolu z komórki z udziałem HDL.

## PODSUMOWANIE

Zapewne nie znane są jeszcze wszystkie receptory, których ligandami są lipoproteiny. Funkcje nawet tych znanych już receptorów wyjaśnione są jedynie częściowo. Niektórych funkcji możemy się tylko domyślać na podstawie przyłączanych ligandów i lokalizacji receptorów.

Odkrywanie nowych ról pełnionych przez receptory lipoprotein oraz poznawanie ich mechanizmów działania być może w przyszłości pozwoli, między innymi na wcześniejszą diagnostykę miażdżycy i przyczyni się do jej skuteczniejszego leczenia.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ABBATE M, BACHINSKY DR, MCCLUSKEY RT, BROWN D. Expression of gp330 and gp330/alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein in renal tubular differentiation. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4: 2003–2015.
- [2] ANDREASEN PA, SOTTRUP-JENSEN L, KJOLLER L, NYKJAER A, MOESTRUP SK, PETERSEN CM, GLIEMANN J. Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes. *FEBS Lett* 1994; 338: 239–245.

- [3] ARGRAVES KM, BATTEY FD, MACCALMAN CD, MCCRAE KR, GAFVELS M, KOZARSKY KF, CHAPPELL DA, STRAUSS JF-3RD, STRICKLAND DK. The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type I complexes. *J Biol Chem* 1995; **270**: 26550–26557.
- [4] BATTEY FD, GAFVELS ME, FITZGERALD DJ, ARGRAVES WS, CHAPPELL DA, STRAUSS-3RD JF, STRICKLAND DK. The 39-kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1994; **269**: 23268–23273.
- [5] BEISIEGEL U, KRAPP A, WEBER W, OLIVECRONA G. The role of  $\alpha$ 2-M receptor/ LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **737**: 53–69.
- [6] BERKEL TJC, FLUITER K, VELZEN AG, VOGELEZANG CJM, ZIERE GJ. LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins. *Atherosclerosis* 1995; **118** Suppl: S43–S50.
- [7] BRUCKDORFER K. Oxidized lipoproteins. *Baillieres Clin Endocrin Metab* 1995; **9**: 721–737.
- [8] CHOWDHARY BP, LUNGGREN S, JOHANSSON M, HJALM G, AKERSTORM G, GUSTAVSSON I, RASK L. In situ hybridization mapping of a 500-kDa calcium-sensing protein gene (LRP2) to human chromosome region 2q31-q32.1 and porcine chromosome region 15q22-q24. *Cytogenet Cell Genet* 1995; **71**: 120–123.
- [9] GAFVELS ME, CAIRD M, BRITT D, JACKSON CL, PATTERSON D, STRAUSS JF. Cloning of a cDNA encoding a putative human very low density lipoprotein/apolipoprotein E receptor and assignment of the gene to chromosome 9pter-p23. *Somat Cell Mol Genet* 1993; **19**: 557–569.
- [10] GAFVELS ME, PAAVOLA LG, BOYD CO, NOLAN PM, WITTMACK F, CHAWLA A, LAZAR MA, BUCAN M, ANGELIN BO, STRAUSS-3RD JF. Cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the murine homolog of the very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: expression pattern and assignment of the gene to mouse chromosome 19. *Endocrinology* 1994; **135**: 387–94.
- [11] GLIEMANN J, NYKJAER A, PETERSEN M, JORGENSEN KE, NIELSEN M, ANDREASEN PA, CHRISTENSEN I, LOOKENE A, OLIVECRONA G, MOESTRUP SK. The multiligand  $\alpha$ -macroglobulin receptor/low density receptor-related protein ( $\alpha$ 2-MR/LRP). *Ann N Y Acad Sci* 1994; **737**: 20–38.
- [12] HAYASHI K, NAKASHIMA K, SAEKI M, KURUSHIMA H, KUROKAWA J, KUGA Y, NOMURA S, OHKURA Y, OHTANI H, TANAKA K i in. Identification of a functional receptor differing from the LDL receptor that catabolizes chylomicron remnant in Hep G2 cells. *Atherosclerosis* 1993; **104**: 105–115.
- [13] JACOBSEN L, HERMANN M, VIEIRA PM, SCHNEIDER WJ, NIMPF J. The chicken oocyte receptor for lipoprotein deposition recognizes alpha 2-macroglobulin. *J Biol Chem* 1995; **270**: 6468–6475.
- [14] KANALAS JJ, MAKKER SP. Analysis of a 45-kDa protein that binds to the Heymann nephritis autoantigen GP330. *J Biol Chem* 1993; **268**: 8188–8192.
- [15] KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E, GRABOWSKA-BOCHENEK R. Funkcje biologiczne  $\alpha$ 2-makroglobuliny i jej receptora. *Post Biol Kom* 1993; **20**: 245–255.
- [16] KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E, GRABOWSKA-BOCHENEK R. Katabolizm chylomikronów i ich pozostałości z udziałem receptora  $\alpha$ 2-makroglobuliny. *Przegl Lek* 1993; **50**: 346–348.
- [17] KORENBERG JR, ARGRAVES KM, CHEN XN, TRAN H, STRICKLAND DK, ARGRAVES WS. Chromosomal localization of human genes for the LDL receptor family member glycoprotein 330 (LRP2) and its associated protein RAP (LRPAP1). *Genomics* 1994; **22**: 88–93.
- [18] LESTAVEL S, FRUCHART JC. Lipoprotein receptors. *Cell Mol Biol* 1994; **40**: 461–481.

- [19] LUNDSTROM M, ORLANDO RA, SAEDI MS, WOODWARD L, KURIHARA H, FARQUHAR MG. Immunocytochemical and biochemical characterization of the Heymann nephritis antigenic complex in rat L2 yolk sac cells. *Am J Pathol* 1993; **43**: 1423–1435.
- [20] MAHLEY RW, JI ZS, BRECHT WJ, MIRANDA D, HE D. Role of heparan sulfate and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1994; **737**: 39–52.
- [21] MAKKER SP. A novel autoantibody to plasminogen and its characterization in Heymann nephritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; **72**: 105–113.
- [22] MOESTRUP SK, CUI S, VORUM H, BREGENGARD C, BJORN SE, NORRIS K, GLIEMANN J, CHRISTENSEN EI. Evidence that epithelial glycoprotein 330/megalin mediates uptake of polybasic drugs. *J Clin Invest* 1995; **96**: 1404–1413.
- [23] MOESTRUP SK, NIELSEN S, ANDREASEN P, JORGENSEN KE, NYKJAER A, ROIGARD H, GLIEMANN J, CHRISTENSEN EI. Epithelial glycoprotein-330 mediates endocytosis of plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor type-1 complexes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 16564–16570.
- [24] MOESTRUP S, GLIEMANN J. Analysis of ligand recognition by the purified  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor (LDL receptor-related protein). *J Biol Chem* 1991; **266**: 14011–14017.
- [25] NIELSEN MS, NYKJAER A, WARSHAWSKY I, SCHWARTZ AL, GLIEMANN J. Analysis of ligand binding to the  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23713–23719.
- [26] OKA K, ISHIMURA-OKA K, CHU MJ, SULLIVAN M, KRUSHKAL J, LI WH, CHAN L. Mouse very-low-density-lipoprotein receptor (VLDLR) cDNA cloning, tissue-specific expression and evolutionary relationship with the low-density-lipoprotein receptor. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 975–982.
- [27] OKA K, TZUNG KW, SULLIVAN M, LINDSAY E, BALDINI A, CHAN L. Human very-low-density lipoprotein receptor complementary DNA and deduced amino acid sequence and localization of its gene (VLDLR) to chromosome band 9p24 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; **20**: 298–300.
- [28] ORLANDO RA, FARQUHAR MG. Identification of a cell line that expresses a cell surface and a soluble form of the gp330/receptor-associated protein (RAP) Heymann nephritis antigenic complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 4082–4086.
- [29] REBECK GW, REITER JS, STRECKLAND DK, HYMAN BT. Apolipoprotein E in sporadic Alzheimers disease allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 1993; **11**: 575–580.
- [30] SAITO A, PIETROMONACO S, LOO AK, FARQUHAR MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9725–9729.
- [31] SAKAI J, HOSHINO A, TAKAHASHI S, MIURA Y, ISHII H, SUZUKI H, KAWARABAYASI Y, YAMAMOTO T. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* 199; **269**: 2173–2182.
- [32] SIMONSEN AC, HEEGAARD CW, RASMUSSEN LK, ELLGAARD L, KJOLLER L, CHRISTENSEN A, ETZERODT M, ANDREASEN PA. Very low density lipoprotein receptor from mammary gland and mammary epithelial cell lines binds and mediates endocytosis of M(r) 40,000 receptor associated protein. *FEBS Lett* 1994; **354**: 279–283.
- [33] STEFANSSON S, CHAPPELL DA, ARGRAVES KM, STRICKLAND DK, ARGRAVES WS. Glycoprotein 330/low density lipoprotein receptor-related protein-2 mediates endocytosis of low density lipoproteins via interaction with apolipoprotein B100. *J Biol Chem* 1995; **270**: 19417–19421.
- [34] STRICKLAND DK, KOUNNAS MZ, ARGRAVES WS. LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J* 1995; **9**: 890–898.
- [35] STRICKLAND DK, KOUNNAS MZ, WILLIAMS SE, ARGRAVES WS. LDL receptor-related protein (LRP): a multiligand receptor. *Fibrynolysis* 1994; **8**: Suppl. 1, 204–215.

- [36] STRICKLAND DK, ASHCOM JD, WILLIAMS S, BURGESS WH, MIGLIORINI M, ARGRAVES WS. Sequence identity between the alpha 2-makroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggest that this molecule is a multifunctional receptor. *J Bioch Chem* 1990; **265**: 17401–17404.
- [37] STRICKLAND DK, ASHCOM JD, WILLIAMS S, BATTEY F, BEHRE E, MCTIGUE K, BATTEY JF, ARGRAVES WS. Primary structure of alpha 2-macroglbulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen. *J Biol Chem* 1991; **266**: 13364–13369.
- [38] SZAFRAN H, KNAPIK-CZAJKA M. Podstawy biochemiczne gospodarki lipidowej organizmu człowieka. Kraków, Collegium Medicum UJ, 1994.
- [39] TAKAHASHI S, KAWARABAYASI Y, NAKAI T, SAKAI J, YAMAMOTO T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9252–9256.
- [40] WEBB JC, PATEL DD, JONES MD, KNIGHT BL, SOUTAR AK. Characterization and tissue-specific expression of the human 'very low density lipoprotein (VLDL) receptor' mRNA. *Hum Mol Genet* 1994; **3**: 531–537.
- [41] WEHR H. Biologiczne skutki modyfikacji lipoprotein. *Post Bioch* 1995; **41**: 201–205.
- [42] WILLIAMS SE, KOUNNAS MZ, ARGRAVES KM, ARGAVES WS, STRICKLAND DK. The  $\alpha$ 2M receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and the receptor associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 1994; **737**: 1–13.
- [43] ZHENG G, BACHINSKY DR, STAMENKOVIC I, STRICKLAND DK, BROWN D, ANDRES G, MCCLUSKEY RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 1994; **42**: 531–542.

*Redaktor prowadzący: Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 02.08.1996 r.*

*Przyjęto: 24.10.1996 r.*

*Adres autora: Śląska Akademia Medyczna,*

*Katedra i Zakład Biochemii i Chemii,*

*40-752 Katowice, ul. Medyków 18*

## TRÓJWYMIAROWA MIKROSKOPIA ŚWIETLNA\*

### 3-D MICROSCOPY

Leszek KORDYLEWSKI

Zakład Anatomii Porównawczej, Instytut Zoologii,  
Uniwersytet Jagielloński, Kraków

*Streszczenie:* Konwencjonalna mikroskopia świetlna nie pozwala na uzyskanie informacji o strukturze trójwymiarowej preparatu, ponieważ mikroskopy wytwarzają wyłącznie obrazy dwuwymiarowe. Może to jednak prowadzić do błędów interpretacji struktury mikroskopowej. Niniejszy artykuł opisuje zasady działania, zalety i zastosowania nowego typu trójwymiarowego mikroskopu świetlnego, który dzięki zastosowaniu ukośnego oświetlenia i widzenia stereoskopowego pozwala na bezpośrednią obserwację przestrzennej struktury badanego preparatu ze znaczną rozdzielczością na dużych powiększeniach.

*Słowa kluczowe:* mikroskopia trójwymiarowa, histologia, analiza i przetwarzanie obrazu, stereoskopia, holografia.

*Summary:* Conventional light microscopy is normally devoid of information regarding the 3-D structure of the examined specimen, since regular microscopes project only two-dimensional images. This may lead to some misinterpretations of the submicroscopical structure of the specimen. In the article the principles, advantages and applications are described of a new type of real-time, high-definition 3-D light microscope, which allows in-depth inspection of the specimen thanks to oblique illumination and stereo imaging.

*Key words:* 3-D microscopy, histology, image analysis and image processing, stereo imaging, holography.

## PERCEPCJA STEREO

Ewolucja człowieka miała miejsce w trójwymiarowej rzeczywistości. Ludzkie zmysły, w szczególności wzrok i słuch, są dobrze przystosowane do percepcji zjawisk przestrzennych (trójwymiarowych). Mózg człowieka jest najdoskonalszym proce-

\*Praca częściowo finansowana z grantu KBN DS/JZ/AP/96.



sorem przetwarzania obrazów, którego syntetyczny odpowiednik nie został jeszcze skonstruowany. Jesteśmy zdolni przestrzennie interpretować nawet dwuwymiarowe dane, w których informacja przestrzenna jest niekompletna, jak np. dwuwymiarowe fotografie, filmy lub dzieła sztuki malarskiej.

Instrumenty optyczne, będące wytworem człowieka, stosują prostszą od trójwymiarowej, dwuwymiarową technikę wytwarzania obrazów. Mózg ludzki na podstawie poprzednich doświadczeń wizualnych, uzupełnia brakujące informacje odnośnie cech przestrzennych struktur odwzorowanych w takich obrazach.

Wraz z postępem techniki obserwuje się jednak kolejne próby wytwarzania kompletnych – trójwymiarowych obrazów, które niewątpliwie przewyższają obrazy płaskie, są bogatsze w szczegóły i robią większe wrażenie dzięki swej głębi. Obrazy takie odbierane są przez nas jako bliższe naturalnej rzeczywistości. Dość wspomnieć stereofotografię, która przeżywała szczyt zainteresowania na przełomie wieków, fotoplastikony (jeszcze do niedawna funkcjonujące jako publiczne atrakcje), komercyjne filmy 3-D, holografię, czy ostatnie barwne wydawnictwa z serii "Magiczne Oko".

Ponieważ często wystarcza nam obraz dwuwymiarowy, a jego wytworzenie jest prostsze i tańsze, stąd też w większości mamy do czynienia z obrazowaniem płaskim. Kto jednak zetknął się z obrazowaniem trójwymiarowym, jest natychmiast przekonany o jego wyższości i rozumie, że tworzenie obrazów przestrzennych i obcowanie ze światem 3-D warte jest wysiłków i nakładów. Z naukowego punktu widzenia, obrazy trójwymiarowe zawierają pełniejszą informację o strukturze przedmiotu, który przedstawiają. Kordylewski i in. [13, 15, 16] wykazali, że trójwymiarowe stereogramy mikroskopowe mogą być źródłem analiz niemożliwych do przeprowadzenia na "pozbawionych grubości", płaskich obrazach komórek i tkanek.

## PRZESTRZENNOŚĆ PREPARATU MIKROSKOPOWEGO

Od początków mikroskopii optycznej przyjęło się uważać, że preparat mikroskopowy, aby był przejrzysty, musi być bardzo cienki, tak że zazwyczaj jego grubość uznaje się w rezultacie za nieistotną. Tymczasem, wbrew potocznemu przekonaniu, preparaty mikroskopowe – nawet zaledwie kilkumikronowej grubości – zawierają rozmaite submikroskopowe elementy rozmieszczone przestrzennie, a ich wzajemne relacje mogą okazać się niezmiernie ważne dla istoty badanego zagadnienia. W szczególności preparaty biologiczne są zazwyczaj bardzo złożonymi strukturami trójwymiarowymi o skomplikowanej budowie.

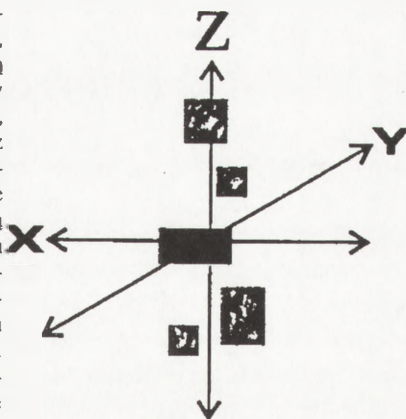
Przy dużych powiększeniach odległości pomiędzy elementami preparatu mikroskopowego w osi "z" są często zbliżone w swej wielkości do łatwo dostrzegalnych wartości w płaszczyźnie "x-y". Zatem, przy pomiarach czynionych na preparacie,

lub przy jakiegokolwiek (nawet jedynie jakościowej analizie) błędem jest zaniedbywanie wartości "z" (rys. 1).

Szczególnie w przypadku preparatów biologicznych, rutynowo stosowany płaski rzut struktur preparatu może często prowadzić do mylnych interpretacji morfologicznych. Tworzą się wtedy tzw. artefakty interpretacji obrazu [14]. Na przykład, nie jest obojętne, na którym z wielu obecnych w polu widzenia (i przesłaniających się) włókien mięśniowych tworzy się synapsa. Na płaskim, dwuwymiarowym zdjęciu nie jest jednoznacznie widoczne, czy zaopatrujący płytkę końcową akson przebiega nad czy pod włóknem mięśniowym [12]. Skupienia ziarn srebra w preparacie autoradiograficznym mogą być spowodowane nierównomierną grubością emulsji pokrywającej preparat, a nie – jak się oczekuje – wzmożonym specyficznym sygnałem radioaktywnym w rejonie obfitego występowania ziarn [17].

Doświadczony mikroskopista, posługując się śrubą mikrometryczną mikroskopu świetlnego umie poruszać się w grubości preparatu (w osi "z") i z łatwością rozpoznaje wzajemne relacje fragmentów preparatu położonych nad sobą. Mimo to jednak w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym nie da się nigdy równocześnie widzieć ostro szczegółów znajdujących się w różnych płaszczyznach preparatu (np. struktur komórki i ziarn srebra w pokrywającej je emulsji), szczególnie w przypadku dużych powiększeń. Tym bardziej więc zdjęcia fotograficzne lub video przedmiotów mikroskopowych są całkowicie pozbawione informacji przestrzennej. Dwuwymiarowe obrazy mikroskopowe nie zawierają bowiem wcale informacji o rozmieszczeniu elementów preparatu w jego grubości. Nieostre kontury poszczególnych składników strukturalnych preparatu nakładają się na siebie, zacierając ogólny obraz i obniżając jego rozdzielczość.

Rys. 1. Schemat rozmieszczenia elementów submikroskopowych względem osi X, Y i Z w preparacie mikroskopowym. Oś Z jest identyczna z osią optyczną mikroskopu, płaszczyzna wyznaczona przez osie X i Y jest płaszczyzną równoległą do płaszczyzny stolika mikroskopu. Badany szczegół preparatu, zaznaczony ciemnym prostokątem, znajduje się na skrzyżowaniu osi X, Y i Z. Jego ostry obraz tworzony jest przez układ optyczny mikroskopu. Poza płaszczyzną wyznaczoną przez osie X i Y znajdują się inne detale preparatu, które nie są widoczne ostro; zaznaczone są one jaśniejszymi kwadratami. W szczególności jeden z nich leży na osi Z, bezpośrednio ponad obserwowanym elementem zaznaczonym w postaci prostokąta. W konwencjonalnym mikroskopie świetlnym trudno jest ustalić, który z tych elementów jest wyżej, a który niżej i jaka jest pomiędzy nimi odległość na osi Z. Co więcej, jeden z nich, widziany nieostro, może przeszkadzać w obserwacji drugiego [wg Edge Scientific, zmieniony]



## MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA

Znikoma grubość skrawka ultracienkiego (rzędu zaledwie kiludziesięciu nanometrów) jest powodem, dla którego prawie zawsze elektronogramy interpretuje się jako odwzorowania struktur o zerowej grubości. Taka dwuwymiarowa analiza elektronogramów może być także źródłem błędnych interpretacji. Na przykład błona komórkowa jest dobrze widoczna jedynie, gdy w skrawku ma przebieg mniej więcej prostopadły do płaszczyzny przekroju; gdy przekrój przebiega ukośnie względem płaszczyzny błony (skrawek zawiera fragment błony o ukośnym przebiegu względem jego powierzchni), to może wtedy wydawać się, że błony brak lub że jest ona nieciągła, porozrywana. Kordylewski i in. [16] zwrócili uwagę na to, że w replikach tkanek obserwowanych monoskopowo cienie elementów wystających mogą być mylnie zinterpretowane jako powstające na zagłębieniach preparatu, a nie na wypukłościach. Mimo ewidentnej możliwości popełniania takich błędów, do rzadkości należą jednak żmudne analizy trójwymiarowej struktury preparatów mikroskopowo-elektronowych [6, 10, 19]. Kordylewski i in. [13] wykazali, że takie trójwymiarowe analizy znacznie przewyższają swą jakością rutynowe analizy morfologiczne przeprowadzane na podstawie wyłącznie dwuwymiarowej dokumentacji fotograficznej. Obserwacja trójwymiarowa umożliwia bowiem większą dokładność w generowaniu i analizie danych ilościowych [13, 14].

W transmisyjnej mikroskopii elektronowej stolik goniometryczny zapewnia możliwość nachylania preparatu, a co za tym idzie jego obserwacji pod różnymi kątami względem osi optycznej mikroskopu. Poprzez żmudne serie zdjęć stereoskopowych można lepiej poznać relacje przestrzenne w grubości ultracienkiego skrawka tkanki lub w trójwymiarowej replice preparatu [14]. Niestety, większość badaczy poprzestaje jedynie na dwuwymiarowej analizie, zaniedbując informację o przestrzennej organizacji badanych struktur.

## MIKROSKOPY BINOKULARNE

Mikroskopy stereoskopowe, tzw. lupy binokularne, umożliwiają bezpośredni wgląd w głębię preparatu na innej zasadzie niż mikroskopy elektronowe. Sposób ten jest bliższy naturalnemu obuocznemu widzeniu. Odbywa się to przez niezależną obserwację prawym i lewym okiem, przy użyciu osobnych kompletnych układów optycznych (obiektyw-okular) skierowanych na preparat pod różnym kątem. Stąd też prawe i lewe oko widzi w lupie binokularnej odmienne obrazy, które zlewają się w jeden obraz przestrzenny.

Niestety, wadą lup binokularnych są ich małe powiększenia. Ze względu na znaczną grubość i nieprzejrzystość preparatów o względnie dużych rozmiarach,

obserwacja przy pomocy lupy binokularnej ogranicza się zazwyczaj jedynie do powierzchni badanych obiektów.

Konwencjonalny mikroskop świetlny, mimo binokularnych nasadek okularowych, ma tylko pojedynczy obiektywowy układ optyczny, stąd (pomimo nasadki binokularnej) widzenie stereoskopowe w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym nie jest możliwe. Binokular mikroskopu podaje każdemu z oczu ten sam identyczny obraz wytworzony przez obiektyw. W związku z tym, obuoczne widzenie w nasadce binokularnej mikroskopu świetlnego nie przynosi informacji o przestrzennej strukturze preparatu.

## MIKROSKOPIA KONFOKALNA

Wprowadzenie w ostatnich latach mikroskopii konfokalnej umożliwiło badanie trójwymiarowej struktury wewnętrznej mikroskopowych preparatów biologicznych [7, 9, 26]. W drodze "optycznego skrawania" takich preparatów mikroskop konfokalny pozwala poznać wewnętrzną organizację preparatu mikroskopowego z wielką rozdzielczością na dużych powiększeniach [3, 20].

Wadą mikroskopów konfokalnych jest jednak konieczność elektronicznego przetwarzania obrazu dla uzyskania trójwymiarowej rekonstrukcji badanych struktur, a co zatem idzie możliwość obserwacji żywych obiektów i manipulacji nimi podczas obserwacji jest zwykle ograniczona [24, 25]. Choć obrazy uzyskiwane przy pomocy mikroskopu konfokalnego są zazwyczaj spektakularnie kolorowe, należy też jednak pamiętać, że są to barwy sztuczne, uzyskiwane na drodze elektronicznego przetwarzania obrazu i w żadnym stopniu nie mają nic wspólnego z oryginalnym, naturalnym kolorytem właściwego preparatu [4, 20, 21, 22].

## NOWY ŚWIETLNY MIKROSKOP TRÓJWYMIAROWY

Ostatnio skonstruowano nowy typ mikroskopu świetlnego (R400), który umożliwia bezpośrednią (*real-time*) obserwację struktury trójwymiarowej preparatu mikroskopowego oraz uzyskiwanie jej obrazów stereoskopowych o wysokiej rozdzielczości i kontraście (*high-definition*). Ponieważ mikroskop ten umożliwia obserwację bezpośrednią, efekt trójwymiarowy powstaje bez jakiegokolwiek przetwarzania obrazu. Informacja przestrzenna jest dostępna natychmiast i jest ewidentna dla każdego, nawet niewprawnego obserwatora [5].

W mikroskopie trójwymiarowym R400 otrzymuje się wysokiej jakości kolorowe obrazy stereoskopowe, o barwach wiernych oryginalnemu preparatowi. Efekt ste-

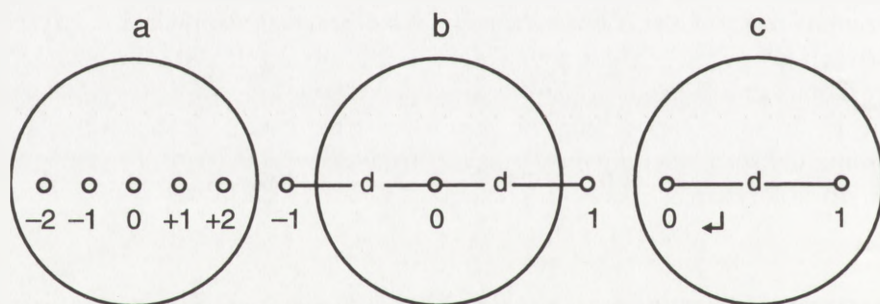
reoskopowy uzyskuje się nawet przy zastosowaniu imersji i obiektywu 100x. Mikroskop ten nie powstał ani w Japonii, ani w Niemczech, lecz wytworzony został w Kalifornii (Santa Monica, USA) i rozprowadzany jest przez niezależną od wielkich koncernów optycznych małą amerykańską firmę, przeżywającą ostanio zawrotny rozwój, a ukrywającą się pod nazwą "Edge-Scientific Instruments".

Ostatnio firma ogłosiła, że oprócz samodzielnych mikroskopów trójwymiarowych dostępne są już przystawki 3-D (podobne do przystawek do polaryzacji lub kontrastu faz), dzięki którym każdy konwencjonalny mikroskop świetlny można przekształcić w mikroskop do obserwacji trójwymiarowej struktury preparatu.

## ZASADY DZIAŁANIA TRÓJWYMIAROWEJ MIKROSKOPII ŚWIETLNEJ

Działanie nowego typu mikroskopu R400 opiera się na trzech podstawowych zasadach:

- (1) dyfrakcji,
- (2) ukośnego oświetlenia i
- (3) obrazowania stereoskopowego.



Rys. 2. Schemat ilustrujący zasady zwiększenia rozdzielczości mikroskopu stosującego ukośne oświetlenie przez boczne przesunięcie wiązki światła. Schematy a, b i c przedstawiają pole widzenia mikroskopu (aperturę numeryczną obiektywu), w którym widoczna jest centralna wiązka światła 0 oraz ugięte w wyniku dyfrakcji na elemencie preparatu wiązki pochodne +1, +2, -1 i -2. W schemacie 2a wiązka 0 zajmuje pozycję centralną w osi optycznej mikroskopu i do obiektywu wpadają również wiązki pochodne, symetrycznie z obu stron wiązki centralnej. W schemacie 2b do obiektywu wpada jedynie wiązka centralna, natomiast żadna z wiązek pochodnych "nie mieści się" w aperturze obiektywu ze względu na duży odstęp pomiędzy wiązkami "d". W takim przypadku obiekt, na którym nastąpiła dyfrakcja, nie będzie widoczny, gdyż wiązka 0 nie jest wystarczająca do wytworzenia obrazu dyfrakcyjnego; potrzebna jest interferencja z co najmniej jedną z wiązek pochodnych. W schemacie 2c wiązki zostały odchyłone w lewo względem osi optycznej mikroskopu i uzyskano oświetlenie ukośne. W aperturze obiektywu mieści się nie tylko wiązka 0, ale także odległa od niej o wartość  $d$  wiązka pochodna 1, dzięki czemu może dojść do interferencji i wytworzenia obrazu obiektu, na którym nastąpiło ugięcie światła, a który pozostawał niewidoczny w warunkach zilustrowanych na schemacie 2b. W ten sposób ukośne oświetlenie preparatu przyczynia się do zwiększenia rozdzielczości powstającego obrazu (wg Fostera [5])

Po pierwsze, tak jak w każdym mikroskopie optycznym, obraz tworzy się tu w wyniku interferencji wiązki promieni światła ugiętego na szczegółach preparatu i wiązki promieni światła przechodzącego bez dyfrakcji wprost przez tło preparatu. Na każdym szczególe uginającym światło powstaje charakterystyczny układ prążków dyfrakcyjnych, z których środkowy prążek zerowy odpowiada oświetleniu przechodzącemu przez tło, a pozostałe prążki odzwierciedlają własności optyczne danego punktu preparatu uginającego światło. Prążki te zaznaczone są schematycznie na rysunku 2a.

Po drugie, nowy mikroskop trójwymiarowy R400 opiera się na zasadzie ukośnego oświetlenia. W konwencjonalnym mikroskopie optycznym stosuje się czasem oświetlenie ukośne przez przesunięcie prążka zerowego względem osi optycznej mikroskopu dla uzyskania zwiększenia kontrastu obrazu. Efekt taki uzyskuje się przez zastosowanie specjalnych półksiężycowych przysłon. Obraz zyskuje na kontraście, ponieważ boczne oświetlenie przysparza mu "cieni" i krawędzie obiektów stają się wyraźniejsze. W skrajnym przypadku całkowitego wygaszenia centralnej wiązki światła przysłoną pierścieniową uzyskuje się efekt "ciemnego pola". Na czarnym tle obiekty mikroskopowe błyszczą wtedy jasnym światłem, niczym pyłki w promieniach słońca wpadającego z bocznego okna do ciemnego pokoju.

W przypadku stosowania ukośnego oświetlenia preparatu tło jest jasne, natomiast ciemne kontury detali odbierane są przez oko jako cienie, podczas gdy przeciwnie im krawędzie znaczą się jaśniej i odbierane są jako wypukłości. Sprzyja to interpretowaniu obrazu na sposób trójwymiarowy, jest to jednak złudzenie, nie mające wiele wspólnego z prawdziwą przestrzenną strukturą preparatu [9]. Niewątpliwie jednak obraz taki jest o wiele bardziej kontrastowy niż w przypadku konwencjonalnego oświetlenia, co ma ogromne znaczenie dla przyżyciowych obserwacji preparatów niebarwionych.

Zasady zwiększenia rozdzielczości obrazu powstałego w wyniku ukośnego oświetlenia wyjaśnione są na schematach (rys. 2). Rysunek 2a przedstawia pole widzenia mikroskopu, które w normalnych warunkach obejmuje centralną wiązkę światła 0 oraz wiązki dyfrakcyjne pierwszego i drugiego rzędu, które wpadając do obiektywu i interferując tworzą obraz mikroskopowy. Dla utworzenia obrazu, a w szczególności dla uzyskania informacji o jego strukturze przestrzennej, oprócz wiązki centralnej do obiektywu wpadać musi co najmniej jedna wiązka odchylona, przy czym wystarczy, aby była to wiązka z jednej tylko strony, dodatniej lub ujemnej. Niekoniecznie muszą do obiektywu wpadać wiązki symetryczne, + i -. Może zdarzyć się jednak taka sytuacja, kiedy obiektyw nie obejmie żadnej z odchylonych wiązek, ponieważ zlokalizowane będą one poza jego aperturą numeryczną, co zilustrowano na rysunku 2b. Odstęp pomiędzy prążkami  $d$  jest tak znaczny, że przy centralnym położeniu wiązki zerowej żaden z prążków pierwszorzędowych nie "mieści się" w obiektywie. Wtedy nie jest możliwe wytworzenie obrazu struktury odchylającej światło i pozostaje ona niezauważalna. Jeżeli jednak wiązkę centralną przesunie się w bok względem

osi optycznej układu, jedna z pochodnych wiązek pierwszego rzędu, przesunięta w bok wraz z wiązką zerową, zostanie objęta przez obiektyw (rys. 2c). W rezultacie, przy dużym powiększeniu, uzyskamy kontrastowy obraz szczegółu, który był niedostrzegalny w sytuacji zilustrowanej na rysunku 2b. Tak więc ukośne oświetlenie zapewnia nie tylko zwiększenie kontrastu obrazu, lecz także lepszą rozdzielczość.

Oczywiście, im więcej dodatkowych prążków dyfrakcyjnych zostanie objętych obiektywem mikroskopu, tym bardziej wyrazisty i kontrastowy staje się obraz preparatu. Ukośne oświetlenie sprzyja też uwolnieniu obrazu od rozmytej poświaty pochodzącej od struktur spoza płaszczyzny ostrości, zacierającej szczegóły [11].

## ZALETY STEREOSKOPII

U podstaw zwiększenia rozdzielczości nowego mikroskopu trójwymiarowego R400 leżą także zasady widzenia stereoskopowego. Aby się przekonać o tym, że widzenie obuoczne zapewnia lepszą rozdzielczość, można wykonać prosty eksperyment. Jeśli na wysokości oczu zaznaczymy na ścianie bardzo blisko siebie dwa wyraźne punkty i odejdziemy od ściany na taką odległość, by kąt widzenia pomiędzy tymi punktami wynosił około  $1^{\circ}$ , to zamknąwszy jedno oko, z tej odległości zobaczymy jedynie pojedynczą plamkę, gdyż oba punkty zleją się ze sobą. Gdy jednak na te same punkty popatrzymy obuocznie, przekonamy się, że nawet cofnąwszy się na dalszą odległość jeszcze rozróżnić je będziemy jako osobne plamki. W prosty sposób dowodzi to wyższości widzenia obuocznego nad widzeniem jednoocznym.

Wykazano, że stereoskopowe patrzenie obuoczne poprawia zdolność dostrzegania szczegółów trzy do sześciokrotnie [11]. Choć natura tego zjawiska nie jest w pełni poznana, jest jednak oczywiste, iż przy widzeniu obuocznym obraz jest jaśniejszy, bardziej wyrazisty, bardziej kontrastowy i bogatszy w szczegóły. Ponadto, stereoskopowe widzenie obuoczne zapewnia poszerzenie głębi ostrości, gdyż dostarcza informacji o wzajemnych relacjach pomiędzy tłem i elementami pierwszoplanowymi, nawet jeśli leżą one poza płaszczyzną ostrego widzenia. Informacja wzrokowa dotycząca otoczenia przedmiotów widzianych ostro znacznie poprawia możliwość interpretacji danych wizualnych [5].

## ZALETY MIKROSKOPU TRÓJWYMIAROWEGO

Nowy świetlny mikroskop trójwymiarowy R400 łączy zalety obrazu dyfrakcyjnego, oświetlenia ukośnego i zasady widzenia stereoskopowego dla wytworzenia

wysokiej jakości kontrastowego, trójwymiarowego, barwnego obrazu o znacznej rozdzielczości.

Mikroskop R400 generuje bardzo efektowne, barwne obrazy o spektakularnej głębi wypełnionej szczegółami, które nie są zauważalne w płaskim obrazie powstającym w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym. W konwencjonalnym mikroskopie wymagania względem rozdzielczości, kontrastu, głębi ostrości i klarowności obrazu podlegają zawsze kompromisom, gdyż poprawa tych parametrów wzajemnie się wyklucza. R400 pozwala na równoczesną poprawę we wszystkich tych aspektach.

Jak zapowiadają twórcy mikroskopu R400, dla uzyskania jak najlepszych efektów technika preparowania badanej próbki do obserwacji w mikroskopie R400 może być nieco odmienna niż w tradycyjnej technice preparatyki mikroskopowej, ale publikacje danych szczegółowych na ten temat są dopiero oczekiwane.

## ZWIĘKSZONA ROZDZIELCZOŚĆ

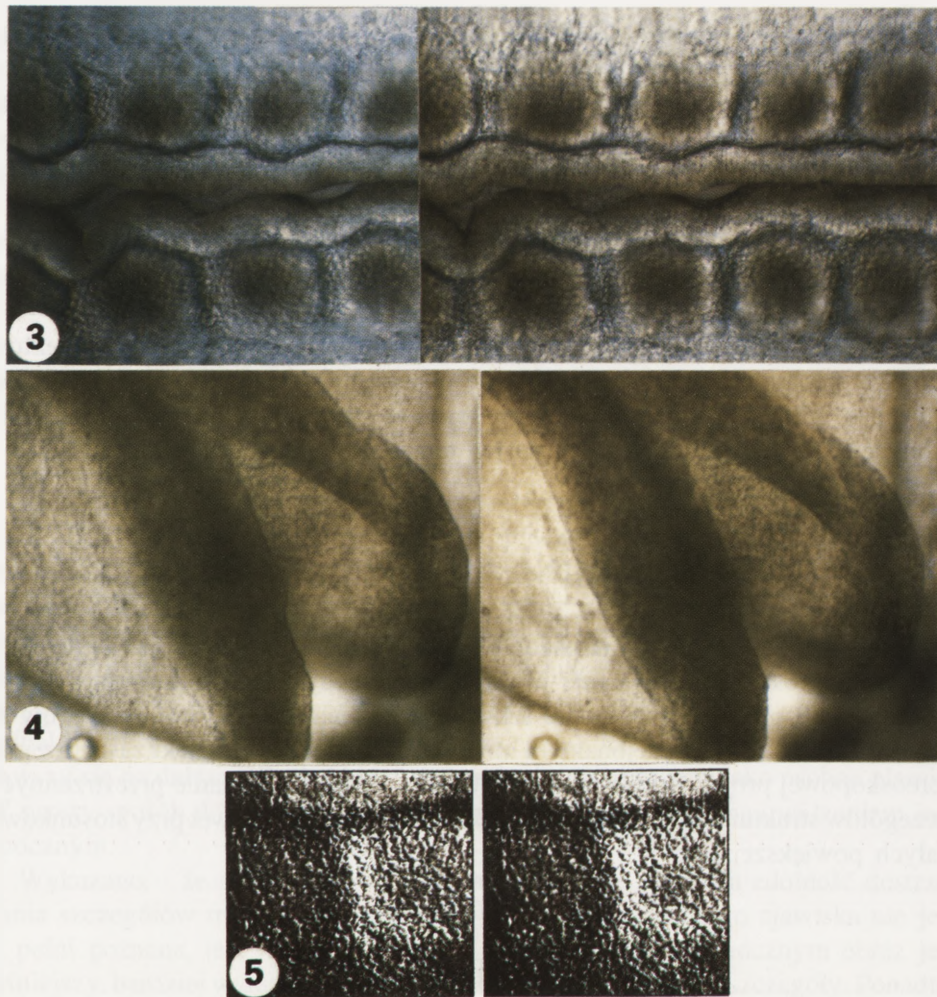
Do testu rozdzielczości mikroskopu R400 użyto *Amphipleura pellucida*. Przy pomocy mikroskopu R400 udało się dostrzec periodyczną strukturę pancerzyka o okresie 250 nm oraz inne detale szkieletu o rozmiarach 200 nm. Szczegóły te nie są widoczne w konwencjonalnym mikroskopie świetlnym. Dzięki zastosowaniu stereoskopowej projekcji mikroskop R400 pozwala na rozpoznanie przestrzennych szczegółów struktury pancerzyków z wielką rozdzielczością, nawet przy stosunkowo małych powiększeniach.

## GRUBOŚĆ PREPARATU

Zwiększenie kontrastu i rozdzielczości obrazu wytwarzanego w mikroskopie R400 pozwala na obserwację preparatów o wiele grubszych niż konwencjonalne skrawki tkanki, których maksymalna dopuszczalna grubość wynosi zazwyczaj ok. 15  $\mu\text{m}$ . W mikroskopie R400 obserwować można preparaty dochodzące nawet do grubości około 100  $\mu\text{m}$ , co pozwala na przyżyciowe obserwacje rozwijających się embrionów. Na przykład w całościowym preparacie żywego zarodka kurczęcia możliwa jest obserwacja różnicujących się somitów (rys. 3 i 5).

Zwiększona rozdzielczość i doskonalszy kontrast obrazów w mikroskopie R400 pozwala na wykonywanie mikrofotografii przy dużych powiększeniach bez utraty ostrości szczegółów obrazu (rys. 3–5).

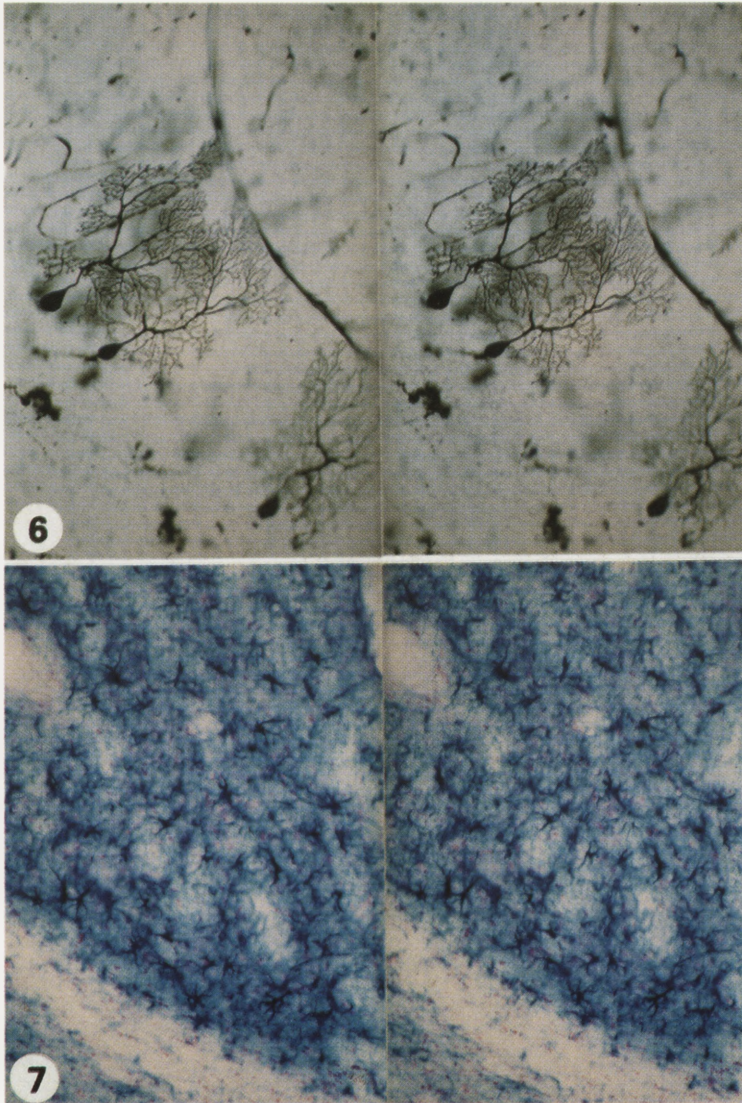




**Rys. 3.** Mikrofotografia fragmentu żywego niebarwionego zarodka kurczęcia w stadium HH11 obserwowanego w całości przy pomocy mikroskopu R400 z długoogniskowym obiektywem 40x. Stereopara uwidacznia głębię preparatu, niedostrzegalną na pojedynczej płaskiej mikrofotografii. Szczególnie wyraźna staje się szczelina niedomkniętej cewki nerwowej w centrum pola widzenia, w odróżnieniu od podobnych sąsiednich szczelin, wypełnionych tkanką. Somity wyraźnie leżą w innej płaszczyźnie niż przykrywająca je przezroczysta ektoderma. Obecności ektodermy nie da się jednak stwierdzić na pojedynczych zdjęciach, gdyż jej szczegóły zlewają się z tym. Dwuplanowość tej mikrofotografii jest dostrzegalna jedynie w projekcji stereoskopowej (fot. Dr. G. Greenberg, Edge Scientific Instruments, USA)

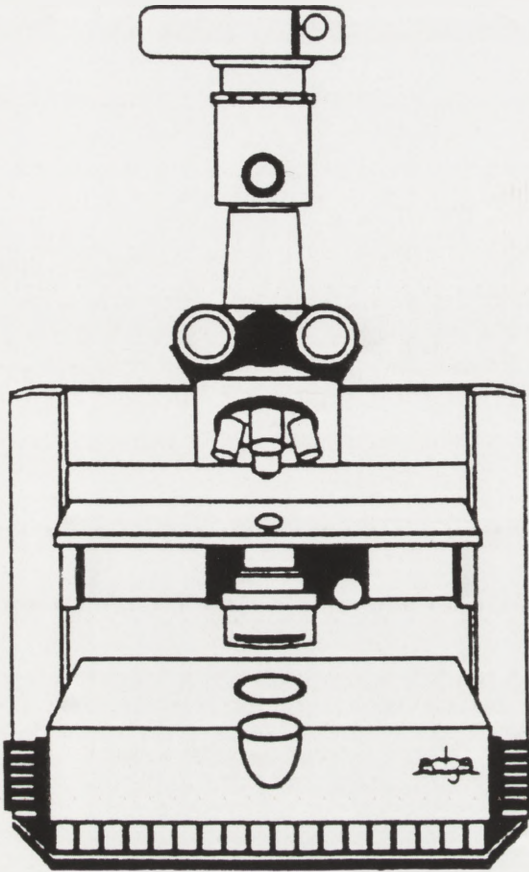
**Rys. 4.** Fragment żywego zarodka kury w stadium HH8, przedstawiony na stereomikrofotografii wykonanej w mikroskopie R400. Widoczne niezrośnięte fałdy głowowe. Wyraźna jest wieloplanowość organizacji zarodka widoczna jedynie przy obserwacji stereoskopowej. Komórki ektodermy oznaczają się jako ziarnistości w ektodermie, leżące na rozmaitych poziomach. Obiektyw długoogniskowy 40x (fot. Dr. G. Greenberg, Edge Scientific Instruments, USA)

**Rys. 5.** Fragment dwóch somitów żywego niebarwionego zarodka kury w stadium 11 przedstawiony na stereomikrofotografii. Preparat całego zarodka umieszczono w mikroskopie R400. Obiektyw długoogniskowy 40x (wg Fostera [5])

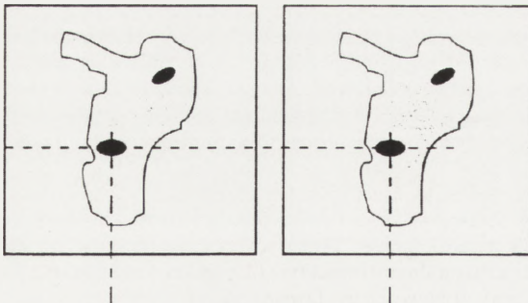


**Rys. 6.** Stereoskopowa mikrofotografia fragmentu grubego skrawka mózdzku z wysrebrzonymi komórkami Purkinjego. Na pojedynczym zdjęciu nie jest wyraźnie widoczne, że pod warstwą komórek z drzewkowatymi wyrostkami znajduje się druga warstwa podobnych komórek, których fragmenty widziane nieostro stanowią rozmyte tło. Grubość skrawka 60  $\mu\text{m}$ . Głębina preparatu staje się oczywista jedynie przy obuocznej obserwacji stereoskopowej (obiektyw Planapochromat 10x, fot. Edge Scientific, USA)

**Rys. 7.** Skrawek mózgu myszy wybarwiony immunohistochemicznie na obecność GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) z niebiesko barwiącym chromogenem kwaśnej fosfatazy dla uwidocznienia astrocytów. Grubość skrawka 50  $\mu\text{m}$ . Regularny odstęp pomiędzy górną i dolną powierzchnią skrawka staje się oczywisty jedynie przy obuocznej obserwacji stereoskopowej. Widać również, że skrawek jest wypełniony wypustkami komórek i innymi detalami strukturalnymi (obiektyw Planapochromat 20x, fot. Dr. G. McAuliffe, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Department of Neuroscience and Cell Biology, USA)



8

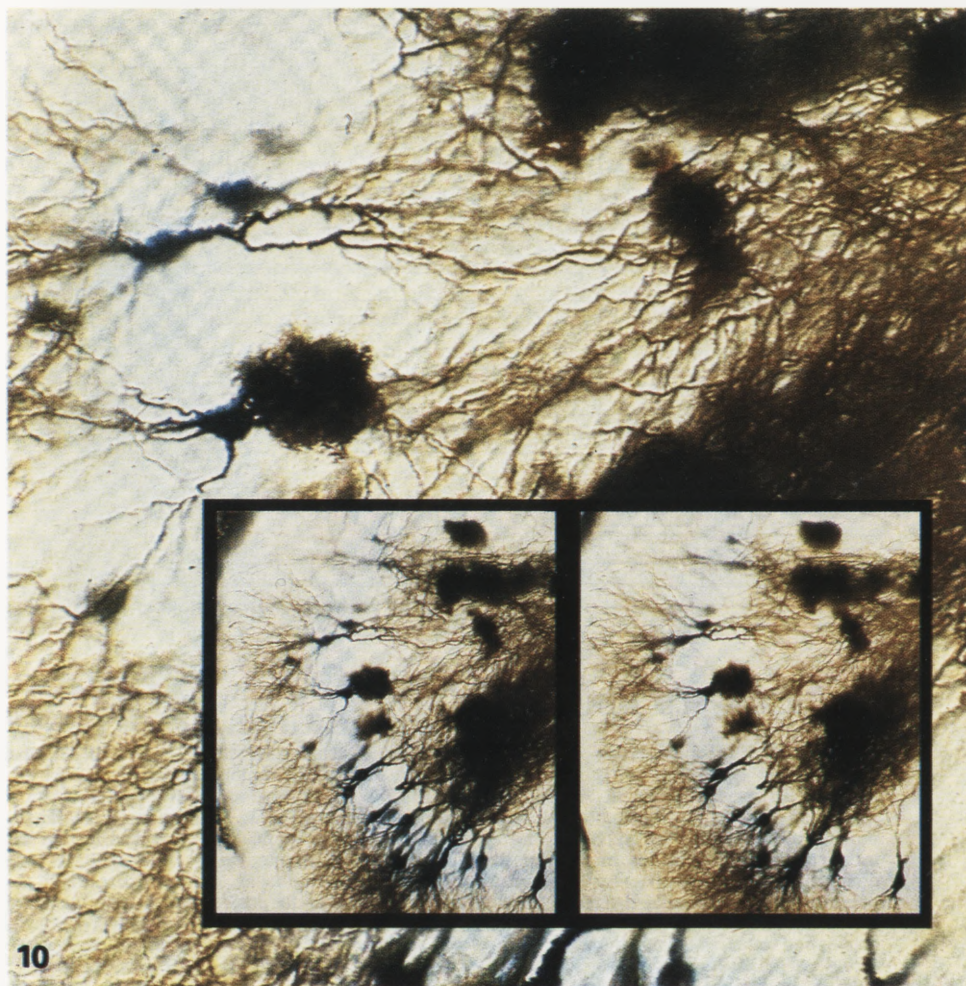


65mm

9

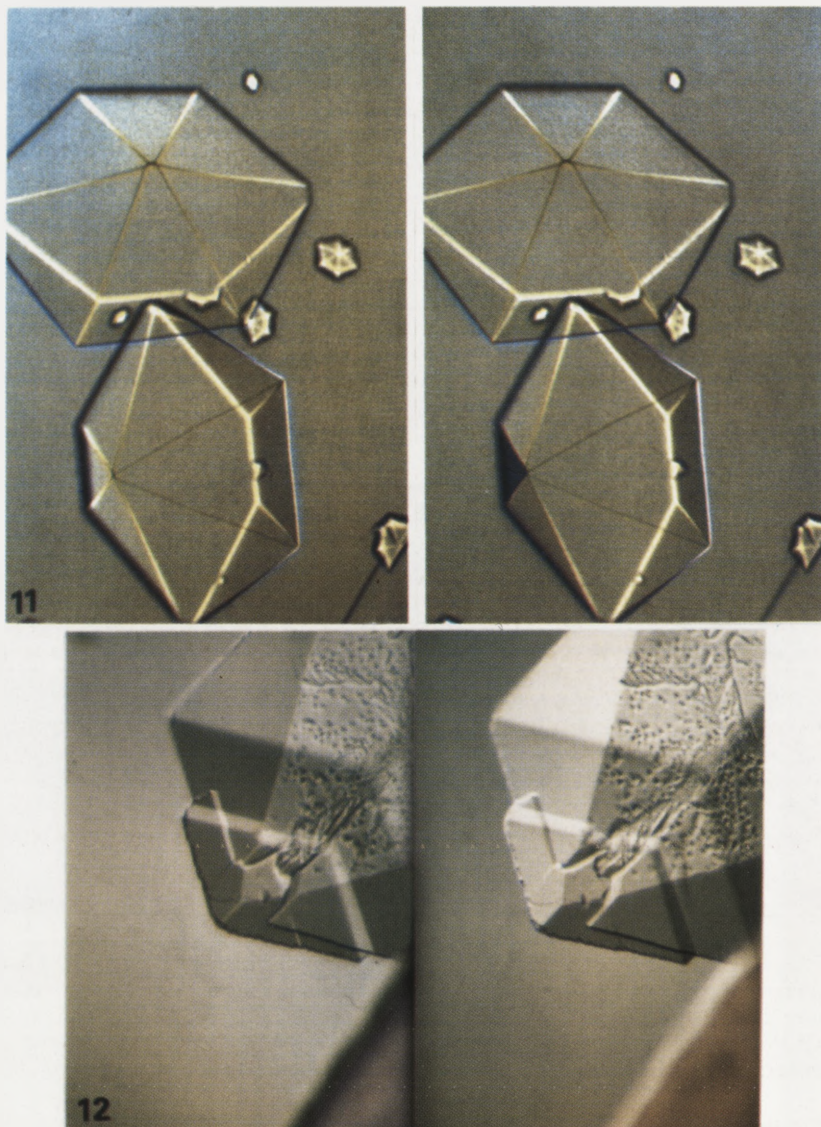
**Rys. 8.** Widok ogólny trójwymiarowego mikroskopu R400. Zwraca uwagę obszerna podstawa, która kryje złożony układ oświetleniowy (wg Edge Scientific, zmienione)

**Rys. 9.** Schemat zasady montowania zdjęć stereo-pary. Obraz lewy i prawy muszą obejmować ten sam rejon preparatu, muszą być zliniowane poziomo i pionowo, a odstęp pomiędzy odpowiadającymi sobie szczegółami winien wynosić tyle co rozstaw oczu, ok. 65 mm (wg Edge Scientific, zmieniony)



**Rys. 10.** Fragment przekroju hipokampu w mózgu myszy po barwieniu metodą Golgiego. Neurony CA3 wybarwione są na czarno. Przestrzenna organizacja ich wypustek widoczna jest jedynie przy obuocznej obserwacji stereo. Mimo mniejszego ostatecznego powiększenia, centralnie zmontowana stereopara zawiera znacznie więcej informacji niż pojedyncze płaskie zdjęcie zamieszczone w tle (wg American Laboratory, May 1995)

W zależności od rodzaju i przejrzystości próbki grubość preparatu dostępnego do obserwacji w mikroskopie R400 może być zwiększona aż do kilkuset mikrometrów. W cienko krojonych skrawkach histologicznych jakość obrazu w mikroskopie R400 jest równie doskonała (rys. 6, 7 i 10). Wszelkie artefakty, w rodzaju fałdów lub zmarszczeń skrawka stają się natychmiast ewidentne. Zawłóści sieci przestrzennych są możliwe do dostrzeżenia jedynie przy stereoskopowym odwzorowaniu preparatu (rys. 10).



**Rys. 11.** Stereomikrografia kryształów wirusa mozaikowego (TYMV) rzepy (*Brassica*) wykonana przy użyciu mikroskopu R400 z długoogniskowym obiektywem. Pojedyncze zdjęcie nie zawiera informacji o stopniu nachylenia kryształów, które na płaskim zdjęciu wydają się być rozmaitego kształtu i wielkości. Co więcej, na pojedynczym zdjęciu nie da się ustalić, który z zachodzących na siebie kryształów jest pod, a który nad swym sąsiadem w miejscu ich zachodzenia na siebie. Przy obserwacji stereoskopowej kąt nachylenia obu kryształów staje się natychmiast oczywisty; kryształ dolny swym szczytem obrócony jest w lewo. Również okazuje się, że oba duże kryształy są identycznej wielkości i kształtu, chociaż ich płaskie rzuty przedstawiają się odmiennie z powodu różnego nachylenia względem podstawy. Staje się również oczywiste, że kryształ dolny zachodzi częściowo pod górny kryształ, choć oba spoczywają na tej samej podstawie preparatu (fot. Dr. A. Malkin i Dr. Y. G. Kuznetsov, Department of Biochemistry University of California, Riverside, USA)

## BUDOWA MIKROSKOPU TRÓJWYMIAROWEGO

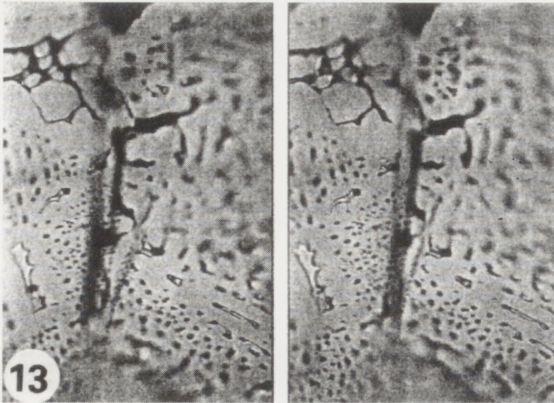
Zasadniczo nowy mikroskop trójwymiarowy R400 nie różni się znacznie budową od zwykłego mikroskopu świetlnego. Ma on te same podstawowe elementy konstrukcyjne: układ obiektywu, okularu i oświetlenia preparatu (rys. 8). Mając na względzie poprawę rozdzielczości dużą uwagę zwrócono przy jego konstrukcji na zabezpieczenie przed wibracjami. Masywność podstawy mikroskopu sprzyja więc także przyżyciowemu filmowaniu i fotografowaniu obiektów.

Mikroskop R400 przystosowany jest do pracy w rozmaitych odmianach, z imersją olejową i wodną, z kontrastem faz i polaryzacją przy największych powiększeniach. Mikroskop R400 umożliwia również manipulację preparatem w trakcie obserwacji, gdyż może być wyposażony w rozmaite systemy uzupełniające, jak mikromanipulatory lub stoliki podgrzewane lub chłodzone.

Najistotniejszą różnicę konstrukcyjną stanowi jednak odmienna budowa układu oświetlającego kondensora, który jest bardziej złożony niż w konwencjonalnym mikroskopie. R400 – zamiast jednego – ma cztery źródła światła, które przy pomocy pryzmatów kierują cztery niezależne, ukośne wiązki światła na preparat. Kąt padania wiązek jest regulowany pozycją pryzmatu. Również poziom intensywności światła każdej z wiązek regulowany jest niezależnie. Konstrukcja oświetlacza oparta jest na układach elektronicznych. W systemie przewodzenia światła zastosowano światłowodowy. "Zimne światło" pozwala na obserwację przyżyciową, gdyż zapobiega cieplnym deformacjom preparatu i sprzyja ostrości jego obrazu.

Wiązki światła współpracują ze sobą w dwóch parach, lewej i prawej. Przechodzą ukośnie przez preparat generując dwa niezależne obrazy, dla lewego i prawego oka obserwatora. Obrazy te obserwowane mogą być bezpośrednio przy pomocy binokularu, w którym lewe oko widzi to same pole widzenia przedstawione nieco inaczej niż obraz, który otrzymuje oko prawe. W efekcie oba obrazy łączą się w obraz przestrzenny obserwowanej struktury, znajdującej się na stoliku mikroskopu.

**Rys. 12.** Stereomikrofotografia kryształów wirusa mozaikowego TYMV (*turnic yellow mosaic virus*) wykonana przy użyciu mikroskopu R400 z długoogniskowym obiektywem 10x. Pojedyncze zdjęcie nie zawiera informacji o nachyleniu osi kryształu ani o wzajemnym nachyleniu jego powierzchni. Na pojedynczym zdjęciu nie da się także ustalić, która powierzchnia jest bliżej, a która dalej od obserwatora. Przy obserwacji stereoskopowej kąt nachylenia osi kryształu do podłoża i wzajemne nachylenie jego ścian stają się natychmiast oczywiste, a regularność struktury kryształu przedstawia się wyraźnie. Płaski rzut kryształu przedstawiony na konwencjonalnym, pojedynczym zdjęciu nie tłumaczyłby jednoznacznie zawłości struktury przestrzennej kryształu. Na stereo-mikrografii erozja ściany przedniej kryształu wyraźnie przedstawia się w postaci zagłębień, co nie wynika jednoznacznie z obserwacji płaskiego pojedynczego obrazu. Na uwagę zasługuje fakt, iż odmienna gęstość tych samych szczegółów preparatu w każdej z fotografii nie przeszkadza w "złaniu się" obrazu w jeden trójwymiarowy wizerunek. Wręcz przeciwnie, cecha ta jest źródłem dodatkowych efektów pozornej opalizacji kryształu (fot. Dr. Y. G. Kuznetsov, Department of Biochemistry, University of California, Riverside, USA)

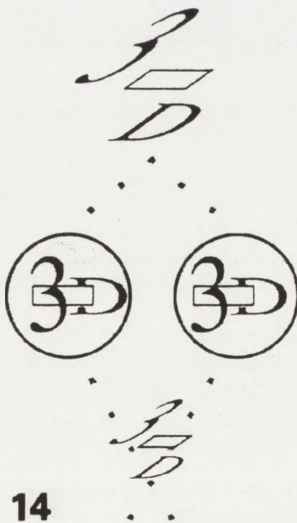


**Rys. 13.** Stereomikrografia kwarcu podgrzanego do 380°C w obecności chlorków sodu i potasu. Pojedyncze zdjęcie przedstawia się płasko i wydaje się pozbawione informacji. Przy oglądaniu trójwymiarowej stereo-pary tego samego obszaru preparatu uzyskujemy niesłychanie bogaty w szczegóły przestrzenny obraz, ukazujący delikatne pęcherzyki i przenikające je sieci kanałów. Oczywiście stają się również niewidoczne poprzednio kształty samych kryształów i ich granice. Preparat ten demonstruje wyższość obrazowania trójwymiarowego nad konwencjonalną dwuwymiarową mikrofotografią (Planapochromat 10x, wg Fostera [5])

## MIKROFOTOGRAFICZNE STEREOGRAMY

Powstające w mikroskopie R400 obrazy: "lewy" i "prawy" mogą być niezależnie rejestrowane fotograficznie. Do celów publikacji obrazy te zostają zmontowane obok siebie jako tzw. stereo-para.

Zasady montowania zdjęć stereoparowych wyjaśnione są na schemacie rysunku 9. Oba zdjęcia obejmować powinny dokładnie ten sam obszar obrazowanego pre-



**14**

**Rys. 14.** Stereogram testowy widzenia trójwymiarowego. Prawy i lewy rysunek tylko pozornie są identyczne. W rzeczywistości ich elementy są nieco przesunięte względem siebie dla uzyskania efektu przestrzennego. Aby zobaczyć grafikę 3-D w trzech wymiarach, należy ustawić oczy tak, by lewe oko patrzyło na lewy rysunek, a prawe na prawy i starać się widzieć je ostro. Przejściowo widać będzie cztery nieostre kontury okręgów z ich wewnętrznymi detalami. Poprzez manipulowanie wzrokiem (krzyżowanie oczu) należy doprowadzić do tego, aby dwa z widocznych nieostro obrazów nałożyły się na siebie tworząc centralny, ostry i trójwymiarowy obraz. Znaki 3-D "wystawcą" będą ponad płaszczyznę wyznaczoną przez okrąg. Pomocne jest przysuwanie i odsuwanie rysunku do i od siebie, przy równoczesnym utrzymywaniu obrazów w jednej linii poziomej równoległej do linii łączącej oczy, bez obracania obrazów względem innej osi. Pomocne jest też umieszczenie palca wskazującego lub cienkiego ołówka ponad rysunkiem, pomiędzy dwoma okręgami i przenoszenie wzroku z palca (lub ołówka) na rysunek. W pewnym momencie zobaczymy dwa nieostre palce (ołówki) po obu stronach centralnego trójwymiarowego obrazu. Jeśli lewe oko skierujemy na prawy okrąg, a prawe na lewy, uzyskamy odwrotny efekt przestrzenny, znaki 3-D pojawią się pod płaszczyzną wyznaczoną przez okrąg i całość obrazu będzie mniejsza niż poprzednio. Palec (oówek) pomocniczy wskazywać będzie wtedy na centralny obraz złożony z dwóch obrazów (wg Edge Scientific, zmieniony)

paratu, powinny być zorientowane idealnie równolegle, a szczegóły powinny być zliniowane na tym samym poziomie, równolegle do linii ocznej obserwatora. Odstęp pomiędzy analogicznymi punktami lewego i prawego obrazu winien wynosić ok. 65 mm, co stanowi tyle, ile rozstęp pomiędzy oczami przeciętnego człowieka. W zależności od potrzeby negatywy obu zdjęć mogą być zreprodukowane po odwróceniu prawo-lewo, lub góra-dół, ale powyższe zasady równoległości i zliniowania muszą zostać zachowane.

Zdjęcia zmontowane w stereoparze mogą być obserwowane tylko indywidualnie, przez jedną osobę. Dla właściwej percepcji głębi obrazu obserwator musi oglądać stereoparę umieścić bezpośrednio przed sobą tak, by linia oddzielająca oba zdjęcia znajdowała się dokładnie naprzeciwko linii środkowej jego ciała i była do niej równoległa. Wyklucza to więc możliwość równoczesnego oglądania stereo-pary przez kilka osób. Dla właściwego odbioru efektu trójwymiarowego zawartego w stereo-parze zazwyczaj konieczne są odpowiednie okulary, pozwalające na widzenie ostrego obrazu: prawego, dla prawego oka i obrazu lewego, dla lewego oka. Niektórzy obserwatorzy są w stanie widzieć trójwymiarową przestrzeń stereogramu "gołym okiem", bez dodatkowych soczewek, ale wymaga to pewnej wprawy. Ćwiczenia najlepiej przeprowadzić najpierw na prostym schemacie, jaki przedstawiono na rysunku 14. Widzenie lewym okiem kieruje się na lewy obraz, a prawym – na prawy obraz, przy równoczesnym wyostrażeniu obrazu tak, aby doszło do fuzji obu wizerunków w linii centralnej. Z dwu płaskich obrazów powstaje wtedy centralnie trzeci, trójwymiarowy obraz.

Ćwiczenia w "krzyżowaniu oczu" i wyostrażeniu wzroku mogą być przyczyną powstawania bólu głowy, a może także zaburzeń wzroku, ale nie zostało to udokumentowane. Szkodliwość takich ćwiczeń jest zatem wątpliwa, a wręcz przeciwnie, wydaje się, że trening taki może sprzyjać usprawnieniu funkcjonowania narządu wzroku. Najlepsze efekty w widzeniu stereoskopowych mikrogramów uzyskują osoby wprawione w oglądaniu popularnych ostatnio barwnych stereogramów typu "Magiczne Oko", gdzie obraz trójwymiarowy zakodowany został komputerowo w bogatym w szczegóły tle obrazu.

Należy w tym miejscu zwrócić uwagę, że możliwa jest także odwrotna obserwacja stereogramów, kiedy obraz lewy trafia do prawego oka, a obraz prawy do lewego. W przypadku takiego "odwrotnego" zmontowania stereopary (lub skrajnie zbieżnego ustawienia oczu) uzyskujemy efekt taki, jakbyśmy obserwowali preparat od drugiej strony, "od spodu". Co ciekawe, obraz tak postrzegany wydaje się zawsze mniejszy, jakby bardziej od nas odległy. Dla większości preparatów biologicznych, w których pojęcia "góra" i "dół" nie są istotne, nie ma to zazwyczaj znaczenia. Dla wielu obrazów stereoskopowych sposób zmontowania poszczególnych zdjęć w parze (lub sposób krzyżowania oczu) może mieć jednak istotne znaczenie, gdyż struktury wypukłe pojawiają się wtedy jako wklęsłe, a wklęsłe jako wypukłe. Kordylewski



[14] przedstawił przykłady, kiedy może to stanowić poważną trudność we właściwej interpretacji mikrostruktury obrazowanych preparatów.

## ELEKTRONICZNE PRZETWARZANIE OBRAZU

Zamiast fotograficznie, oba obrazy mogą też być niezależnie rejestrowane elektronicznie przy pomocy kamery TV lub CCD i mogą być poddawane dalszej elektronicznej obróbce analizy i przetwarzania obrazu (*image analysis* i *image processing*) [18]. Tą drogą mogą one być inaczej kodowane barwnie lub wzbogacane w fałszywe kolory [4]. Ta ostatnia możliwość nie jest jednak zazwyczaj potrzebna w przypadku mikroskopu R400, ponieważ umożliwia on powstawanie obrazów trójwymiarowych w naturalnych barwach, które w przypadku preparatów biologicznych, a szczególnie histologicznych czy immunohistochemicznych, są zazwyczaj wystarczająco efektowne.

Wiele firm komputerowych opracowało ostatnio programy pozwalające na poprawianie jakości obrazu mikroskopowego, jak również na uzyskiwanie z takich obrazów rozlicznych danych ilościowych [23]. Kordylewski i Florek [15] wykazali, że pomiar wartości "z" (grubości detali preparatu) jest jedną z istotnych korzyści, jaką dostarcza mikroskopia trójwymiarowa.

## PROJEKCJA POLARYZACYJNA

W celu publicznej prezentacji stereogramów dla wieloosobowej publiczności oba obrazy (prawy i lewy) zarejestrowane na dwu niezależnych przezroczach są wyświetlane na jeden wspólny ekran lentikularny (który nie zmienia płaszczyzny polaryzacji odbijanego światła), przy użyciu dwóch projektorów z optyką polaryzacyjną o odmiennych płaszczyznach polaryzacji światła. Dla uzyskania efektu trójwymiarowego uczestnicy takiej projekcji muszą być wyposażeni w odpowiednie okulary polaryzacyjne.

## ANAGLYFY

Przy zastosowaniu odmiennych filtrów barwnych dla lewego i prawego obrazu można – zamiast "stereo-pary" – uzyskać w mikroskopie R400 pojedynczy zakodowany dwubarwny anaglyf. Taki dwubarwny "podwójny" obraz obserwuje się przy pomocy okularów stereoskopowych wyposażonych w filtry barwne, zamiast

polaryzacyjnych. Zapewniają one pracę każdego oka w innej barwie, odpowiedniej dla właściwego składnika obrazu. Choć pierwsze wrażenie widzenia każdym okiem w innym kolorze może być szokujące, obserwator przezwyczaj się po chwili i na ogół zaczyna odbierać obraz jako czarno-biały.

Anaglyfy mogą być oglądane indywidualnie przez pojedyncze osoby lub mogą być wyświetlane przy pomocy dwu różnobarwnych filtrów, podobnie do projekcji polaryzacyjnej opisanej powyżej. Niezależnie czy jest to indywidualny obserwator, czy zbiorowy pokaz, dla uzyskania efektu trójwymiarowego każdy obserwator musi posłużyć się odpowiednimi okularami, które zawierają filtry o barwach odpowiadających barwie światła użytego do zakodowania obrazu lub projekcji. Bez takich filtrów lub w przypadku źle dobranych barw widzieć będziemy zdeformowany "podwójny" obraz pozbawiony efektu trójwymiarowości.



**Rys. 15.** Całościowy preparat larwy muszki owocowej *Drosophila* wybarwiony na obecność peroksydazy chrzanowej HRP (*horse-radish peroxidase*) dla uwidocznienia rozwijających się neuronów. Organizacja przestrzenna wnętrza organizmu larwy staje się natychmiast oczywista przy obserwacji stereoskopowej, podczas gdy pojedynczy płaski obraz nakłada na siebie poszczególne warstwy preparatu. Podobnie jak w stereogramach zarodków kurczęcia (rys. 3 i 4) dla uzyskania efektu trójwymiarowej percepcji nie jest konieczne, aby pola widzenia oka prawego i lewego obejmowały identyczny obszar. Natomiast zamiana zdjęć stereopary przy ich montowaniu, prawego na lewy, bez ich obracania w kierunku "górną-dół", spowodowałaby wrażenie obserwowania preparatu "od spodu". Kształty wklęsłe, widoczne w prezentowanym tu obrazie odbierane byłyby wtedy jako wypukłe (obiektyw Planapochromat 40x, fot. Dr. E. Giniger, Fred Hutchison Cancer Research Center, Seattle, WA, USA)

## HOLOGRAFIA

Inną możliwością przedstawienia trójwymiarowego obrazu jest hologram. Holografia poczyniła wielkie postępy i znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach, jednak dotychczas nikt nie pokusił się o przedstawienie struktury mikroskopowej preparatu biologicznego na hologramie [1, 2], choć z technicznego punktu widzenia jest to wykonalne [Kordylewski, niepublikowane dane].

Perspektywa publikacji ilustrowanych hologramami jest bardzo atrakcyjna z punktu widzenia walorów poznawczych i dydaktyki. Do obserwacji hologramu nie są bowiem potrzebne specjalne okulary ani intensywny trening "zezowania", jak ma to miejsce w przypadku stereogramów. Dodatkową zaletę stanowi to, iż hologramy mogą być oglądane równocześnie przez więcej niż jedną osobę. Wadę hologramów stanowi jednak ich monochromatyczność.

## ZASTOSOWANIA MIKROSKOPII TRÓJWYMIAROWEJ

Mikroskop R400 ma wiele praktycznych zastosowań w naukach biomedycznych i materiałoznawstwie. Lista dyscyplin, w których może znaleźć zastosowanie, obejmuje dziedziny, takie jak: biologia rozwoju, embriologia, fizjologia, botanika, hydrobiologia, stomatologia, parazytologia, kryminalistyka, paleontologia i geologia.

Znaczenie mikroskopu R400 jest jednak najdobitniejsze w naukach neurologicznych, gdzie poznawanie skomplikowanych struktur przestrzennych systemu nerwowego ma olbrzymią wagę. R400 pozwala na poznanie trójwymiarowej organizacji wypustek nerwowych (rys. 6–7 i 10) i na prześledzenie sieci nerwowych w grubym preparacie na dużych odległościach (rys. 10 i 15). Ze znaczną precyzją mikroskop R400 pozwala na analizę struktury makrotomowych skrawków mózgu. W grubych żywych preparatach mikroskop ten pozwala na przyżyciową obserwację indywidualnych komórek bez ich barwienia (rys. 3–5). Pod mikroskopem R400 umieścić można cały zarodek i obserwować migrujące w jego ciele komórki (rys. 3–5). W immunohistochemicznym preparacie znakowanym wielokrotnymi markerami mikroskop R400 pozwala na lepsze rozpoznanie ich lokalizacji. W preparacie autoradiograficznym pozwala na lepszą obserwację relacji struktur komórkowych i ziarn srebra w emulsji fotograficznej. Kordylewski i in. [17] wykazali, że ma to szczególne znaczenie dla właściwej interpretacji danych ilościowych po hybrydyzacji *in situ* kwasów nukleinowych znakowanych radioaktywnie.

Mikroskop R400 ma również zastosowanie w krytalografii, gdzie dodatkowe efekty uzyskuje się przez połączenie R400 z zasadami mikroskopii polaryzacyjnej (rys. 11). Pojedyncza mikrofotografia kwarcu na rysunku 13 przedstawia się płasko i wydaje się pozbawiona informacji. Przy obserwacji trójwymiarowej stereo-pary

tego samego obszaru preparatu okazuje się, że uzyskujemy niesłychanie bogaty w szczegóły przestrzenne obraz, zawierający delikatne pęcherzyki i przenikające je sieci kanałów w kryształach podgrzewanych w obecności soli. Oczywiście stają się również niewidoczne poprzednio kształty obserwowanych kryształów. Preparat ten w sposób wymowny demonstruje wyższość obrazowania trójwymiarowego nad konwencjonalną dwuwymiarową mikrofotografią.

## LITERATURA

- [1] BROKOWSKI Z. Perspektywy zastosowania holografii mikroskopowej. *Polski Tyg Lek* 1977; **24**: 943–945.
- [2] BURTON AL, BEISSNER RE, BOND RL, STEVENS BF. Holography in anatomy and microscopy. *Tex Rep Biol Med* 1971; **29**: 535–553.
- [3] DE FEIJTER AW. Non-invasive optical sectioning through cells and tissue sections. *Biomed Products* January 1993; 58.
- [4] FORSGREN PO. Visualization and coding in three-dimensional image processing. *J Microscopy* 1990; **159**: 195–202.
- [5] FOSTER BM. Focus on microscopy. A high-resolution 3-D microscope opens the door to true color, real time, large depth of field imaging. *Amer Laboratory* 1995; **4**: 59–63.
- [6] FRANK J. Three-dimensional imaging techniques in electron microscopy. *BioTechniques* 1989; **7**: 164–173.
- [7] HALLGREN RC, BUCHHOLZ C. An improved three dimensional visualization method for confocal microscopy. *Biotech Laboratory* 1992; **4**: 8–9.
- [8] HOFFMAN R. The modulation contrast microscope: principles and performance. *J Microscopy* 1977; **110**: 205–222.
- [9] HOLTON WC. Under a microscope: confocal microscopy casts new light on the dynamics of life. *Photonics Spectra* 1995; **2**: 78–84.
- [10] HOPPE W. Three dimensional electron microscopy. *Ann Rev Biophys Bioeng* 1981; **10**: 563–562.
- [11] INOUE S. Videomicroscopy. Plenum Publishing, New York, 1986.
- [12] KORDYLEWSKI L. Morphology of motor end-plate and its size relation to the muscle fibre size in the amphibian submandibular muscle. *Zeit Mikrosk-anatom Forsch* 1979; **93**: 1038–1050.
- [13] KORDYLEWSKI L, KARRISON T, PAGE E. P-face particle density of freeze-fractured vertebrate cardiac plasma membrane. *Amer J Physiol* 1983; **245**: H992–H997.
- [14] KORDYLEWSKI L. Białkowa komponenta błony komórkowej w badaniach metodą kriorytownictwa. *Post Biol Kom* 1988; **15**: 171–232.
- [15] KORDYLEWSKI L, FLOREK R. Stereogrammetric measurements of cell membrane structures in freeze-fracture replicas. 1st Regional Meeting of the American Society for Cell Biology, Program, Chicago, 1990; p. 34, no 104.
- [16] KORDYLEWSKI L, SANER D, LAL R. Atomic force microscopy of freeze-fracture replicas of rat atrial tissue. *J Microsc* 1994; **173**: 173–181.
- [17] KORDYLEWSKI L, AMBLER SK, DOYLE DD. Quantification of ANP mRNA in primary cultures of adult rat atrial myocytes by image processing: *in situ* hybridization to multiple parallel samples using single strand cDNA probes. *J Histochem Cytochem* 1995; **43**: 481–488.
- [18] McNAMARA G. Digital image analysis in light microscopy. *Biomed Products* 1993; **1**: 24.

- [19]MOENS PB, MOENS T. Computer measurements and graphics of three-dimensional cellular ultrastructure. *J Ultrastruct Res* 1981; **75**: 131–141.
- [20]MILLER WI, FOSTER B. Fluorescence and confocal laser scanning microscopy: applications in biotechnology. *Amer Biol Laboratory* 1989; **9**: 21–27. Przedruk w: *International Laboratory* 1991; 3.
- [21]PADDOCK SW. Imaging *Drosophila* development with the laser scanning confocal microscope. *USA Microscopy and Analysis* 1995; **3**: 13–15.
- [22]PAWLEY JB. Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum Press, New York, 1995.
- [23]PEACHEY LD. The extraction of three-dimensional information from stereo micrographs of thick sections using computer graphics methods. *Ann N Y Acad Sci* 1986; **483**: 161–170.
- [24]SHUMAN H, MURRAY JM, DiLULLO C. Confocal microscopy: An overview. *BioTechniques* 1989; **7**: 154–163.
- [25]TOY DA. Confocal microscopy: ups and downs of 3-D profiling. *Semiconductor Inter* 1990; 4.
- [26]YATCHMENOFF B. The confocal light microscope: an emerging tool for biologists. *Amer Biotech Laboratory* December 1989; 24–26.

*Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński.*

*Otrzymano: 10.09.1996 r.*

*Przyjęto: 25.10.1996 r.*

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

## NOWE CZĄSTECZKI SYGNAŁOWE I ZWIĄZKI REGULUJĄCE WZROST I ROZWÓJ ROŚLIN\*

### NOVEL SIGNALING MOLECULES AND GROWTH AND DEVELOPMENT REGULATORS IN PLANTS

Anna JAKUBOWSKA, Adam Przemysław MURACH, Stanisław KOWALCZYK

Zakład Biochemii, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, UMK, Toruń

*Streszczenie:* Wzrost i rozwój roślin są regulowane przez wiele czynników endogennych. Niektóre z nich uważa się za specyficzne przekaźniki uczestniczące w transdukcji sygnałów, inne za regulatory wzrostu. W pracy przedstawiono nowe substancje naturalne biorące udział w tych procesach. Niektóre z omawianych związków, takie jak oligosacharyny, jasmoniany, kwas salicylowy, brassinosteroidy, poliaminy są intensywnie badane od dłuższego czasu, inne, jak np. systemina, nowa polipeptydowa cząsteczka sygnałowa znajdują się w początkowej fazie badań.

*Słowa kluczowe:* systemina, jasmonian, kwas salicylowy, oligosacharyny, poliaminy, brassinosteroidy.

*Summary:* Growth and development of plants are regulated by a multiplicity of endogenous factors. Some of them are suggested to be plant specific signal transmitter substances another plant growth regulators. This review includes novel natural substances reported to exert cell signaling or plant growth-regulating activities. All substances presented have been intensively studied during the last years. In contrast to more extensively studied substances, such as oligosaccharins, jasmonates, salicylic acid, brassinosteroids and polyamines, other compounds are just in preliminary studies. One of them is systemin – new polypeptide signal in plants.

*Key words:* systemin, jasmonate, salicylic acid, oligosaccharins, polyamines, brassinosteroids.

## WSTĘP

Rośliny syntetyzują ogromną ilość związków organicznych o wyjątkowo zróżnicowanej budowie chemicznej. Wiele spośród tych naturalnych produktów wykazuje aktywność biologiczną w obrębie organizmu, który je wytwarza bądź poza nim. Poznanie efektów fizjologicznych wywoływanych przez te substancje, najczęściej w różnorodnych biotestach, prowadzi następnie do badań na poziomie komórkowym.

\*Artykuł opracowano w ramach realizacji programu badawczego KBN nr 6P04C 050 09.

Poszukiwaniom nowych substancji sprzyja ogromny postęp w doskonaleniu technik analitycznych umożliwiających identyfikację i ilościowe oznaczanie związków występujących w tkankach w śladowych ilościach. Dzisiaj już wiadomo, że oprócz klasycznych hormonów roślinnych, takich jak: auksyny, gibereliny, cytokininy, kwas abscysynowy i etylen, w regulacji wzrostu i rozwoju uczestniczy szereg nowo poznanych substancji chemicznych. Niektóre spośród tych związków zaliczane są do hormonów roślinnych, inne natomiast do substancji sygnałowych funkcjonujących w szlakach przetwarzania i przenoszenia różnorodnych informacji.

Niewątpliwy postęp, jaki się dokonuje w poznawaniu tych nowych substancji, staje się możliwy również dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, a także, co należy podkreślić, dzięki zwiększonym nakładom na badania roślinnych mechanizmów odpornościowych i obronnych na czynniki patogenne i stresowe.

## SYSTEMINA – ROŚLINNY HORMON PEPTYDOWY?

Rośliny wykazują naturalną odporność w stosunku do czynników patogennych, która wiąże się zarówno z istnieniem barier uniemożliwiających zainfekowanie rośliny, jak i z szybkim uruchamianiem efektywnych mechanizmów obronnych. W ostatnim czasie zaznaczył się wyraźny postęp w poznawaniu tych biochemicznych i molekularnych reakcji obronnych. Wyczerpujący przegląd osiągnięć na tym polu można znaleźć w pracach przeglądowych z ostatnich lat [6, 28, 61, 68].

Śpośród reakcji obronnych, jakimi dysponują rośliny, na pierwszy plan wysuwa się synteza specjalnych białek obronnych. Do tej grupy białek zalicza się enzymy uczestniczące w syntezie fitoaleksyn, lipoksygenazy, 1,3- $\beta$ -glukanazę, chitynazę, a ponadto inhibitory proteinaz, glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę, białka bogate w glicynę i cysteinę. Rola wielu z tych białek nie jest jeszcze znana. Oczywista wydaje się rola niektórych enzymów oraz budzących duże zainteresowanie białek hamujących proteinazy serynowe określanych jako inhibitor I (8,1 kDa) i inhibitor II (12,3 kDa). Białka te hamują aktywność enzymów trawiennych w przewodzie pokarmowym owadów roślinożernych [107].

Uwaga badaczy zwrócona jest nie tylko na same reakcje obronne, ale również na mechanizmy przekazywania informacji o ataku oraz na naturę substancji sygnałowych informujących o zagrożeniu. Substancje sygnałowe uruchamiają lokalne reakcje obronne bądź indukują reakcje odpornościowe w częściach rośliny, które nie zostały zranione lub zainfekowane. Ten ostatni rodzaj odpowiedzi obronnej jest określany jako indukowana odporność lub w terminologii angielskiej jako *systemic acquired resistance* (SAR) [105]. W poszukiwaniach substancji sygnałowej i szlaku transdukcji sygnału w SAR, potencjalnymi nośnikami informacji, na które

zwracano szczególną uwagę są etylen, ABA, kwas jasmonowy, kwas salicylowy, oligosacharyny i w ostatnim czasie systemina.

Systemina znaleziona po raz pierwszy w 1991 roku w ekstrakcie z liści pomidora okazała się polipeptydem zbudowanym z 18 aminokwasów indukującym syntezę inhibitorów proteinaz [90]. Polipeptyd przemieszcza się z miejsca zranienia do apoplastu, a następnie floemem do odległych części rośliny. Transport systeminy, podobnie jak sacharozy, hamowany jest przez związki modyfikujące grupy sulfhydrylowe [83]. Szybkość transportu systeminy z miejsca zranienia do odległych tkanek porównywalna jest z szybkością przemieszczania się endogennego sygnału indukującego geny inhibitorów proteinaz [84]. Należy podkreślić, że geny inhibitorów I i II mogą być indukowane także przez ABA, kwas jasmonowy i oligosacharyny, jednak systemina okazała się najbardziej aktywną substancją sygnałową, np. milion razy bardziej aktywną niż oligosacharyny [112]. Interesujący jest również fakt, że aktywności systeminy towarzyszy depolaryzacja błon komórkowych liści i synteza etylenu [38].

Prekursorem systeminy jest prosystemina, polipeptyd składający się z 200 aminokwasów, z którego niezidentyfikowana jeszcze proteaza wycina systeminę zajmującą pozycję od 179 do 196 aminokwasu [77]. Prosystemina jest białkiem konstytutywnym syntetyzowanym i akumulowanym w bardzo małych ilościach w cytoplazmie. Nie ma sekwencji sygnałowej, czym różni się od zwierzęcych hormonów peptydowych syntetyzowanych z prosekwencją kierującą do siateczki śródplazmatycznej, pęcherzyków trans-Golgiego i sekrecyjnych. Zranienia intensyfikują syntezę prosysteminy z wielokrotnością tym samym siłą odpowiedzi SAR. Ekspresja genu prosysteminy w pomidorach transgenicznym w orientacji bezsensownej powodowała istotne obniżenie zdolności do indukowanej syntezy inhibitora proteinaz i obniżenie poziomu odporności względem owadów [76]. Larwy *Manduca sexta* karmione takimi roślinami rozwijały się trzykrotnie szybciej niż larwy karmione roślinami kontrolnymi [88]. Nadekspresja genu prosysteminy we właściwej orientacji sprawia, że geny obronne są w stanie zaktywowanym przypominającym stan stałego zranienia rośliny. W takich pomidorach stwierdzono niezwykle intensywną syntezę białek obronnych sięgającą poziomu 1 mg/g liści. W doświadczeniach, w których przeszczepiano na korzeń transgenicznej rośliny pęd rośliny dzikiej, obserwowano, że w górnej części rośliny syntetyzowane były białka obronne bez konieczności indukowania reakcji obronnych [78].

Zastanawiające jest to, że systemina stanowi tylko krótki fragment prosysteminy, zajmując około 10% wszystkich aminokwasów. Wydaje się prawdopodobne, że z pozostałej części prosysteminy odcinane są inne peptydy sygnałowe. Na taką możliwość wskazuje również analiza sekwencji genu [77]. Modyfikacje sekwencji aminokwasowej i synteza analogów systeminy pokazały, że do pełnej aktywności potrzebny jest cały osiemnastoaminokwasowy łańcuch, jakkolwiek region C-końcowy ma szczególne znaczenie [91]. N-końcowy fragment jest natomiast istotny



w interakcji z następnym ogniwem łańcucha transdukcji, być może z receptorem, na co wskazują wyniki badań z zastosowaniem analogów systeminy. Poszukując białka receptorowego ustalono, że może to być białko o masie cząsteczkowej 50 kDa pochodzące z błony plazmatycznej (SBP 50) [111]. Obecność receptora systeminy w błonie plazmatycznej potwierdzają doświadczenia prowadzone na hodowlach komórkowych pomidora [38]. Systemina powoduje tu alkalizację środowiska hodowlanego i wypływ jonów  $K^+$  oraz indukuje syntezę etylenu. Reakcje te hamowane są przez zmodyfikowaną systeminę. Coraz więcej wyników wskazuje także na to, że systemina wpływa bezpośrednio na uwalnianie z błony plazmatycznej kwasu linolenowego i uaktywnienie szlaku prowadzącego do syntezy jasmonianu [22]. Rola związków pochodnych kwasu linolenowego będzie omówiona w następnym rozdziale.

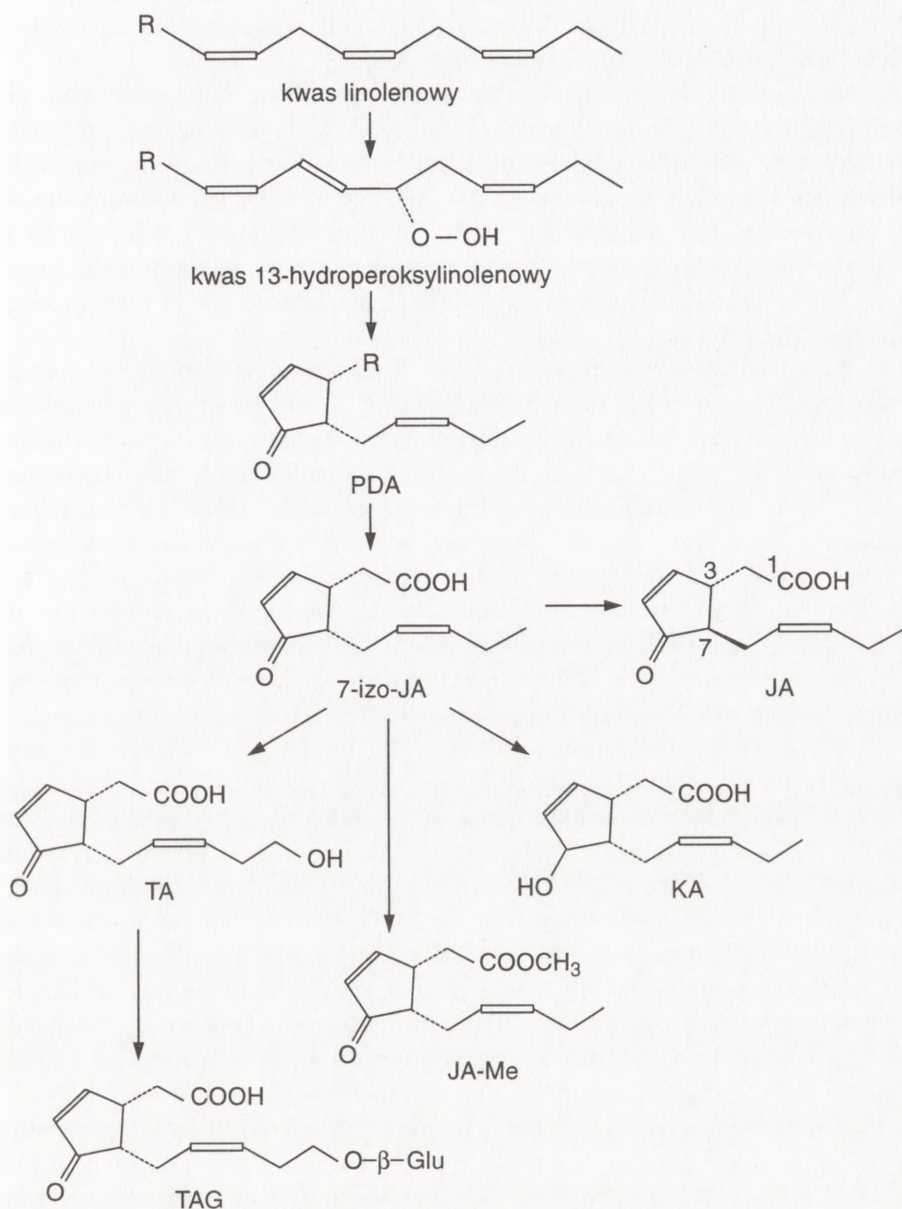
## KWAS JASMONOWY I INNE POCHODNE KWASU LINOLENOWEGO

Kwas jasmonowy (JA) został odkryty w formie lotnego estru metylowego (JA-Me) wchodzącego w skład olejku zapachowego kwiatów jaśminu i rozmarynu [25]. Wkrótce okazało się, że związek ten powszechnie występuje w roślinach niższych i wyższych, glonach, a nawet grzybach [80]. Łączna ilość JA i JA-Me w tkankach różnych organów mieści się na ogół w przedziale od 10 ng do 30  $\mu$ g w przeliczeniu na gram świeżej masy. Najwyższe stężenie tych związków występuje w kwiatach, owocach i młodych liściach, najniższe w korzeniach, pędach i dojrzałych starszych liściach.

Szlak biosyntezy JA, poznany przez Vicka i Zimmermana [124], przedstawiony jest szczegółowo w niektórych pracach przeglądowych [49, 66, 115, 119]. Szlak bierze początek od reakcji oksygenacji kwasu linolenowego katalizowanej przez lipoksygenazę. W wyniku kolejnych przemian powstaje dwunastowęglowy kwas 7-izojasmonowy pozostający w równowadze ze stereoisomerem trans (-) - kwasem jasmonowym (rys. 1).

Zmiany poziomu JA wywołane niektórymi czynnikami zewnętrznymi mogą mieć charakter bądź to kilkogodzinnego piku, bądź też długotrwałego stopniowego wzrostu stężenia [34]. Charakter tych zmian, a szczególnie czas ich trwania, sugeruje, że JA nie jest klasycznym wtórnym przekaźnikiem. Także bardziej aktywny w wielu przypadkach, lotny JA-Me może nasuwać skojarzenia z gazowym etylenem.

Substancjami pokrewnymi i przypuszczalnie pochodnymi JA lub jednego z jego prekursorów są kwasy kukurbitowy (KA) i tuberynowy (TA) (rys. 1) [66]. Pierwszy z tych związków o właściwościach inhibitora wzrostu wyizolowano z nasion dyni [40]. Kwas tuberynowy oraz jego bardzo aktywny 0- $\beta$ -glukozyd (TAG) wyizolowano



Rys. 1. Schemat syntezy związków z rodziny kwasu jasmonowego

z liści ziemniaka i buraka. Oba te związki w stężeniach mikromolowych indukują zawiązywanie się bulw. Proces ten jest zależny od fotoperiodu i regulowany przez gibereliny, cytokiny i kwas abscysynowy. Obecnie sugeruje się, że jasmonidy

– związki z rodziny kwasu jasmonowego – indukują powstawanie bulw w wyniku rozrywania i zmiany orientacji mikrotubul [66].

Zaskakująca jest różnorodność zmian fizjologicznych, jakie obserwuje się w wyniku traktowania roślin egzogennym JA lub JA-Me. Okazało się, że szereg efektów fizjologicznych może być indukowanych bądź aktywowanych, a w niektórych przypadkach pewne reakcje są hamowane. JA indukuje na przykład wytwarzanie bulw, skręcanie wici roślin pnących, rozrywanie mikrotubul. Hamowaniu podlega kiełkowanie nasion i pyłku, tworzenie pąków kwiatowych, embriogeneza, a także wzrost. JA, podobnie jak ABA, wpływa aktywująco na starzenie liści i owocni oraz na odcinanie liści [46].

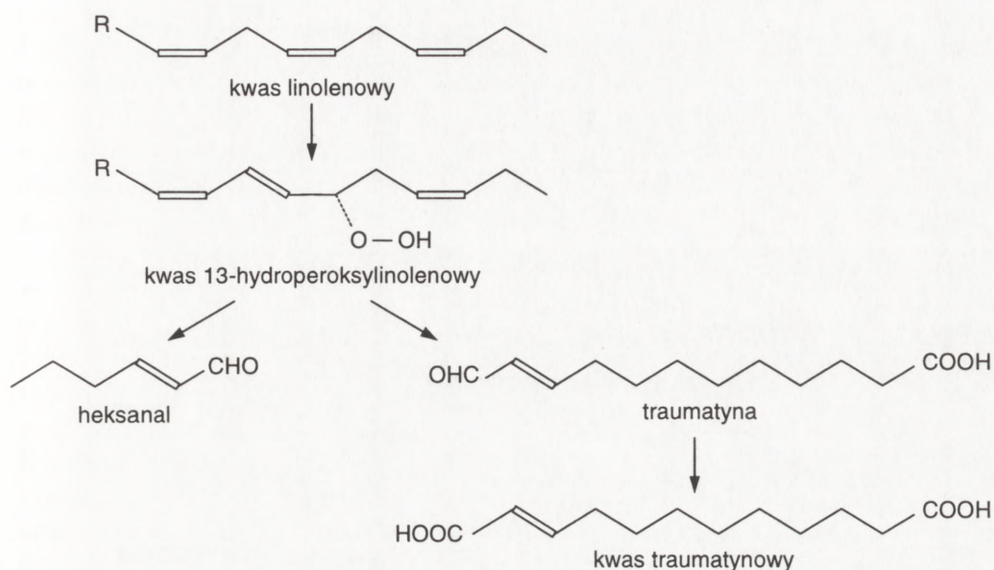
Ostatnie dziesięciolecie przyniosło wiele interesujących wyników dotyczących zmian zachodzących na poziomie molekularnym. Dzisiaj nie ulega już wątpliwości, że JA wpływa na ekspresję genów, których aktywacja związana jest ze zranieniem tkanki oraz niektórymi czynnikami stresowymi (ciśnienie osmotyczne, odwodnienie) [36, 37, 89, 118]. W roślinach dwuliściennych białkami indukowanymi przez JA podczas zranienia są enzymy uczestniczące w syntezie fitoaleksyn, lipoksygenazy, inhibitory proteinaz, ekstensyny bogate w glicynę i glikoproteiny bogate w hydroksyprolinę. W roślinach jednoliściennych białkami, których synteza jest indukowana przez JA i związanymi ze zranieniem, są białka homologiczne do białek inaktywujących rybosomy [12], a w kukurydzy dodatkowo białko homologiczne do inhibitora trypsyny [31, 34].

Coraz więcej wyników przemawia za tym, że JA jest również kluczowym przekaźnikiem informacji w mechanizmach obronnych rośliny przeciwko chorobotwórczym grzybom, bakteriom i wirusom. JA indukuje np. syntezę momilaktonu A, fitoaleksyny, której synteza jest reakcją na określony elicitator [48, 86]. JA indukuje również syntezę roślinnych wtórnych metabolitów, takich jak alkaloidy [34].

Inną grupą białek indukowanych przez JA (JIP) są białka zapasowe organów vegetatywnych. Synteza tych białek indukowana jest przez bardzo niskie stężenie JA, takie, przy którym nie występują jeszcze efekty fizjologiczne. Białka te są magazynowane w wakuolach komórek epidermy, mezofilu i pochwy okołowiązkowej [117]. Białka zapasowe są czasowym magazynem azotu, bowiem ulegając degradacji w starszych liściach stanowią źródło azotu dla rozwijających się organów.

Ostatnie badania wskazują, że kwas fotodienowy (PDA) będący związkiem pośrednim w syntezie JA (rys. 1) również indukuje geny białek obronnych [112].

Oprócz związków z rodziny kwasu jasmonowego, kwas linolenowy jest także prekursorem związków z rodziny traumatyny. W tym szlaku przemian kwas linolenowy po reakcji oksygenacji i przekształceniu do kwasu 13-hydroperoksylinolenowego ulega rozszczepieniu na dwa fragmenty: 12- i 6-węglowe (rys. 2). Fragment dwunastowęglowy mający na przeciwnych końcach łańcucha grupę aldehydową i karboksylową został zidentyfikowany jako traumatyna – hormon przyranny. Nietrwała traumatyna może być utleniana do kwasu traumatynowego [34,



Rys. 2. Schemat syntezy związków z grupy traumatyny

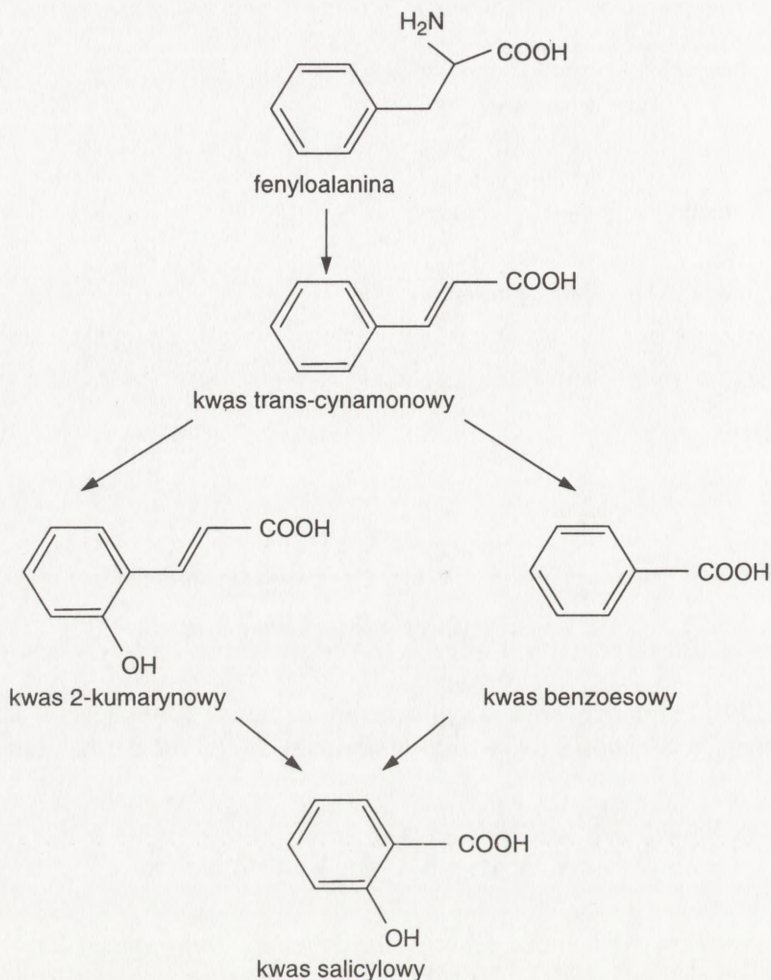
45, 120, 129]. Fragmenty sześciowęglowe, np. heksanal, powstające w zranionych liściach mają właściwości toksyczne w stosunku do grzybów i bakterii [34].

## KWAS SALICYLOWY

Kwas salicylowy (SA) należy do roślinnych fenoli, grupy związków wyjątkowo zróżnicowanych pod względem strukturalnym i niedawno jeszcze traktowanych jako wtórne metabolity. Dzisiaj już wiadomo, że co najmniej kilka związków z tej grupy to substancje pełniące ważne funkcje biologiczne. SA był uważany początkowo za naturalny związek indukujący kwitnienie [69], później jako endogeny czynnik indukujący termogenezę [96], a w ostatnich latach jako substancja sygnałowa uruchamiająca mechanizmy obronne w odpowiedzi na patogeny [72].

W roślinach kwas salicylowy jest syntetyzowany z fenyloalaniny według schematu przedstawionego na rysunku 3. Obecność SA stwierdza się w różnych tkankach, różnych gatunków w ilości od 0,03 do 37  $\mu\text{g/g}$  świeżej masy [98]. Oprócz wolnego kwasu w wielu roślinach znaleziono kilka różnych pochodnych glikozydowych i estrowych [93, 94].

Przez szereg lat SA wzbudzał zainteresowanie przede wszystkim jako potencjalny czynnik indukujący kwitnienie [17, 62, 63]. Z czasem okazało się, że SA nie jest



Rys. 3. Alternatywne szlaki syntezy kwasu salicylowego

specyficznym czynnikiem indukującym kwitnienie, ponieważ nie indukuje kwitnienia *Xanthium strumarium*, a ponadto nie stwierdzono różnic w poziomie endogennego SA w kwitnących i nie kwitnących roślinach. Wydaje się więc prawdopodobne, że efekt indukcji kwitnienia wiąże się z właściwościami chelatującymi SA, bowiem jak już wcześniej stwierdzono, niektóre związki chelatujące również mogą indukować kwitnienie [87, 95]. Kwas salicylowy może także wpływać na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia fosforanu i  $\text{Ca}^{2+}$  [93].

Mimo że rola SA jako naturalnego czynnika indukującego kwitnienie jest raczej wątpliwa, to nie budzi już wątpliwości jego udział w indukcji termogenezy. Zjawisko termogenezy występuje w kwiatach lub kwiatostanach niektórych przedstawicieli

rodzin *Araceae*, *Annonaceae*, *Aristolochiaceae*, *Cyclanthaceae*, *Nymphaeaceae* i *Palmae* [94, 97]. Efekt ten ułatwia wydzielanie lotnych związków przywabiających owady. Wzrost temperatury w czasie kwitnienia, poprzedzony wzrostem stężenia SA, wiąże się z indukcją genu oksydazy uczestniczącej w alternatywnym, niewrażliwym na cyjanek szlaku oddechowym [32, 100, 101]. SA indukuje alternatywną oksydazę także w roślinach nietermogenicznych, a ponadto intensyfikuje oddychanie, glikolizę i przemiany cyklu Krebsa [58, 94, 95].

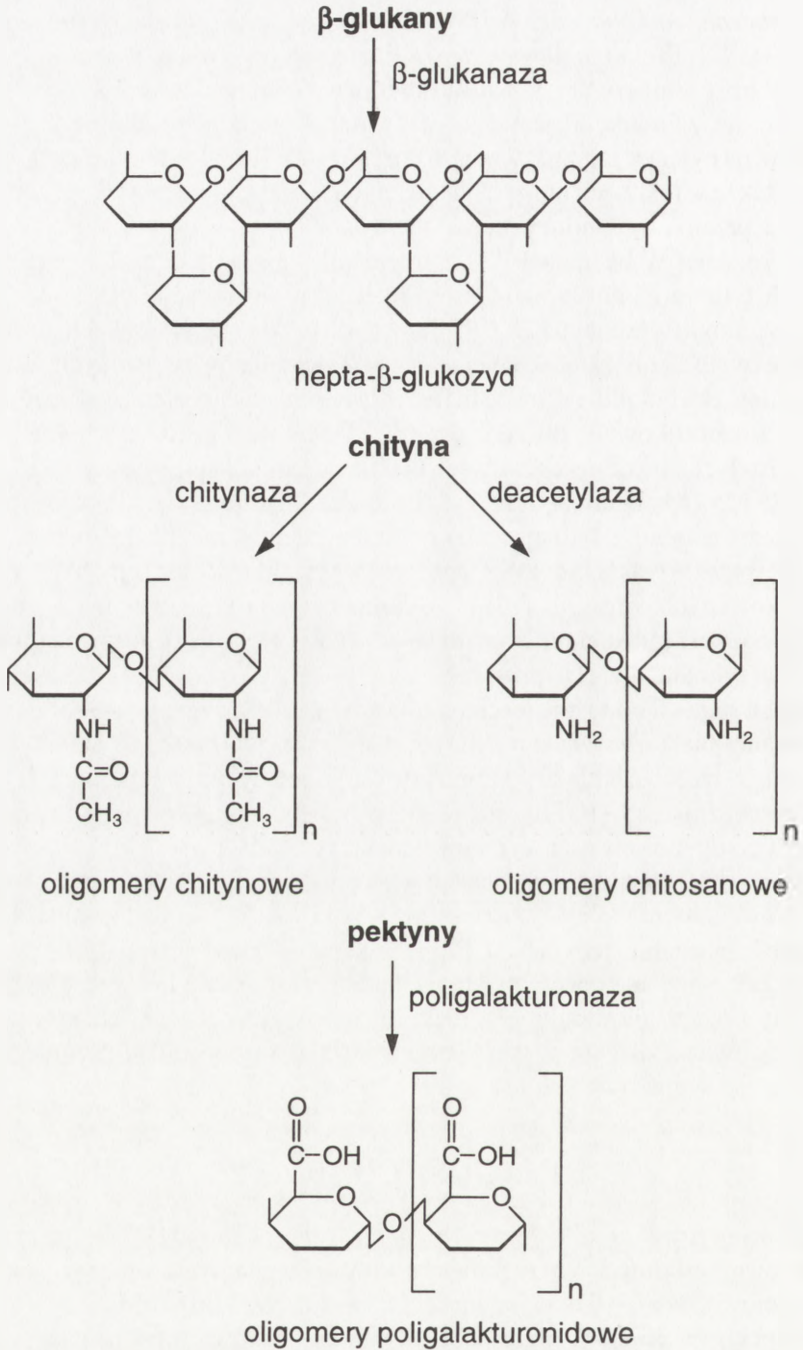
Nowy rozdział w badaniach SA zainicjowały obserwacje zmian jego poziomu w liściach tytoniu i ogórka zainfekowanych wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) bądź patogennym grzybem [72,79]. Stężenie SA w tych warunkach wzrasta 20–50-krotnie w liściach zainfekowanych i 5–10-krotnie w pozostałych liściach tej samej rośliny. SA indukuje syntezę białek PR (*pathogenesis related*), spośród których w tytoniu zidentyfikowano dwa enzymy,  $\beta$ -1,3-glukanazę (PR-2) i chitynazę (PR-3). Rola pozostałych niskocząsteczkowych białek, odpornych na proteazy nie jest jeszcze znana [93, 125]. Okazało się też, że SA nie indukuje genów inhibitorów proteinaz oraz syntezy etylenu i hamuje szlak syntezy jasmonianu [29]. Poziom indukcji białek PR przez kwas salicylowy jest porównywalny do reakcji SAR w liściach niezainfekowanych wirusem [125]. Ostatnio pojawia się coraz więcej dowodów na to, że SA jest substancją sygnałową w SAR [41, 70], choć mechanizm przekazywania sygnału nie jest poznany.

Pewnych sugestii odnośnie mechanizmów transdukcji sygnału w SAR dostarczyły poszukiwania białka wiążącego SA [16]. Od czasu gdy białko to zidentyfikowano jako jedną z izoform katalazy, pojawiły się hipotezy wskazujące na  $H_2O_2$  jako wtórny przekaźnik w SAR. Sugestie te spotkały się jednak z krytycznym przyjęciem, zwłaszcza po opublikowaniu wyników badań zespołu Bi i wsp. [14] i Neuenschwander i wsp. [85]. Wyniki uzyskane przez tych badaczy jednoznacznie wskazują, że  $H_2O_2$  nie indukuje syntezy białek PR, a jego rola w mechanizmach obronnych może mieć znaczenie jedynie na etapie reakcji hyperwrażliwej (HR) w miejscu infekcji. Tak więc na obecnym etapie badań kwas salicylowy jest uważany za endogenny przekaźnik indukujący niektóre z reakcji SAR [65]. Niektórzy autorzy skłonni są uważać SA za czynnik uczestniczący w transdukcji sygnału, ale nie za substancję sygnałową [99, 123].

## OLIGOSACHARYNY

Oligosacharyny są to aktywne biologicznie oligosacharydy, które pełnią funkcje regulatorowe w komórkach roślinnych wpływając na takie procesy, jak reakcje odpornościowe, wzrost i morfogeneza [2, 3, 23, 39, 106, 108].

Koncepcja, że niektóre oligosacharydy mogą stanowić nową klasę cząsteczek sygnałowych regulujących ekspresję genów u roślin, wywodzi się z badań nad oddziaływaniami roślina - patogen [24]. Rezultaty tych badań wykazały, że frag-



Rys. 4. Oligosacharyny indukujące odpowiedzi obronne u roślin powstałe w wyniku degradacji ścian komórkowych roślin i grzybów

menty ścian komórkowych roślin lub grzybów indukują szereg typowych dla roślin mechanizmów obronnych w odpowiedzi na atak organizmów patogennych, zranienia oraz warunki środowiskowe [3, 24, 27]. Na podstawie wyników kolejnych badań stwierdzono, że fragmenty te mogą regulować ekspresję genów roślinnych nie tylko w warunkach stresowych, ale także w czasie normalnego wzrostu i rozwoju roślin [2, 3, 108].

Większość znanych oligosacharyn jest uwalniana enzymatycznie z polisacharydów będących składnikami ścian komórkowych roślin i grzybów [3, 23, 39]. Oligosacharyny wywołujące odpowiedzi obronne są zróżnicowane strukturalnie, ponieważ ich źródłem są różne typy polisacharydów występujących w ścianach komórkowych. Pochodzenie i zróżnicowanie strukturalne tych cząsteczek przedstawia rysunek 4.

Oligosacharyny jako substancje indukujące odpowiedzi obronne zostały zidentyfikowane po raz pierwszy w latach siedemdziesiątych przez Albersheima i wsp. [8] podczas badań nad syntezą fitoaleksyn w roślinach zainfekowanych patogennymi grzybami. Fitoaleksyny są to niskocząsteczkowe toksyczne związki, syntetyzowane i akumulowane w miejscu infekcji w wyniku ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w ich syntezie [24]. Albersheim i wsp. [9] wykazali, że czynnikiem wywołującym syntezę fitoaleksyn jest heptasacharyd glukanowy zawierający reszty glukozy połączone wiązaniami  $\beta$ -(1,3) i  $\beta$ -(1,6). Była to pierwsza zidentyfikowana oligosacharyna wyizolowana ze ścian komórkowych patogennego grzyba *Phytophthora megasperma* wywołującego infekcję u soi. Ustalono też, że aktywna oligosacharyna ma ściśle określoną strukturę, która odróżnia ją od innych, nieaktywnych form heptaglukozydów powstających w wyniku hydrolizy  $\beta$ -glukanów ze ścian komórkowych grzyba. Dotyczy to położenia dwóch bocznych cząsteczek glukozy związanych z pięcioczłonowym szkieletem głównym.

$\beta$ -glukany pochodzące ze ścian komórkowych patogennych grzybów aktywują nie tylko syntezę fitoaleksyn, ale uczestniczą także w wielu innych reakcjach odpornościowych roślin [3, 24, 27, 106]. Należą do nich zmiany we właściwościach ściany komórkowej spowodowane odkładaniem kalozy i ligniny, akumulacja białek bogatych w hydroksyprolinę oraz synteza inhibitorów proteinaz. Typową reakcją obronną wywołowaną przez oligosacharyny  $\beta$ -glukanowe jest także indukcja syntezy roślinnych białek litycznych – chitynazy i  $\beta$ -glukanazy, które degradują ściany komórkowe patogenów utrudniając infekcję.

Sygnalami indukującymi mechanizmy odpornościowe u roślin są również oligosacharyny pochodzące z innych składników ścian komórkowych grzybów, a mianowicie z chityny i jej deacetylowej pochodnej, chitosanu [3, 23, 106]. Chityna jest homopolimerem składającym się z reszt  $\beta$ -1,4-N-acetyloglukozoaminowych, natomiast chitosan zbudowany jest z jednostek  $\beta$ -1,4-glukozoaminowych. Oba polisacharydy są źródłem oligosacharyn, które mogą być uwalniane w wyniku działania chitynazy lub chitosanazy. Aktywnymi oligomerami są fragmenty o stopniu poli-



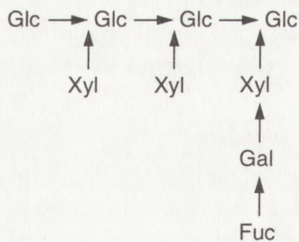
meryzacji (DP) 6–11. Stwierdzono, że są one potencjalnymi sygnałami dla syntezy fitoaleksyn i opisywanych wyżej innych reakcji obronnych wywoływanych w odpowiedzi na atak organizmów patogennych [3, 23, 106].

Oligosacharyny uruchamiające mechanizmy obronne u roślin wyizolowano i scharakteryzowano także z roślinnych ścian komórkowych [2, 3, 23, 39, 106]. Ich źródłem są pektyny, polisacharydy wchodzące w skład pierwotnej ściany komórkowej, bogate w reszty kwasu D-galakturonowego połączone wiązaniami  $\alpha$ -(1,4). W wyniku enzymatycznej hydrolizy z udziałem pektynazy uwalniane są z nich oligomery o DP 9–20 [3, 23, 106]. Oligosacharyny galakturonidowe, podobnie jak wymienione wcześniej fragmenty  $\beta$ -glukanowe, chitynowe i chitosanowe, indukują znane w procesie patogenyzy zmiany biochemiczne związane z odpornością roślin na czynniki chorobotwórcze. Specyficzność tych zmian związana jest z rozmiarami fragmentów pektynowych. Obserwowano, że syntezę fitoaleksyn i ligniny indukuje oligomer zidentyfikowany jako dodeka- $\alpha$ -(1,4)-D-galakturonid, natomiast synteza inhibitorów proteinaz była wywoływana przez mniejsze fragmenty, DP 2–3 [106].

Uzyskane dotychczas wyniki badań dowodzą, że oligosacharyny pochodzące ze ścian komórkowych grzybów uczestniczą jedynie w reakcjach obronnych związanych z mechanizmami odpornościowymi. Nie otrzymano, jak dotąd, dowodów na to, że mogą one regulować inne procesy zachodzące w komórkach roślinnych.

Aktywność biologiczną związaną z procesami wzrostu i rozwoju roślin stwierdzono w przypadku oligosacharydów pektynowych i ksyloglukanowych będących składnikami roślinnych ścian komórkowych [2, 3, 23, 39, 53, 106]. Oligogalakturonidy o stopniu polimeryzacji 10–14 regulują morfogenezę w kulturach tkankowych tytoniu [2, 122]. W zależności od składu środowiska, oligosacharyny w stężeniu  $10^{-8}$ M lub  $10^{-9}$ M indukowały niezróżnicowane komórki do tworzenia pączków wegetatywnych, kwiatów lub korzeni. Na uwagę zasługuje fakt, że stężenie oligogalakturonidów wymagane do wywołania powyższych efektów było 10–100-krotnie niższe niż to, które jest konieczne do indukcji odpowiedzi obronnych [23].

Oligosacharyny pektynowe mogą także regulować procesy wydłużeniowe u roślin



Rys. 5. Struktura oligosacharyny ksyloglukanowej –XG9

[15, 108]. Obserwowano, że stymulowany przez IAA wzrost segmentów pędu grochu jest hamowany przez oligogalakturonidy o DP>8 [15]. Hamowanie to wykazuje cechy hamowania kompetycyjnego i może być zniesione przez wyższe stężenie auksyny. Fragmenty pektynowe biorą przypuszczalnie udział w procesie dojrzewania owoców [23]. Uważa się, że ma to związek z regulacją produkcji etylenu, ponieważ stwierdzono, że oligomery galakturonidowe o stopniu polimeryzacji 5–19 indukują syntezę etylenu. Przypuszczenia te wymagają jednak potwierdzenia w dodatkowych badaniach.

Ksyloglukany są polisacharydami wchodzącymi w skład pierwotnej ściany komórkowej roślin [52]. Zbudowane są z długiego łańcucha zawierającego cząsteczki D-glukozy połączone wiązaniami  $\beta$ -(1,4), do którego przyłączone są krótsze łańcuchy zawierające  $\alpha$ -D-ksylozę,  $\beta$ -D-galaktozę i  $\alpha$ -L-fukozę oraz w mniejszych ilościach  $\alpha$ -L-arabinozę i  $\beta$ -D-ksylozę. Ksyloglukany są hydrolizowane przez celulazę do mniejszych fragmentów. Część spośród nich jest oligosacharydami mającymi zdolność regulowania wzrostu roślin. Najlepiej poznaną oligosacharydą ksyloglukanową jest oligosacharyd składający się z 9 reszt cukrowych określany w skrócie XG9 (rys. 5). Znane jest działanie oligosacharyny XG9, która w stężeniu  $10^{-9}$ M hamuje indukowane przez auksynę 2,4-D i kwas giberelinowy wydłużanie segmentów pędu grochu [126]. Wydaje się, że XG9 nie działa jak typowa anty-auksyna, ponieważ wzrost stężenia auksyny nie znosi efektu hamowania. Inne oligosacharyny ksyloglukanowe, np. XG7, mogą w nieobecności 2,4-D stymulować wzrost przez fakt, iż stanowią one substrat dla endotransglikozylazy ksyloglukanowej [26, 39]. Enzym ten powoduje przejściową degradację szkieletu ksyloglukanowego i czasowe rozluźnienie ściany komórkowej, co sprzyja wzrostowi komórek.

Ostatnie wyniki badań dowodzą, że wpływ na procesy wzrostowe ma także oligosacharyna pochodząca z galaktoglukomannanu [7]. Taki typ polisacharydów występuje jako składnik pierwotnej i wtórnej ściany komórkowej roślin wyższych. Obserwowano, że oligosacharyd galaktoglukomannanowy hamował indukowany przez 2,4-D wzrost wydłużeniowy segmentów pędu grochu.

Rezultaty badań prowadzonych od blisko dwudziestu lat wskazują na to, że oligosacharyny stanowią nową klasę cząsteczek sygnałowych lub regulatorowych pełniących ważne funkcje w procesach odpornościowych u wielu gatunków roślin, a także w ich wroście i rozwoju. Mechanizm działania tych związków pozostaje, jak dotąd, nieznany. Niewykluczone jest, że oligosacharyny, podobnie jak hormony, mogą regulować ekspresję genów roślinnych uruchamiając system transdukcji sygnału za pośrednictwem receptorów błonowych i z udziałem kinaz białkowych. Fakt, że aktywność biologiczna oligosacharyn jest ściśle związana z ich strukturą oraz to, że wywołują one określone efekty przy bardzo niskich stężeniach, może sugerować taki mechanizm przekazywania sygnału [2, 23, 39]. Zidentyfikowanie miejsc wiążących, być może receptorów, dla aktywnego  $\beta$ -glukanu [128], oligosacharyny ksyloglukanowej XG9 [39] oraz fragmentów pektynowych [23] mogłoby potwierdzać tę sugestię. Doświadczenia prowadzone w kulturach tkankowych soi oraz na oczyszczonych błonach plazmatycznych z komórek liści pomidora i ziemniaka wykazały, że fragmenty  $\beta$ -glukanowe i pektynowe zmieniały *in vitro* poziom fosforylacji niektórych białek błonowych [35, 108].

Rozważana jest także możliwość działania oligosacharyn poprzez wywoływanie szybkich zmian na poziomie błon plazmatycznych, szczególnie w odniesieniu do indukowanych przez oligosacharyny odpowiedzi obronnych [3, 108]. Aktywne oligosacharydy  $\beta$ -glukanowe lub pektynowe, które uczestniczą w tych procesach, po-

wodują depolaryzację błony, co zwiększa szybkość przepływu jonów oraz zwiększają produkcję  $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ , które biorą udział w peroksydacji lipidów [3, 108]. Zmiany te mogą wpływać na przepuszczalność błon i być może przez to umożliwiać wnikanie oligosacharyn do wnętrza komórki.

Ciekawa jest sugestia, dotycząca także oligosacharyn indukujących ekspresję genów obronnych, zgodnie z którą wnikanie tych cząsteczek mogłoby zachodzić w drodze endocytozy. Wyniki badań prowadzonych *in vitro* w kulturach tkankowych soi z użyciem oligosacharyn  $\beta$ -glukanowych i roślinnych oligosacharyn pektynowych wskazują na taką możliwość [108]. Przypuszczenia te wymagają jednak dodatkowych badań, które potwierdziłyby obecność wewnątrz komórek specyficznych receptorów, co, jak dotąd, nie zostało stwierdzone.

## POLIAMINY

Poliaminy, występujące powszechnie u prokariotów i eukariotów, są aminami pierwszorzędowymi mającymi dwie lub więcej grup aminowych. U roślin występują trzy główne poliaminy: putrescyna (diamina), spermidyna (triamina) i spermina (tetraamina).

Putrescyna:  $H_2N-(CH_2)_4-NH_2$

Spermidyna:  $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH_2$

Spermina:  $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$

Natura chemiczna tych związków, jak również szlaki ich biosyntezy i przemian metabolicznych są dobrze poznane. Wyniki badań prowadzonych w tym zakresie są przedstawione w kilku pracach przeglądowych [10, 33, 44, 116, 121].

W komórkach roślinnych poliaminy występują jako wolne zasady lub tworzą związki z kwasami fenolowymi i innymi związkami niskocząsteczkowymi bądź makrocząsteczkami [33]. Stężenie endogennych poliamin jest stosunkowo wysokie i w zależności od gatunku, rodzaju organu i stopnia rozwoju waha się od  $2 \mu M$  do  $2-3 \text{ mM}$ , a w nasionach nawet do  $30 \text{ mM}$  [10, 33, 43]. Endogenne poziomy poliamin jest szczególnie wysoki w młodych, aktywnie rosnących tkankach [59].

Wyniki licznych, prowadzonych od ponad dwudziestu lat badań sugerują, że poliaminy mogą pełnić funkcje regulatorowe w komórkach roślinnych, chociaż ich rola nie jest ostatecznie ustalona. Generalnie przyjmuje się, że podobnie jak znane fitohormony mają one wpływ na procesy wzrostu i różnicowania [10, 33, 43, 44]. Poziomy poliamin jest ponadto modyfikowany przez warunki zewnętrzne, takie jak światło i temperatura oraz różne fizyczne i chemiczne czynniki stresowe [43, 44]. Poliaminy uczestniczą także w procesach odpornościowych związanych z uruchamianiem odpowiedzi obronnych na atak organizmów patogennych [13].

Prowadząc badania z wykorzystaniem mutantów (*E. coli*, *N. crassa*, *S. cerevisiae*, komórki ssaków) ustalono, że poliaminy są niezbędne dla procesów wzrostu [121]. Mutanty, które wykazywały defekt w szlaku biosyntezy poliamin, były niezdolne do normalnego wzrostu i rozwoju. Wyniki tych badań zostały potwierdzone w doświadczeniach wykonywanych na tkankach roślinnych, w których stosowano inhibitory dekarboksylazy argininy (ADC) i dekarboksylazy ornityny (ODC), kluczowych enzymów biosyntezy poliamin. Podanie egzogennych poliamin w każdym przypadku przywracało normalny wzrost i rozwój.

Dla procesów wzrostu i rozwoju podstawowe znaczenie mają podziały komórkowe. Tkanki charakteryzujące się aktywnym metabolizmem i podlegające szybkim podziałom komórkowym odznaczają się wysokim poziomem poliamin [10, 33, 44]. W badaniach *in vitro* prowadzonych w synchronicznych kulturach *Chlorella vulgaris* [21] i *Nicotiana tabacum* [92] stwierdzono, że poliaminy są niezbędne do zakończenia cyklu komórkowego. Obserwowano, że po zastosowaniu inhibitorów syntezy poliamin komórki wchodziły do fazy G1, ale przejście do fazy S było uwarunkowane dodaniem egzogennych poliamin. Można więc przypuszczać, że związki te mają istotne znaczenie dla replikacji DNA i podziału mitotycznego komórki.

Wyniki badań dotyczących udziału poliamin w procesach różnicowania się komórek wskazują, że zmiany zachodzące na tym etapie rozwoju związane są ze zmianami w poziomie zarówno wolnych, jak i związanych poliamin [10]. Montague i wsp. [82] prowadząc badania w kulturach tkankowych marchwi wykazali, że proces embriogenezy jest uwarunkowany wysokim poziomem poliamin. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej dowodów na to, że poliaminy biorą także udział w procesach organogenezy. Powszechnie znany jest wpływ tych związków na powstawanie korzeni [33]. Korelacje między poziomem poliamin a wczesnymi etapami powstawania korzeni stwierdzono u wszystkich badanych roślin. Faza ta charakteryzuje się zmianami w aktywności peroksydazy, które przypuszczalnie kontrolowane są przez poziom poliamin [51].

Poziom endogennych poliamin związany jest również z powstawaniem i dojrzewaniem owoców [33, 54]. Zależności te są specyficzne gatunkowo zarówno w odniesieniu do rodzaju poliaminy, jak i wywoływanego efektu. Na ogół stwierdza się wysoki poziom poliamin w momencie zawiązywania się owoców, a następnie spadek w czasie ich dojrzewania [54].

Poliaminy mogą także brać udział w inicjacji i kontroli kwitnienia [33, 54]. Badania prowadzone *in vitro* w kulturach organogenicznych tytoniu wykazały wpływ poliamin na te procesy [60].

Ze względu na możliwość powiązania szlaków biosyntezy poliamin i etylenu [10, 33] dużo uwagi poświęca się udziałowi poliamin w procesach starzenia. Starzenie się organów, zarówno *in situ* jak i po usunięciu z rośliny, jest skorelowane z obniżaniem się poziomu poliamin [33, 43, 44]. Jednym z symptomów starzenia się organów jest spadek aktywności dekarboksylazy argininy i spadek poziomu poliamin.

Wyniki badań wskazują, że dodanie egzogennych poliamin opóźnia efekty starzenia [43]. W doświadczeniach prowadzonych przez grupę Galstona na protoplastach z komórek mezofilu owsa i innych zbóż obserwowano, że obecność egzogennych poliamin hamuje procesy typowe dla starzenia, takie jak degradacja chlorofilu, RNA i białek [43]. Wielu autorów sugeruje, że mechanizm opóźniania procesu starzenia może być również związany z możliwością zahamowania syntezy etylenu przez egzogenne poliaminy, a także z ochroną błon komórkowych przez związanie z nimi poliamin. W tym przypadku poliaminy zapobiegałyby peroksydacji lipidów [33, 44, 114].

Poziom poliamin, a także enzymów uczestniczących w ich biosyntezie zależy w dużym stopniu od różnych czynników fizycznych i chemicznych mogących wywołać stres u roślin [43, 44]. Rezultaty badań prowadzonych głównie w roślinach zbożowych wykazały wielokrotny wzrost poziomu putrescyny w odpowiedzi na takie czynniki stresowe, jak: niedobór potasu i wody, wysokie stężenie jonów wodorowych i amonowych, zanieczyszczenia atmosferyczne (dwutlenek siarki, jony kadmu), a także w warunkach ograniczonej dostępności tlenu [43]. Oprócz akumulacji putrescyny we wszystkich przypadkach obserwowano wzrost aktywności ADC. Enzym ten został w związku z tym uznany za enzym markerowy stresu w przypadku roślin zbożowych. Fizjologiczne znaczenie wrażliwości poziomu poliamin na czynniki stresowe nie jest jasne. Być może efekt ten ma znaczenie adaptacyjne i ochronne albo, jak sądzą niektórzy autorzy, jest jedną z wielu zmian fizjologicznych bez szczególnego znaczenia [33].

Na obecnym etapie badań zasadnicze pytania dotyczą istoty funkcji fizjologicznych i mechanizmu działania poliamin. W rozważaniach na temat roli tych związków należy pamiętać, iż mają one charakter polizasad. W komórkowych wartościach pH poliaminy są kationami, w związku z czym proponuje się, że przynajmniej część ich funkcji jest wynikiem oddziaływań z ujemnie naładowanymi makrocząsteczkami, takimi jak: kwasy nukleinowe, białka, fosfolipidy oraz pektynowe składniki ścian komórkowych [10, 44].

Oddziaływania poliamin z błonami należą do najdawniej stwierdzonych i dobrze poznanych efektów wywoływanych przez te związki [114]. Wiązanie się poliamin z błonami ma istotne znaczenie dla aktywności niektórych enzymów zlokalizowanych w błonach [44, 114], wpływa na transport jonów i metabolitów [114], a także zapobiega peroksydacji lipidów [33, 44, 114]. Poliaminy wiążąc się z błonami wpływają na ich właściwości i funkcje, przez co pośredniczą w wielu ważnych procesach komórkowych, takich jak fuzja błon [114] czy przesyłanie sygnałów za pośrednictwem receptorów [67].

Szczególnie interesujące są śmiałe sugestie niektórych autorów, że poliaminy mogłyby pełnić rolę wtórnego przekaźnika w szlaku transdukcji sygnałów [4, 42]. Jak wykazują rezultaty badań z ostatnich kilku lat, nie są to sugestie zupełnie bezpodstawne. Stwierdzono bowiem, że poliaminy wpływają na fosforylację białek

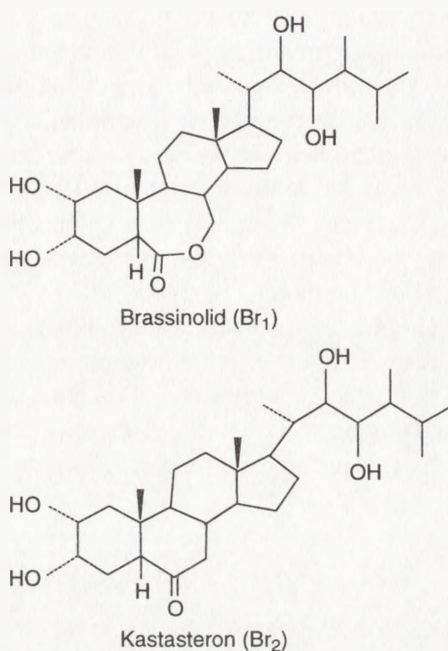
przez aktywację kinaz białkowych [44]. Po raz pierwszy zaobserwowano to w przypadku fosforylacji białek obronnych (PR) powstających w procesie patogenezы [13]. Dalsze badania wykazały, że poliaminy mają także wpływ na fosforylację wielu białek błonowych i cytoplazmatycznych w reakcjach nie związanych z mechanizmami obronnymi [127]. Dodatkowym poparciem dla tej sugestii mógłby być fakt, że poliaminy uczestniczą w metabolizmie fosfoinozytoli [30]. Jednakże wysokie, występujące na stałym poziomie stężenie poliamin jest argumentem przeciwko jednoznacznemu uznaniu tych związków za wtórne przekazywniki.

## BRASSINOSTEROIDY

Już na początku lat siedemdziesiątych było wiadomo, że pyłek rzepaku, olchy oraz innych roślin zawiera substancje, które w teście elongacyjnym wykonywanym na międzywęzłach fasoli powodowały niezwykle silne reakcje [81]. Nową grupę związków biologicznie aktywnych, o charakterze lipidowym nazwano brassinami. Pierwszy wyizolowany i zidentyfikowany związek z tej rodziny, brassinolid ( $Br_1$ ) ma strukturę 5-cholestanu [47]. Drugim obok  $Br_1$ , stosunkowo wcześniej poznany związek, jest kastasteron ( $Br_2$ ) należący do rodziny brassinosteronów (rys. 6). Został on wyizolowany po raz pierwszy z galasów kasztana.

Obecnie znana jest struktura ponad 30 brassinosteroidów, chociaż ilość związków wyizolowanych z różnych roślin należących do tej rodziny przekroczyła już liczbę 60. Nazewnictwo, struktura chemiczna, występowanie, a także niektóre efekty fizjologiczne brassinosteroidów zostały wyczerpująco opisane w artykule przeglądowym zamieszczonym w *Kosmosie* [11]. Czytelnika zainteresowanego informacjami szczegółowymi odsyłamy do obszernej pracy pt. *Brassinosteroides. Chemistry, bioactivity and applications* [64].

W badaniach efektów fizjologicznych brassinosteroidów na szczególną uwagę zasługują wyniki wskazujące na współzależność między Br a IAA oraz między Br a giberelinami [1, 110]. Na ogół efekty fizjologiczne brassinosteroidów i IAA są synergiczne. Tak jest na przykład ze stymulacją wzrostu czy syntezy etylenu



Rys. 6. Struktury najlepiej poznanych roślinnych brassinosteroidów

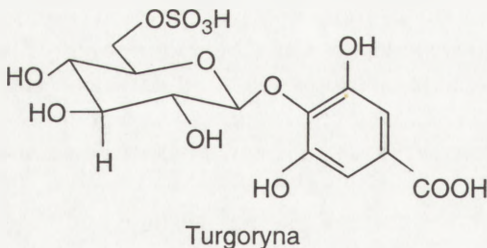
w hypokotylach fasoli [75]. Stymulacja syntezy etylenu przez brassinosteroidy znośzona jest przez światło, czego nie obserwuje się w przypadku IAA. Synergizm występuje na ogół wtedy, gdy tkanka traktowana jest najpierw Br, a następnie auksyną. W przypadku zmienionej kolejności efekty są addytywne [1, 5, 73, 109]. Współdziałanie brassinosteroidów z giberelinami ma inny charakter. Efekty wywierane przez Br i gibereliny są na ogół niezależne i addytywne.

Poznanie funkcji regulacyjnych brassinosteroidów będzie wymagało podjęcia w najbliższej przyszłości szerszych badań na poziomie molekularnym. Ze względu na duże podobieństwo tych związków do zwierzęcych hormonów sterydowych aktualne hipotezy zakładają, że brassinosteroidy wiązane są do rozpuszczalnych białek receptorowych tworząc kompleksy regulujące specyficzne geny. Dotychczas wykazano, że Br wpływają aktywnie na polimerazę RNA i DNA [55, 74] i zmieniają obraz genów ulegających ekspresji [19]. Mimo podejmowanych w ostatnich latach nowych prób postępowania badań w tym zakresie jest nadal niewielki [18, 20, 130, 131].

## INNE ZWIĄZKI AKTYWNE BIOLOGICZNIE

### Turgoryny

W świecie roślin znane są reakcje ruchowe związane ze zmianami turgoru komórek. Ruchy nastyczne mogą być wyzwalane przez różnorodne bodźce fizyczne, takie jak: temperatura, światło, dotyk, wstrząs itp. Substancją sygnałową indukującą zmiany osmotyczne u akacji okazała się turgoryna [113] będąca 4-O-glukozydem kwasu galusowego (rys. 7). Większość obecnie znanych turgoryn izolowanych z mimozy ma bardzo podobną budowę [56]. We wszystkich związkach z tej grupy grupa hydroksylowa przy szóstym węglu glukozy zestryfikowana jest kwasem siarkowym.

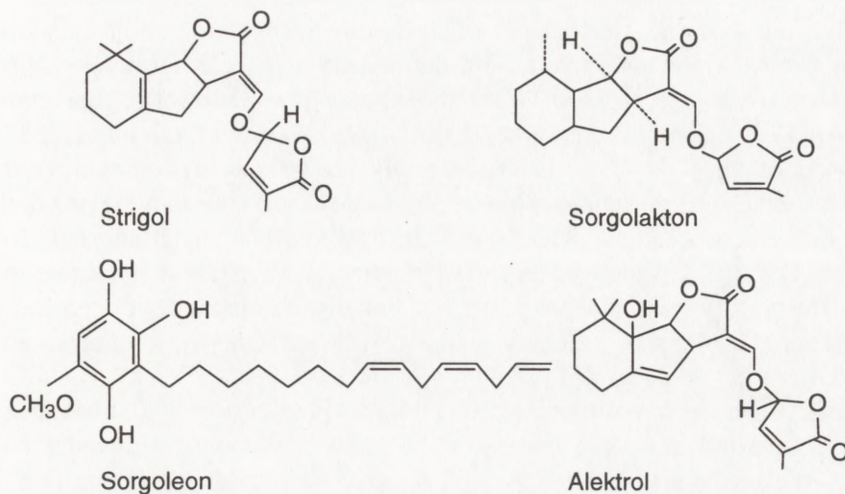


Rys. 7. Struktura pierwszej turgoryny wyizolowanej z akacji

Mechanizm działania turgoryn jest nieznany. W ostatnim czasie z błony plazmatycznej liści mimozy wyizolowano białko wiążące jedną z turgoryn [57].

### Triakontanol i L(+)-adenozyna

Triakontanol (TRIA), składnik roślinnych wosków, jest jednowodorotelnym alkoholem o trzydziestowęglowym nierozgałęzionym łańcuchu. Związek ten w stężeniu  $10^{-8}$  M sty-



Rys. 8. Struktury związków indukujących kiełkowanie nasion niektórych roślin pasożytniczych

muluje wzrost i wpływa znacząco na przyrost masy, co, jak się uważa, w dużym stopniu jest wynikiem wzrostu wydajności fotosyntezy [103].

Mechanizm działania TRIA nie jest znany. Szereg wyników badań wskazuje, że TRIA podnosi poziom L(+)-adenozyny, która może wywoływać podobne efekty jak TRIA. Obserwacje powyższe stały się podstawą do przypuszczeń, że L(+)-adenozyna jest wtórnym przekaźnikiem w szlaku przemian indukowanych przez TRIA [102, 104].

### Substancje stymulujące kiełkowanie

Niektóre rośliny syntetyzują w korzeniach pewne substancje sygnałowe, które w bardzo niskich stężeniach indukują kiełkowanie nasion niektórych chwastów pasożytniczych na korzeniach wielu roślin. Do tej grupy związków należą strigol, alektrol, sorgolakton i sorgoleon (rys. 8). Związki te, wydzielane do gleby, niosą informację sygnalizującą nasionom *Striga asiatica* i pokrewnych gatunków bliskość korzeni gospodarza [50].

## UWAGI KOŃCOWE

60 lat temu została wyodrębniona po raz pierwszy auksyna, pierwszy hormon roślinny. W następnych dziesięcioleciach poznano kolejne substancje uczestniczące w regulacji wzrostu i rozwoju, które można już dzisiaj uznać za klasyczne hormony roślinne. Oprócz tych pięciu grup fitohormonów w obecnej chwili znane są dziesiątki



wtórnych metabolitów i substancji biologicznie czynnych, a wśród nich również związki, które odpowiadają kryteriom definiującym pojęcie hormonu roślinnego. Kryteria te ostatnio przypomniał Lewak w pracy przeglądowej zamieszczonej w *Kosmosie* [71]. Celem obecnej pracy było zwrócenie uwagi Czytelnika na te nowe związki, których efekty fizjologiczne zostały już w znacznym stopniu poznane. Badania nad niektórymi z nich trwają od dłuższego czasu, inne stały się przedmiotem badań dopiero w ostatnim pięcioleciu. Liczba wyodrębnionych substancji biologicznie aktywnych stale powiększa się. W większości przypadków znana jest budowa chemiczna tych związków, natomiast tylko niektórym z nich można przypisać określone efekty fizjologiczne. Bogaty przegląd tych substancji jest zamieszczony w pracy Grossa i Parthiera [46].

Współczesne metody wyodrębniania i analizy jakościowej umożliwiają szybkie ustalenie struktury nowo poznawanych związków, co na ogół wyprzedza badania mające na celu poznanie ich funkcji. Tak więc rosnąca ciągle liczba oraz różnicowanie strukturalne substancji biologicznie czynnych uświadamia nam fakt, że nasza znajomość skomplikowanych procesów regulujących wzrost i rozwój roślin jest jeszcze bardzo cząstkowa.

## LITERATURA

- [1] ADAM G, MARQARDT V. Brassinosteroids. *Phytochemistry* 1986; **25**:1787–1799.
- [2] ALBERSHEIM P, DARVILL AG. Oligosaccharins. *Sci Am* 1985; **253**:58–64.
- [3] ALDINGTON S, FRY SC. Oligosaccharins. *Adv Bot Res* 1993; **19**: 1–01.
- [4] ANTOGNONI F, PISTOCCHI R, CASALI P, BAGNI N. Does calcium regulate polyamine uptake in carrot protoplasts? *Plant Physiol Biochem* 1995; **33**: 701–708.
- [5] ARTECA RN. Brassinosteroids. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1995: 206–213.
- [6] ATKINSON MM. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. *Adv Plant Pathol* 1993; **10**: 35–64.
- [7] AUXTOVÁ-SAMAJOVÁ O, LISKOVÁ D, KÁKONIOVÁ D, KUBAČKOVÁ M, KARÁCSONYI S, BILISICS L. Inhibition of auxin stimulated short-term elongation growth of pea stem segments by galactoglucomannan-derived oligosaccharides. *J Plant Physiol* 1996; **147**: 611–613.
- [8] AYERS AR, EBEL J, FINELLI F, BERGER N, ALBERSHEIM P. Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol* 1976; **57**: 751–759.
- [9] AYERS AR, VALENT B, EBEL J, ALBERSHEIM P. Host-pathogen interactions. XI. Composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiol* 1976; **57**: 766–774.
- [10] BAGNI N, TORRIGIANI P. Polyamines: A new class of growth substances. [w] Karssen CM, Van Loon LC, Vreugdenhil D [red.] *Progress in Plant Growth Regulation*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1991: 264–275.
- [11] BAJGUZ A, CZERPAK R. Występowanie i aktywność biologiczna brassinosteroidów – nowych hormonów roślinnych. *Kosmos* 1995; **44**: 129–144.

- [12] BECKER W, APEL K. Differences in gene expression between natural and artificially induced leaf senescence. *Planta* 1993; **189**: 74–79.
- [13] BELLES JM, CARBONELL J, CONEJERO V. Polyamines in plants infected by citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiol* 1991; **96**: 1053–1059.
- [14] BI Y-M, KENTON P, MUR L, DARBY R, DRAPER J. Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J* 1995; **8**: 235–245.
- [15] BRANCA C, DeLORENZO G, CERVONE F. Competitive inhibition of auxin-induced elongation by  $\alpha$ -D-oligogalacturonides in pea stem segments. *Physiol Plantarum* 1988; **72**: 499–504.
- [16] CHEN Z, SILVA H, KLESSIG D. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 1993; **262**: 1883–1886.
- [17] CLELAND CF, AJAMI A. Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiol* 1974; **54**: 904–906.
- [18] CLOUSE SD, ZUREK DM. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. [w] Cutler HG, Yokota T, Adam G [red.] *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*. American Chemical Society 1991: 122–140.
- [19] CLOUSE SD, ZUREK DM, McMORRIS TC, BAKER ME. Effect of brassinolide on gene expression in elongating soybean epicotyls. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1377–1383.
- [20] CLOUSE SD, HALL AF, LANGFORD M, McMORRIS TC, BAKER ME. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 1993; **12**: 61–66.
- [21] COHEN E, ARAD SM, HEIMER YH, MIZRAHI Y. Polyamine biosynthetic enzymes in the cell cycle of *Chlorella*. *Plant Physiol* 1984; **74**: 385–388.
- [22] CONSTABEL CP, BERGEY DR, RYAN CA. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 407–411.
- [23] CÔTÉ F, HAHN MG. Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1379–1411.
- [24] DARVILL AG, ALBERSHEIM P. Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 1984; **35**: 243–275.
- [25] DEMOLE E, LEDERER E, MERCIER D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv Chim Acta* 1962; **45**: 675–685.
- [26] DeSILVA J, ARROWSMITH D, HELLYER A, WHITEMAN S, ROBINSON S. Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *J Exp Bot* 1994; **45**: 1693–701.
- [27] DIXON RA, LAMB CJ. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1990; **41**: 339–367.
- [28] DIXON RA, HARRISON MJ, LAMB CJ. Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 1994; **32**: 479–501.
- [29] DOARES SH, NARVÁEZ-VÁSQUEZ J, CONCONI A, RYAN CA. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol* 1995; **108**: 1741–1746.
- [30] DUREJA-MUNJAL I, ACHARYA MK, GUHA-MUKHERJEE S. Effect of hormones and spermidine on the turnover of inositol phospholipids in *Brassica* seedlings. *Phytochemistry* 1992; **31**: 1161–1163.
- [31] ECKELKAMP K, EHMANN B, SCHOPFER P. Wound-induced systemic accumulation of a transcript coding for Bowman-Birk trypsin inhibitor-related protein in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *FEBS Lett* 1993; **323**: 73–76.
- [32] ELTHON TE, NICKELS RL, McINTOSH L. Mitochondrial events during development of thermogenesis in *Sauromatum guttatum* (Schott). *Planta* 1989; **180**: 82–89.

- [33] EVANS PT, MALMBERG RL. Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol* 1989; **40**: 235–269.
- [34] FARMER EE. Fatty acid signalling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1423–1437.
- [35] FARMER EE, MOLOSHOK TD, SAXTON MJ, RYAN CA. Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J Biol Chem* 1991; **266**: 3140–3145.
- [36] FARMER EE, JOHNSON RR, RYAN CA. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol* 1992; **98**: 995–1002.
- [37] FARMER EE, RYAN CA. Octadecanoid precursor of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitor. *Plant Cell* 1992; **4**: 129–134.
- [38] FELIX G, BOLLER T. Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant J* 1995; **7**: 381–389.
- [39] FRY SC, ALDINGTON S, HETHERINGTON PR, AITKEN J. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol* 1993; **103**: 1–5.
- [40] FUKUI H, KOSHIMIZU K, YAMAZAKI Y, USUDA S. Structures of plant growth inhibitors in seeds of *Cucurbita pepo* L. *Agricult Biol Chem* 1977; **41**: 189–194.
- [41] GAFFNEY T, FRIEDRICH L, VERNOOIJ B, NEGROTTO D, NYE G, UKNES S, WARD E, KESSMANNH, RYALS J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 1993; **261**: 754–756.
- [42] GALSTON AW. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* 1983; **33**: 382–388.
- [43] GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol* 1990; **94**: 406–410.
- [44] GALSTON AW, KAUR-SAWHNEY R. Polyamines as endogenous growth regulators. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers 1995: 158–178.
- [45] GARDNER HW. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1084**: 221–239.
- [46] GROSS D, PARTHIER B. Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Plant Growth Regul* 1994; **13**: 93–114.
- [47] GROVE MD, SPENCER FG, ROHWEDDER WK, MANDAVA NB, WORLEY JF. A unique plant growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen. *Nature* 1979; **281**: 216–217.
- [48] GUNDLACH H, MULLER MJ, KUTCHAN TM, ZENK MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2389–2393.
- [49] HAMBERG M, GARDNER HW. Oxylinin pathways to jasmonates: Biochemistry and biological significance. *Biochem Biophys Acta* 1992; **1165**: 1–18.
- [50] HAUCK C, MÜLLER S, SCHILDKNECHT H. A germination stimulant for parasitic flowering plants from *Sorghum bicolor* a genuine host plant. *J Plant Physiol* 1992; **39**: 474–478.
- [51] HAUSMAN JF, KEVERS C, GASPAR T. Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*, and the adversary effect of spermidine. *J Plant Physiol* 1995; **146**: 681–685.
- [52] HAYASHI T. Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1989; **40**: 139–168.
- [53] HENSEL A, BRUMMELLD A, HANNA R, MACIACHLAN G. Auxin-dependent breakdown of xyloglucan in cotyledons of germinating nasturtium seeds. *Planta* 1991; **183**: 321–326.
- [54] KAKKAR RK, RAI VK. Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* 1993; **33**: 1281–1288.
- [55] KALINICH JF, MANDAVA NB, TODHUNTER JA. Relationship of nucleic acid metabolism to brassinolide-induced responses in beans. *J Plant Physiol* 1985; **120**: 207–214.

- [56] KALLAS P, MEIER-AUGENSTEIN W, SCHILDKNECHT H. Turgorine – neue Phytohormone? *Naturwiss Rundschau* 1989; **42**: 309–317.
- [57] KALLAS P, MEIER-AUGENSTEIN W, SCHILDKNECHT H. The structure-activity relationship of turgorin PLMF1 in the sensitive plant *Mimosa pudica* L.: *In vitro* binding of [<sup>14</sup>C-carboxyl]-PLMF1 to plasma membrane fraction from mimosa leaves and bioassays with PLMF1-isomeric compounds. *J Plant Physiol* 1990; **136**: 225–230.
- [58] KAPULNIK Y, YALPANI N, RASKIN I. Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1921–1926.
- [59] KAUR-SAWHNEY R, SHIH LM, FLORES HE, GALSTON AW. Relation of polyamine biosynthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol* 1982; **69**: 405–410.
- [60] KAUR-SAWHNEY R, TIBURCIO AF, GALSTON AW. Spermidine and flower bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. *Planta* 1988; **173**: 282–284.
- [61] KEEN NT. The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol Biol* 1992; **19**: 109–122.
- [62] KHURANA JP, MAHESHWARI SC. Some effects of salicylic acid on growth and flowering in *Spirodella polyrrhiza* SP<sub>20</sub>. *Plant Cell Physiol* 1980; **21**: 923–927.
- [63] KHURANA JP, MAHESHWARI SC. Floral induction in *Wolffia microscopica* by noninductive long days. *Plant Cell Physiol* 1987; **24**: 907–912.
- [64] KIM S-K. Natural occurrences of brassinosteroids. [w] Cutler HG, Yokota T, Adam G [red.] Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity and applications. Washington, DC: American Chemical Society 1991: 26–35.
- [65] KLESSIG DF, MALAMY J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1439–1458.
- [66] KODA Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. [w] Jeon KW, Friedlander M [red.] International Review of Cytology 1992: **135**: 155–199.
- [67] KOENIG H, GOLDSTONE A, LU CY. Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* 1983; **305**: 530–534.
- [68] KOMBRINK E, SOMSSICH IE. Defense responses of plants to pathogens. *Adv Bot Res* 1995; **21**: 1–34.
- [69] LEE TT, SKOOG F. Effect of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1965; **18**: 386–402.
- [70] LEON J, SHULAEV V, YALPANI N, LAWTON MA, RASKIN I. Benzoic acid 2-hydroxylate, a soluble oxygenate from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:
- [71] LEWAK S. Hormony roślinne – kierunki badań ostatniego dziesięciolecia. *Kosmos* 1995; **44**: 601–622.
- [72] MALAMY J, CARR JP, KLESSIG DF, RASKIN I. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 1990; **250**: 1002–1004.
- [73] MANDAVA NB. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; **39**: 23–52.
- [74] MANDAVA NB, THOMPSON MJ, YOPP JH. Effect of selected putative inhibitors of RNA and protein synthesis on brassinosteroid-induced growth in mung bean epicotyls. *J Plant Physiol* 1987; **128**: 53–65.
- [75] MARQUARD V, ADAM G. Recent advances in brassinosteroid research. *Chem Plant Prot* 1991; **7**: 103–109.
- [76] MCGURL B, PEARCE G, OROZCO-CARDENAS M, RYAN CA. Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 1992; **255**: 1570–1573.
- [77] MCGURL B, RYAN CA. The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol Biol* 1992; **20**: 405–409.

- [78] MCGURL B, OROZCO-CARDENAS M, PEARCE G, RYAN CA. Overexpression of the prosystemin gene in tomato plants generates a systemin signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9799–9802.
- [79] MÉTRAUX JP, SIGNER H, RYALS J, WARD E, WYSS-BENZ M, GAUDIN J, RASCHDORF K, SCHMID E, BLUM W, INVERARDI B. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 1990; **250**: 1004–1006.
- [80] MEYER A, MIERSCH O, BÜTTNER C, DATHE W, SEMBDNER G. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J Plant Growth Regul* 1984; **3**: 1–8.
- [81] MITCHELL JW, MANDAVA NB, WORLEY JF, PLIMMER JR, SMITH MV. Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 1970; **225**: 1065–1066.
- [82] MONTAGUE MJ, KOPPENBRINK JW, JAWORSKI EG. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota* L. Changes intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol* 1978; **62**: 430–433.
- [83] NARVÁEZ-VÁSQUEZ J, OROZCO-CARDENAS ML, RYAN CA. A sulfhydryl reagent modulates systemic signaling for wound-induced and systemin-induced proteinase inhibitor synthesis. *Plant Physiol* 1994; **105**: 725–730.
- [84] NARVÁEZ-VÁSQUEZ J, PEARCE G, OROZCO-CARDENAS ML, FRANCESCHI VR, RYAN CA. Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* 1995; **195**: 593–600.
- [85] NEUENSCHWANDER U, VERNOOIJ B, FRIEDRICH L, UKNES S, KESSMANN H, RYALS J. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J* 1995; **8**: 227–233.
- [86] NOJIRI H, SUGIMORI M, YAMANE H, NISHIMURA Y, YAMADA A, SHIBUYA N, KODAMA O, MUROFUSHI N, OMORI T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol* 1996; **110**: 387–392.
- [87] OOTA Y. The response of *Lemna gibba* G3 to a single long day in the presence of EDTA. *Plant Cell Physiol* 1972; **13**: 575–580.
- [88] OROZCO-CARDENAS M, MCGURL B, RYAN CA. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8273–8276.
- [89] PARTHIER B. Jasmonates, new regulators of plant growth and development: many facts and few hypothesis on their actions. *Bot Acta* 1991; **104**: 446–454.
- [90] PEARCE G, STRYDOM D, JOHNSON S, RYAN CA. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 1991; **253**: 895–898.
- [91] PEARCE G, JOHNSON S, RYAN CA. Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J Biol Chem* 1993; **268**: 212–216.
- [92] PFOSSER M, KÖNIGSHOFER H, KANDLER R. Free, conjugated, and bound polyamines during the cell cycle of synchronized cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *J Plant Physiol* 1990; **136**: 574–579.
- [93] PIERPOINT WS. Salicylic acid and its derivatives in plants: medicines, metabolites and messenger molecules. *Adv Bot Res* 1994; **20**: 163–233.
- [94] RASKIN I. Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992; **43**: 439–463.
- [95] RASKIN I. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol* 1992; **90**: 799–803.
- [96] RASKIN I, EHMANN A, MELANDER WR, MEEUSE BJD. Salicylic acid – a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 1987; **237**: 1545–1556.
- [97] RASKIN I, TURNER IM, MELANDER WR. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 2214–2218.

- [98] RASKIN I, SKUBATZ H, TANG W, MEEUSE BJD. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Ann Bot* 1990; **66**: 369–373.
- [99] RASMUNSSSEN JB, HAMMERSCHMIDT R, ZOOK MN. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 1991; **97**: 1342–1347.
- [100] RHOADS DM, McINTOSH L. Isolation and characterization of cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Souromatum guttatum* (Schott). *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2122–2126.
- [101] RHOADS DM, McINTOSH L. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell* 1992; **4**: 1131–1139.
- [102] RIES S. Triacontanol and its second messenger 9- $\beta$ -L(+)-adenosine as plant growth substances. *Plant Physiol* 1991; **95**: 986–989.
- [103] RIES SK, WERT VF, SWEELEY CC, LEAVITT RA. Triacontanol, a new naturally occurring plant growth regulator. *Science* 1977; **195**: 1339–1341.
- [104] RIES S, WERT V, OLEARY D, NAIR M. 9- $\beta$ -L(+)-adenosine: a new naturally occurring plant growth substance elicited by triacontanol in rice. *Plant Growth Regul* 1990; **9**: 263–273.
- [105] RYALS J, UKNES S, WARD E. Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 1994; **104**: 1109–1112.
- [106] RYAN CA. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 1988; **27**: 8879–8883.
- [107] RYAN CA. Proteinase inhibitor genes in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopath* 1990; **28**: 425–449.
- [108] RYAN CA, FARMER EE. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1991; **42**: 651–674.
- [109] SAKURAI A, FUJIOKA S. The current status of physiology and biochemistry of brassinosteroids. *Plant Growth Regul* 1993; **13**: 147–159.
- [110] SASSE JM. Brassinolide-induced elongation and auxin. *Physiol Plant* 1990; **80**: 401–408.
- [111] SCHALLER A, RYAN CA. Identification of a 50-kDa systemin-binding protein in tomato plasma membranes having kex2p-like properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11802–11806.
- [112] SCHALLER A, RYAN CA. Systemin – a polypeptide defense signal in plants. *BioEssays* 1995; **18**: 27–33.
- [113] SCHILDKNECHT H, SCHUMACHER K. Ein hochwirksamer *leaf movement factor* aus *Acacia karroo*. *Chem Ztg* 1981; **105**: 287.
- [114] SCHUBER F. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem J* 1989; **260**: 1–10.
- [115] SEMBDNER G, PARTHIER B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1993; **44**: 569–589.
- [116] SMITH TA. Polyamines. *Annu Rev Plant Physiol* 1985; **36**: 117–143.
- [117] STASWICK PE. Novel regulation of vegetative storage protein genes. *Plant Cell* 1990; **2**: 1–6.
- [118] STASWICK PE. Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiol* 1992; **99**: 804–807.
- [119] STASWICK PE. Jasmonates, salicylic acid and brassinolides. [w] Davies PJ [red.] *Plant Hormones*. Dordrecht, Boston, London. Kluwer Academic Publisher 1995:179–187.
- [120] STRONG FE, KRUITWAGEN E. Traumatic acid: an accelerator of abscission in cotton explants. *Nature* 1967; **215**: 1380–1381.
- [121] TABOR CW, TABOR H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; **53**: 749–790.
- [122] TRAN THANH VAN K, TOUBART P, COUSSON A. Manipulation of the morfogentic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 1985; **314**: 615–617.
- [123] VERNOOIJ B, FRIEDRICH L, MORSE A, REIST R, KOLDITZ-JAWHAR R, WARD E, UKNES S, KESSMANN H, RYALS J. Salicylic acid is not the translocated signal responsible

- for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 1994; **6**: 959–965.
- [124] VICK BA, ZIMMERMAN DC. Oxidative systems for the modification of fatty acids. [w] Stumpf P, Conn E [red.] *The Biochemistry of Plants, Lipids*. New York: Academic Press 1987; **9**: 53–90.
- [125] WARD ER, UKNES SJ, WILLIAMS SC, DINCHER SS, WIEDERHOLD DL, ALEXANDER DC, AHL-GOY P, MÉTRAUX JP, RYALS JA. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1991; **3**: 1085–1094.
- [126] WARNECK H, SEITZ HU. Inhibition of gibberellic acid-induced elongation-growth of pea epicotyls by xyloglucan oligosaccharides. *J Exp Bot* 1993; **44**: 1105–1109.
- [127] YE XS, AVDIUSHKO SA, KUC J. Effects of polyamines on *in vitro* phosphorylation of soluble and plasma membrane proteins in tobacco, cucumber and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 1994; **97**: 109–118.
- [128] YOSHIKAWA M, KEEN NT, WANG M-C. A receptor on soybean membranes for a fungal elicitor of phytoalexin accumulation. *Plant Physiol* 1983; **73**: 497–506.
- [129] ZIMMERMAN DC, COUDRON CA. Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol* 1979; **63**: 536–541.
- [130] ZUREK DM, CLOUSE SD. Molecular cloning and characterization of brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol* 1994; **104**: 161–170.
- [131] ZUREK DM, RAYLE DL, McMORRIS TC, CLOUSE SD. Investigation of gene expression, growth kinetics, and wall extensibility during brassinosteroid-regulated stem elongation. *Plant Physiol* 1994; **104**: 505–513.

*Redaktor prowadzący: Maria Olszewska*

*Otrzymano: 30.08.1996 r.*

*Przyjęto: 14.11.1996 r.*

*Adres autora: Zakład Biochemii UMK  
87-100 Toruń, ul. Gagarina 9*

## WYBRANE ZAGADNIENIA Z FIZJOLOGII I PATOLOGII KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA\*

### SOME ASPECTS OF ENDOTHELIAL CELL PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

Koryna SOCHA

Akademia Medyczna w Warszawie, II Wydział Lekarski – studentka V roku

*Streszczenie:* Ten przegląd piśmiennictwa dotyczącego fizjologii i patologii śródbłonka jest oparty głównie na danych z ostatniej dekady. Opisano funkcje śródbłonka w angiogenezie, krzepnięciu, interakcjach z płytkami, zapaleniu i odpowiedzi immunologicznej, regulacji napięcia ściany naczyniowej oraz aktywność metaboliczną. Znaczenie tych zagadnień w medycynie klinicznej jest również omówione.

*Słowa kluczowe:* śródbłonek, naczynia krwionośne, ultrastruktura, fizjologia, patofizjologia.

*Summary:* This review of the biology of endothelium is based mainly on data available within the last decade. The functions described refer to angiogenesis, coagulation, EC-platelet interaction, inflammation and immune response, vascular tone regulation and metabolic activities. Implications for the clinical medicine are discussed.

*Key words:* endothelium, blood vessels, ultrastructure, physiology, pathophysiology.

*Wykaz stosowanych skrótów:* **ACE** (*Angiotensin Converting Enzyme*) – enzym konwertujący angiotensynę; **Ach** – acetylocholina; **ADH** – wazopresyna; **Ang II** – angiotensyna II; **ANP** (*Atrial Natriuretic Peptide*) – przedsionkowy peptyd natriuretyczny; **ARDS** (*Adult Respiratory Distress Syndrom*) – zespół niewydolności oddechowej dorosłych; **chAT** – acetylocholinestaza; **CDAI** (*Cartilago Derived Angiogenesis Inhibitor*) – związany z chrząstką inhibitor angiogenezy; **EC** (*Endothelial Cell*) – komórka śródbłoka, śródbłonek; **ECGF** (*Endothelial Cell Growth Factor*) – czynnik wzrostu komórek śródbłoka; **ECDGF** (*Endothelial Cell Derived Growth Factor*) – czynnik wzrostu związany z komórkami śródbłoka; **EDCF** (*Endothelium Derived Contracting Factor*) – śródbłonkowy czynnik kurczący; **EDHF** (*Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor*) – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący; **EDRF** (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) – śródbłonkowy czynnik rozkurczowy; **ELAM** (*En-*

\*Praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Zbigniewa Gawlika z Zakładu Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej w Warszawie.



*dothelial-Leukocyte Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonka; selektyna E; **ET-1** – endotelina 1; **FGF** (*Fibroblast Growth Factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; **FGFR** (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) – receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów; **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; **Hi** – histamina; **HEV** (*High Endothelial Venule*) – żyłka z wysokim śródbłonkiem; **5-HT** – 5-hydrokсыtryptamina, serotonina; **ICAM** (*Intracellular Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; **Il** – interleukina; **INF** – interferon; **LDL** (*Low Density Lipoprotein*) – lipoproteina małej gęstości; **LFA** (*Lymphocyte Function Associated Antigen*) – antygen związany z czynnością limfocytów; **M-CSF** (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; **MHC** (*Major Histocompatibility Complex*) – główny układ zgodności tkankowej; **NA** – noradrenalina; **N-CAM** (*Neural Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórek nerwowych; **NO** (*Nitric Oxide*) – tlenek azotu; **NOS** – syntetaza tlenku azotu; **PAF** (*Platelets Activating Factor*) – czynnik aktywujący płytki; **PAI-1** (*Fast Acting Urokinase-Type Plasminogen Activator Inhibitor*) – inhibitor regulujący natychmiast z u-PA; **PAI-2** (*Fast Acting Tissue-Type Plasminogen Activator Inhibitor*) – inhibitor regulujący natychmiast z t-PA; **PECAM**; **CD31** (*Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji płytek do śródbłonka; **PDGF** (*Platelet Derived Growth Factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu; **PG** – prostaglandyna (np. PGE<sub>1</sub>); **PGI<sub>2</sub>** – prostacyklina; **RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów; **s-s** (*shear-stress*) – stres przepływowy; **SP** – substancja P; **TAF** (*Tumor Angiogenesis Factor*) – nowotworowy czynnik angiogenetyczny; **TGF** (*Transforming Growth Factor*) – transformujący czynnik wzrostu; **TNF** (*Tumor Necrosing Factor*) – czynnik martwicy guza; **TxA<sub>2</sub>** – tromboksan A<sub>2</sub>; **t-PA** (*Tissue Type Plasminogen Activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu; **u-PA** (*Urokinase Type Plasminogen Activator*) – aktywator plazminogenu typu urokinazy; **VCAM** (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń; **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) – naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka; **VEGFR** – receptor dla VEGF; **vWF** (*von Willebrand Factor*) – czynnik von Willebranda.

Badacze w ostatnich latach ustalili, że układ sercowo-naczyniowy wykazuje własną, złożoną czynność hormonalną; stwierdzono również, że komórki śródbłonka (ECs), wyściełające wewnętrzną powierzchnię ściany naczyń, odznaczają się niezwykle bogatą aktywnością biologiczną [34]. Standardowa koncepcja fizjologii komórki śródbłonka (EC) panująca kilkadziesiąt lat była prosta i wygodna, uwzględniała ona jedynie jej "mechaniczną" rolę ochronną oraz udział w transporcie przez ścianę naczynia. Dopiero odkrycia lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych, gdy poznano ultrastrukturę EC, jej interakcje z komórkami krwi, gdy zaczęła się rozwijać technika umożliwiająca hodowlę ECs, pozwoliły na zrozumienie niezwykle istotnej roli, jaką odgrywa w organizmie ta komórka [19].

ECs to jednojądrzaste elementy o kształcie wielokątnym lub wydłużonym, o szerokości od ok. 10 do 15 μm i długości 25 do 50 μm [45]. Oś długa komórki ułożona jest równolegle do kierunku przepływu krwi w naczyniu. Komórki te wykazują też zróżnicowanie pod względem wielkości w różnych naczyniach, np. ECs w tętnicy płucnej są krótsze niż w tętnicy udowej czy aorcie [90]. Błona komórkowa pokryta jest mikrokosmkami i ma zdolność tworzenia lamelopodiów [14]. Oprócz typowych organeli komórki te zawierają charakterystyczne struktury cytoplazmatyczne – ciała Weibel-Palade'a, związane z sekrecją czynnika von Willebranda (vWF) [19; 45; 71; 90]. W EC występują pęcherzyki pinocytarne transportujące substancje na potrzeby własne oraz duże pęcherzyki fagocytarne.

Na transport substancji przez ścianę naczyń wpływają typy połączeń między ECs. Do tej pory opisano następujące typy połączeń między ECs: strefy zamykające (*zonulae occludentes, fascia occludens*), połączenia typu *nexus (gap junction)*, strefy przylegania (*zonulae adherentes*), syndesmomy (*complexus adherentes*). Ich lokalizacja jest zależna od typu i funkcji pełnionej przez dane naczynie [17]. Innym elementem warunkującym niektóre mechanizmy transportu są okienka (*fenestrae*) zamknięte przeponą lub otwarte [17]. Przepuszczalność EC jest regulowana przez szereg czynników m.in.: hipoksję, adenozyne, trombinę, prostaglandyny, kininy, histaminę (Hi), przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP), naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna (VEGF) i inne [11].

Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym wyróżniono trzy zasadnicze typy ECs, a tym samym włóściczek [45; 71]:

1) bezokienkowe – występujące w mięśniach, ośrodkowym układzie nerwowym jako element bariery krew - mózg oraz siatkówce, grasicy i gruczołach płciowych,

2) okienkowe:

a) z okienkami otwartymi, np. w kłębuszku nerkowym,

b) zamkniętymi przeponą – w gruczołach dokrewnych, kosmkach jelitowych, ciałku rzęskowym i splocie naczyńkowym,

3) nieciągłe – ich cechą oprócz okienek jest obecność niepełnej błony podstawnej, występują jako naczynia zatokowe w wątrobie, szpiku i śledzionie.

ECs tworzą ciągłą warstwę układającą się w podłużne fałdy. Komórki układają się wyboisto wzdłuż tych fałdów i spoczywają na błonie podstawnej zbudowanej ze składników produkowanych przez ECs, tj: kolagenu typu IV, V oraz glikoprotein: fibronektyny i lamininy [19; 42]. Różnorodność ECs związana jest nie tylko z cechami morfologicznymi, funkcjonalnymi, ale też ich antygenowością i charakterystyką biochemiczną. Oprócz odrębności w ekspresji antygenów głównego układu zgodności tkankowej (MHC) ECs różnią się między sobą receptorami powierzchniowymi, syntezą cytokin, aktywnością enzymów. Tę różnorodność wykazano nie tylko pomiędzy naczyniami, ale nawet i w obrębie tego samego naczynia [19; 71]. ECs dużych naczyń w odróżnieniu od ECs włóściczek nie biorą udziału w procesie neowaskularyzacji, wymianie tlenu i substancji odżywczych. Na poziomie molekularnym ECs tych naczyń różnią się obecnością receptorów dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR), których ekspresję wykazano na powierzchni ECs dużych naczyń [71]. Badania immunohistochemiczne na poziomie ultrastrukturalnym pozwoliły na zróżnicowanie lokalizacji acetylocholinesterazy (chAT), substancji P (SP), serotoniny (5-HT), wazopresyny, angiotensyny II (Ang II) w różnych subpopulacjach ECs [71; 90].

Do substancji wykorzystywanych w celu identyfikacji EC należą vWF i enzym konwertujący angiotensynę (ACE) [71; 90]. Innymi cząsteczkami o takim zastosowaniu są receptory dla naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (VEGFR-1, VEGFR-2), VE-kadheryna, cząstka adhezyjna PECAM-1 (CD31) [71; 77; 93],

P-selektyny i CD34, endogлина [12], taką substancją może też być E-LAM (cząsteczka adhezji leukocytów do EC) – receptor zasiedlania, swoisty tylko dla aktywowanych ECs. Największa ekspresja VEGFR ma miejsce w trakcie rozwoju embrionalnego. Stosuje się też ocenę wychwytu acetylowanych LDL. Wychwyt acetylowanych LDL jest mniejszy w mózgu, natomiast wyższy w wątrobie [3; 19; 41; 71; 90]. Inne cząsteczki swoiste dla EC, które mogą znaleźć zastosowanie jako markery EC, są dotychczas zidentyfikowane tylko przez przeciwciała (np.: QH1) lub geny (np. *tie-1*, *tie-2/tek*) [3; 71; 76]. Jedną z głównych trudności napotykaną w trakcie procesu identyfikacji i różnicowania ECs na podstawie znanych markerów jest utrata narządowo swoistych substancji przez ECs w czasie analizy *in vitro* [3].

## ANGIOGENEZA, NOWOTWORZENIE, ZAPALENIE

Układ krążenia zaczyna się wykształcać (pod koniec 3 tygodnia życia płodowego) z grupy komórek pochodzenia mezenchymalnego, zwanych angioblastami [45; 71]. Ten proces określany jest jako naczyńotworzenie. Natomiast angiogeneza jest definiowana jako formowanie nowych naczyń w życiu pozapłodowym [19; 71]. Angiogeneza odgrywa rolę w wielu procesach fizjologicznych, np. w cyklicznych zmianach unaczynienia *endometrium*, w naprawie naczyń, a także patologicznych np. w nowotworach czy w przebiegu zapaleń.

Pod wpływem czynników angiogenetycznych ECs zaczynają się dzielić mitotycznie i układać pod kątem do osi długiej naczynia; powstaje cewka zbudowana z EC przekształcająca się w nowe naczynie włosowate. To formowanie sieci mikronaczyń trwa do momentu, kiedy będą one mogły pełnić swoją funkcję; wówczas pod wpływem tych samych lub innych bodźców nowe naczynie jest przemodelowywane. Kiedy czynnik prowadzący do pobudzenia angiogenezy przestaje działać, angiogeneza zatrzymuje się, a nawet cofa i w końcu nowo utworzone naczynie znika [19; 71].

Ten wysoce zorganizowany proces jest regulowany przez agonistów i antagonistów angiogenezy. Wiele tkanek ma aktywność angiogenetyczną; została ona wykazana dla mózgu ssaków (zwłaszcza dla podwzgórza, szyszynki), siatkówki oraz jajnika, jąder, ślinianek, maziówki stawów i wątroby. Podobną aktywność angiogenetyczną wykazują także niektóre komórki, np. adipocyty, komórki naskórka, makrofagi i limfocyty T; komórki tuczne stymulują migrację EC [19].

Różnicowanie EC i angiogenezę indukują substancje z grupy czynników wzrostu fibroblastów (FGF) [27; 64]. Uwalnianiu FGF-1 (aFGF) sprzyja zmiana temperatury i inne rodzaje stresu [21]. Prawdopodobnie na uwalnianie i aktywację aFGF może też wpływać hipoksja, podobnie jak w przypadku VEGF [2, 21]. Aktywność FGF jest m.in. regulowana przez rozpuszczalne formy FGFR [27]. Pierwszą cząsteczką,

której ekspresję wykazano na komórkach różnicujących się w kierunku angioblastów, jest receptor dla naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna VEGFR-2 (flk-1, KDR). Receptor ten jest specyficzny dla EC. VEGFR-1 (flt-1) również jest jedną z najbardziej swoistych dla EC substancji. Ligandem VEGFR jest VEGF – regulator przepuszczalności EC i czynnik wzrostu wykazujący działanie synergistyczne z FGF. Obecność VEGF jest niezbędna dla podtrzymania procesu naczyńotworzenia i angiogenezy [2; 52; 64; 72; 98]. Innymi dobrze poznanymi czynnikami wzrostu pobudzającymi EC są substancje wyizolowane ze szczurzego *chondrosarcoma*, guza Walker 265 i ludzkich nowotworów, takich jak *melanoma*, *hepatoma*. Są to: transformujący czynnik wzrostu  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) i prostaglandyny (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>). Angiogenezę pobudza też fibryna oraz heparyna przyczyniająca się tylko do migracji komórek EC. Również fibronektyna i jej receptory oraz receptor dla witronektyny ( $\alpha_v\beta_3$ ) biorą udział w angiogenezie [8; 71].

Migrujące EC mają zmieniony fenotyp [3]. Oprócz ekspresji wyżej omówionych receptorów, w czasie angiogenezy zaobserwowano też zmianę ekspresji receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) na ECs. Ekspresja receptora PDGF jest regulowana przez prozapalne substancje, tj. TGF $\beta$ , trombinę i inne powodujące wzrost produkcji cAMP. Wydaje się, że PDGF odgrywa rolę w angiogenezie naczyń nowotworów i unaczynieniu maziówki stawów w przebiegu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) [50]. W czasie angiogenezy istnieje korelacja wydzielania przez EC urokinazy, receptora dla urokinazy oraz inhibitora reagującego natychmiast z tkankowym aktywatorem urokinazy (PAI-1) w otaczających tkankach z aktywnością proteolityczną EC warunkującą migrację komórek. Na aktywność proteolityczną EC wpływają też bFGF i VEGF zwiększające ekspresję genów dla urokinazy i jej receptora [4; 5; 63; 96]. Zmiana ekspresji receptorów, będąca świadectwem plastyczności fenotypowej ECs mikrokrążenia jest prawdopodobnie regulowana także przez składniki zrębu. Odpowiedni skład zrębu jest również konieczny dla wykształcenia niektórych cech morfologicznych tworzących się naczyń, np. formowanie cew naczyniowych wymaga obecności macierzy zbudowanej z kolagenu IV, V i lamininy [19; 64; 95]. Innymi substancjami regulującymi tworzenie naczyń są E-selektyny i endogлина biorące udział w tworzeniu światła naczynia i pośredniczące w działaniu TGF $\beta$  oraz VE-kadheryna, której obecność jest wymagana dla zachowania polarności EC, a także inne kadheryny, PECAM (CD31; cząsteczka adhezji płytek do EC), integryny (np.  $\beta_1$  integryna) i inne [17; 71].

Mechanizm zaniku naczyń i hamowania angiogenezy jest nieznan. Brak czynników wzrostu lub ich receptorów to najprostsza z możliwości, ale w tym skomplikowanym procesie bierze też udział szereg innych czynników. Zanikowi naczyń sprzyja brak perfuzji włośniczek. Innym mechanizmem może być brak substancji niezbędnych dla przeżycia komórki lub włączenie genetycznego programu śmierci komórki (apoptoza) [71]. Znanymi inhibitorami angiogenezy są CDAI (związany z chrząstką inhibitor angiogenezy), trombospondyna, kortykosteroidy, protamina,

inne aktywatory kinazy C uwalniane z płytek, interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), TGF $\beta$  [9; 18; 19; 20; 71; 96]. Znaczenie czynnika martwicy guza  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) jest dyskusyjne. TNF $\alpha$  hamuje proliferację ECs *in vitro*, natomiast *in vivo* działa jak czynnik angiogenetyczny [19]. W badaniach *in vitro* właściwości antyangiogenne wykazano dla heparyny, suraminy, syntetycznych steroidów – U-24067 i U-42129, INF $\alpha$ 2a, kwasu retinowego i innych substancji hamujących angiogenezę poprzez inhibicję proteaz i modulację aktywności układu fibrynolitycznego [18; 20; 63; 96].

EC odgrywa szczególną rolę w progresji nowotworów i tworzeniu przerzutów [19]. Indukowana przez nowotwór angiogeneza wymaga aktywacji EC. Proteoliza macierzy zewnątrzkomórkowej umożliwia migrację ECs w kierunku guza, gdzie mogą proliferować i tworzyć sieć naczyń zaopatrujących nowotwór w tlen, niezbędne składniki odżywcze i usuwających produkty przemiany materii. W komórkach nowotworu następuje aktywacja niektórych genów i wydzielanie tak zwanego nowotworowego czynnika angiogenetycznego (TAF) [6]. Charakter TAF nie jest jeszcze dokładnie poznany, branych jest pod uwagę kilka zidentyfikowanych i niezidentyfikowanych substancji. Do czynników regulujących angiogenezę wytwarzanych przez guz należą czynniki wzrostu z grupy FGF, TGF oraz VEGF, PDGF i angiostatyna [6; 20; 67; 96].

Oprócz unaczynienia nowotworu ECs mogą być zaangażowane w tworzenie przerzutów. Zwiększenie syntezy enzymów degradujących blaszkę podstawną, na której leżą ECs (proteazy, heparanazy, sulfatazy), ułatwia migrację komórek nowotworu [5]. Istnieje hipoteza, że uszkodzenie ECs może zwiększać zdolność przerzutową guza. Prawdopodobnie komórki nowotworowe łatwiej przekraczają barierę ściany naczynia i ECs w miejscach ich uszkodzenia. Formowanie agregatów fibryny i płytek, zwłaszcza u starszych osób, również przyczynia się do uszkodzenia lub/i zmniejszenia efektywności naprawy EC. Jeśli te przypuszczenia są prawdziwe, to starsi osobnicy są narażeni na większe ryzyko przerzutów. Poza tym syntetyzowana przez ECs cytokina zwana endoteliną 1 (ET-1) również przyspiesza proces nowotworzenia [53].

Niektóre badania potwierdzają, że krążące komórki guza mogą rozróżniać i wykazywać powinowactwo do tkankowo czy narządowo specyficznych antygenów ECs. Na powierzchni komórek nowotworu zlokalizowane są cząstki adhezyjne, tj. integryny  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 i  $\alpha$ L $\beta$ 2 oraz PECAM-1, ICAM-1 (cząsteczka adhezji międzykomórkowej), N-CAM (cząsteczka adhezji komórek nerwowych), których ligandy znajdują się na ECs i elementach macierzy międzykomórkowej [17; 85].

Istotny jest też fakt, że same naczynia, a więc i EC, mogą stać się przedmiotem nowotworzenia [75].

Aby zrozumiałym stał się udział ECs w procesach zapalnych, należy pamiętać, że są one silnie immunogenne i np. w przypadku przeszczepów narządowych są pierwszym źródłem antygenów i pierwszym celem ataku przeciwciał uczulonego

biorcy [32]. Duża immunogenność związana jest z obecnością na powierzchni EC [19; 32]:

- antygenów transplantacyjnych,
- antygenów swoistych dla EC,
- antygenów grupowych krwi i innych.

Ponadto EC ma zdolność wiązania antygenów i ich prezentacji limfocytom T. Szczególne znaczenie w regulacji układu immunologicznego ma odmiana ECs wyściełających część naczyń pozawłośniczkowych – żyłki z wysokim śródbłonkiem (HEV; *high endothelial venule*). Naczynia tego typu występują w obwodowych narządach limfatycznych, węzłach chłonnych, tkance limfatycznej przewodu pokarmowego, migdałkach, brak ich natomiast w śledzionie. Ponadto HEV występują w tkankach nielimfatycznych objętych przewlekłym procesem zapalnym [25; 32; 45; 71]. Komórki HEV mają niemal sześcienny kształt w odróżnieniu od ECs wyściełających inne naczynia. Na poziomie ultrastrukturalnym HEV cechuje rozbudowany aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna szorstka, co wskazuje na intensywną aktywność metaboliczną tych komórek, nie obserwowaną w przypadku typowych ECs. Komórki te zawierają liczne wakuole, pęcherzyki i ciała Weibel-Palade związane z funkcją sekrecyjną HEV. Charakterystyczną cechą jest obecność dużej liczby leukocytów w ścianie HEV. Powierzchnia HEV pokryta jest przez glikokaliks. Fenotyp HEV jest zmienny i zależy od lokalnych czynników, cytokin generowanych przez tkankę limfatyczną lub w przebiegu zapalenia oraz składników macierzy międzykomórkowej [25]. W trakcie lokalnie rozwijającej się przewlekłej odpowiedzi immunologicznej żyłki pozawłośniczkowe mogą przekształcić się w żyłki z wysokim śródbłonkiem, co obserwuje się np. w maziówce (przy istniejącym stanie zapalnym stawów).

Interakcja leukocytów z ECs zależy od obecności na powierzchni tych komórek swoistych receptorów. Częsteczki obecne na powierzchni limfocytów nazwano receptorami zasiedlania, a występujące na powierzchni naczyń (głównie HEV) adresynami naczyniowymi. Limfocyty przechodzą zarówno pomiędzy ECs, jak i przez cytoplazmę EC (transport transkomórkowy) [32].

Na powierzchni EC występują adresyny [19; 32; 41; 49; 60]:

- ICAM-1 – jej ekspresja wzrasta w trakcie lokalnej reakcji immunologicznej; jest indukowana przez interleukinę 1 (IL-1),  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\beta$  oraz  $\text{INF}\lambda$ ;
- ICAM-2, której ekspresja nie zależy od cytokin;
- VCAM-1 (częsteczka adhezji komórkowej naczyń); ELAM-1 (selektyna E) to markery aktywacji EC, ich ekspresja poprzedza formowanie nacieku zapalnego.

Wstępem do ścisłej adhezji i przejścia leukocytów przez ścianę naczyń jest coraz wolniejsze „toczenie się” po powierzchni EC. W procesie tym uczestniczy selektyna-L, która rozpoznaje receptory na powierzchni EC: GlyCAM-1, CD34 i MAdCAM-1 [73; 87]. Integryna  $\alpha 4\beta 7$  również może pośredniczyć w procesie rozpoznawania HEV przez limfocyty. Jej receptorem jest MAdCAM-1. Inną parą

cząsteczek adhezyjnych jest integryna  $\alpha 4\beta 1$  i VCAM-1. W procesie przytrzymania leukocytów przez HEV istotną rolę odgrywają także integryna LFA-1 ( $\alpha 1\beta 1$ ) i jej śródbłonkowe receptory ICAM-1, ICAM-2. W procesie adhezji monocytów do powierzchni EC bierze też udział integryna  $\alpha v\beta 3$  (receptor dla witronektyny), której ligandem jest CD31/PECAM-1, wraz z selektyną-P i PAF [25; 32; 56; 66; 87]. Ekspresja genów dla E-selektyny, VCAM-1 i ICAM-1 jest zwiększona w tkankach zmienionych zapalnie, co wskazuje na to, że w czasie zapalenia leukocyty uwalniają cytokiny wpływające na transkrypcję tych genów [25; 32; 87]. W aktywacji genów dla E-selektyny, VCAM-1, ICAM-1 istotną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B. Zastosowanie inhibitorów proteolizy podjednostki I $\kappa$ B $\alpha$ , której degradacja jest konieczna dla aktywacji NF- $\kappa$ B, hamuje ekspresję tych trzech genów nie wpływając na inne, nie regulowane przez ten czynnik geny EC. Inhibicja aktywacji czynników transkrypcyjnych stanowi jedną z wielu możliwości farmakologicznej lub immunologicznej modulacji ekspresji substancji związanych z sekwestracją leukocytów [13]. W procesie przylegania limfocytów i ich migracji prawdopodobnie bierze udział glikokaliks HEV. Glikokaliks nie tylko utrzymuje wydzieloną przez EC GlyCAM-1, ale również unieruchamia rozpuszczalne czynniki zwiększające przyleganie leukocytów do HEV w miejscu toczącej się reakcji zapalnej. Glikokaliks zatrzymuje też białka wydzielane przez HEV, tj. lamininę, fibronektynę oraz ich receptory – integryny VLA-5 ( $\alpha 5\beta 1$ ) i VLA-6 ( $\alpha 6\beta 1$ ). Integryny podrodziny  $\beta 1$  wiążą też inne białka macierzy międzykomórkowej m.in. kolagen i witronektynę [25; 32; 56; 66]. Czynnikiem modulującym przyleganie i migrację leukocytów przez ECs może też być hevin – wydzielany przez HEV związek homologiczny ze SPARC (modulator adhezji macierzy zewnątrzkomórkowej) [25].

Aktywacja leukocytów i ECs oraz zwiększenie ekspresji cząstek adhezyjnych wiąże się z pojawieniem się lub zmianą poziomu aktywnych form integryn i selektyn we krwi. Ich rola nie jest jeszcze poznana. Być może zapobiegają one przyleganiu leukocytów do ECs w miejscach objętych podostrym stanem zapalnym, prawdopodobnie biorą udział w patogenezie niektórych chorób, a także mogą być ich markerami. Wysoki poziom rozpuszczalnych form selektyny-L stwierdzono u pacjentów z AIDS i białaczką, natomiast obniżony u chorych na ARDS (zespół ostrej niewydolności oddechowej dorosłych) [13; 23; 87]. Poziom selektyny-P w surowicy jest niższy niż selektyny-L. Zwiększenie poziomu selektyny-E (sELAM-1) występuje w wielu chorobach zapalnych m.in.: twardzinie, toczeniu układowym, zapaleniu naczyń, chorobie Gravesa-Basedowa [16; 23; 87]. Podwyższony poziom krążących form ICAM-1 - sICAM-1 wykazano u pacjentów z twardziną, toczeniem rumieniowatym, cukrzycą typu I, chorobą Gravesa-Basedowa powikłaną oftalmopatią, ziarniniakiem Wegenera, nadciśnieniem samoistnym. Wysoki poziom sICAM-1 wpływa na zwiększenie adhezji makrofagów do fibroblastów i może być użytecznym markerem aktywacji EC i fibroblastów [16; 74; 81; 83].

Pobudzenie ECs powoduje ekspresję na nich nie tylko adresyn, ale także syntezę i uwalnianie mediatorów stanu zapalnego: inhibitora reagującego natychmiast z tkankowym aktywatorem plazminogenu (PAI-2), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), czynnika aktywującego płytki krwi (PAF), czynnika wzrostu związanego ze śródbłonkiem (ECDGF), PDGF, IL-1, śródbłonkowego czynnika rozkurczowego (EDRF), PGE<sub>1</sub>, tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), u-PA, PAI-1, antytrombiny, tromboplastyny tkankowej, czynników krzepnięcia V i VIII, vWF [19].

Z odpowiedzią immunologiczną związane są także proteoglikany. Głównym ich przedstawicielem, związanym funkcjonalnie ze EC, jest siarczan heparanu. EC syntetyzuje przynajmniej 5 typów siarczanu heparanu [30].

Syntezę glikozaminoglikanów stymulują cytokiny: IL-1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Zmniejszają syntezę siarczanu heparanu: uszkodzenie mechaniczne, hipoksja, infekcja wirusowa. Wzrost uwalniania siarczanu heparanu z EC spowodowany może być przez [30]:

- uwalnianie heparanaz i proteaz przez aktywowane limfocyty T, płytki krwi, a nawet ECs;
- przyłączenie immunoglobulin (Ig) do ECs oraz aktywację układu dopełniacza, co powoduje uwalnianie już w ciągu 1 godziny 50% związanego z ECs siarczanu heparanu,
- uruchomienie szlaku fosfolipazy C lub fosfolipazy D, których ekspresja ma miejsce w czasie zapalenia.

Jedną z głównych funkcji siarczanu heparanu jest zachowanie integralności EC. Jego utrata powoduje zaburzenia funkcji bariery śródbłonkowej, prowadzi do obrzęku i wysięku, objawów charakterystycznych dla zapalenia. Osłabienie bariery dla migracji komórek krwi przez ścianę naczynia spowodowane zwiększeniem ekspresji heparanaz przyczynia się do zwiększenia transmigracji leukocytów, a nawet wzrostu zdolności nowotworów do przerzutów [5, 30].

Udowodniono eksperymentalnie, że inhibicja nowotworowych heparanaz zmniejsza przerzuty do płuc i hamuje migrację komórek nowotworowych do błony podstawnej. Śródbłonkowy siarczan heparanu z aorty, żyły pępkowej, mikronaczyń wiąże i aktywuje antytrombinę III, która hamuje proces krzepnięcia [5; 19; 30]. Utrata siarczanu heparanu może wspomagać odkładanie się złogów fibryny, zjawisko powszechne i spotykane w stanach zapalnych, uszkodzeniach tkanki np. na tle odrzucania przeszczepu. Antytrombina III bierze też udział w kontroli aktywacji układu dopełniacza. Utrata tej funkcji może powiększyć szkodliwy wpływ komplementu na zajęte naczynia. Siarczan heparanu uczestniczy w wiązaniu zewnątrzkomórkowej dysmutazy nadtlenkowej do powierzchni EC, toteż jego degradacja prawdopodobnie zmniejszy zdolność antyoksydacyjną danego regionu. Ma to szczególne znaczenie w zapaleniu, kiedy aktywowane neutrofile uwalniają rodniki tlenowe, heparanazy, elastazę. Konsekwencją tego procesu może być lokalne wzmocnienie



odpowiedzi z jednoczesnym zwiększeniem wrażliwości tkanek na uszkodzenia spowodowane działaniem utleniaczy [5; 30]. Siarczan heparanu kontroluje dostępność czynników wzrostu, takich jak bFGF i reguluje ekspresję niektórych receptorów dla czynników wzrostu [14; 30].

Tak różnorodne działanie siarczanu heparanu sugeruje, że inhibicja jego uwalniania czy też rozkładu może hamować odpowiedź immunologiczną. Wykazano, że dawki heparyny, wystarczające by zahamować aktywność heparanazową, powstrzymują odrzucanie przeszczepów i manifestację chorób autoimmunizacyjnych. Proces zmieniający zawartość siarczanu heparanu w tkankach może też wpływać na ich zdolności naprawcze [5; 30].

W stanach zapalnych aktywność metaboliczna EC ulega zmianie. Oprócz syntezy i ekspresji wymienionych już substancji komórki te wychwytyują i katabolizują: adenozyne, składową C3a dopełniacza, 5-HT, Hi, czynniki krzepnięcia IX i X, trombinę, antytrombinę III, heparynę i inne. W ten sposób wyraża się ich działanie przeciwzapalne, gdyż katabolizując wyżej wymienione czynniki chronią tkanki przed szkodliwym wpływem mediatorów zapalenia oraz regulują hemostazę.

## UDZIAŁ ŚRÓDBŁONKA W REGULACJI NAPIĘCIA BŁONY MIĘŚNIOWEJ NACZYNIA

Śródbłonek bierze udział w procesach regulacji ciśnienia i przepływu krwi. Wpływa na napięcie mięśniówki naczyń poprzez uwalnianie czynników biorących udział w skurczu i rozkurczu naczyń.

W skurczu mięśni gładkich naczynia pośredniczą produkty cyklooksygenacji, takie jak tromboksan  $A_2$  ( $TxA_2$ ) (w przypadku pobudzenia acetylocholiną) i prostaglandyny  $H_2$  (w przypadku pobudzenia histaminą). Szlak cyklooksygenacji jest również drogą powstawania jonów nadtlenkowych, które mogą powodować skurcz poprzez unieczynnianie NO lub bezpośrednio działając na błonę mięśniową naczyń. Uwalnianie produktów cyklooksygenacji jest większe w żyłach niż w tętnicach [7, 91]. Związki te działają jako śródbłonkowe czynniki zwężające (EDCF) uwalniane z EC przez kwas arachidonowy, jonofor wapniowy (A23187), acetylocholinę (Ach) [7].

Zależny od EC skurcz jest także związany z syntezą 21-aminokwasowego peptydu, cytokiny zwanej endoteliną – ET [7; 53; 91]. Badania Yanagisawy w 1988 r. pozwoliły ustalić istnienie u człowieka 3 endotelin kodowanych przez trzy niezależne geny, z których ECs produkują tylko ET-1 [34; 80; 91; 99]. Stwierdzenie tylko niewielkiej ilości ziarnistości zawierających ET-1 w EC i jej bardzo niskiego poziomu w krążeniu pozwala przypuszczać, że ET nie jest miejscowo magazynowana, ale pod wpływem bodźców dochodzi do jej syntezy i bezpośredniego uwalniania do krwiobiegu [34;

44; 80; 91]. ET można uznać za jeden z najsilniej działających hormonów zwięzających naczyń [53; 91]. Również ET w znaczący sposób zwiększa wrażliwość ściany naczyniowej i potęguje odpowiedź presyjną wywołaną przez noradrenalinę (NA) czy 5-HT [34].

Niektóre naczynia, zwłaszcza tętnice wieńcowe, mózgowie i płucne po nagłym narażeniu na hipoksję gwałtownie się kurczą [7]. Ten uzależniony od EC skurcz spowodowany jest niezidentyfikowaną substancją, która nie jest zależna od cyklooksygenazy. Nie jest to także endotelina. Zjawisko to nasila się w przypadku zmniejszonego uwalniania NO [7].

W 1980 r. Furgott i Zawadzki wykazali, że do rozkurczu błony mięśniowej gładkiej naczynia pod wpływem Ach niezbędne jest zachowanie integralności jego ściany i nienaruszonego śródbłonna [22]. Wykazano, że ECs mogą wytwarzać substancje rozszerzające naczynia [1; 7; 22; 34; 62; 91]. Obecnie wiadomo, że do najsilniej działających związków wytwarzanych przez ECs należy grupa substancji określanych ogólnie jako EDRF oraz odkryta przez Yenea i Gryglewskiego prostacyklina ( $\text{PGI}_2$ ) [7; 22; 44; 62].

EDRF, zidentyfikowany w 1986 roku przez Furchgott i Ignarro jako tlenek azotu (NO), jest rozpuszczalną lipofilną substancją. Uwalniany jest z komórki prawdopodobnie jako nitrozylowany element np. S-nitrocysteina [1; 7; 54; 62]. Relaksacja komórki mięśniowej zależna od NO związana jest ze wzrostem cGMP [79]. Uwalniany NO jest szybko wiązany przez hemoglobinę, przekształcany do jonów  $\text{NO}_3^-$  i eliminowany przez nerki [1]. Ze względu na charakterystyczny układ elementów morfotycznych krwi w świetle naczynia, zanim NO dotrze do zlokalizowanych centralnie erytrocytów, a więc hemoglobiny, zostaje wychwycony przez płytki krwi i wpływa na hemostazę. Wzrost cGMP w płytkach związany jest bowiem ze zmniejszeniem ich zdolności do adhezji i agregacji [1; 40; 44; 91; 100].

Istnieją co najmniej trzy enzymy syntetyzujące NO. Dwie syntetazy konstytutywne zależne od  $\text{Ca}^{2+}$ : śródbłonkowa (eNOS) i neuronalna (nNOS) oraz syntetaza indukowana niezależna od  $\text{Ca}^{2+}$  w mięśniach, hepatocytach i monocytach (iNOS) [1; 40; 84; 91].

Kolejnymi związkami z grupy śródbłonkowych czynników naczyniorozszerzających są  $\text{PGI}_2$ , która działa poprzez zwiększenie poziomu cAMP, powoduje rozkurcz i hamuje agregację płytek oraz czynnik hiperpolaryzujący (EDHF), produkt lipoksygenacji i szlaku cytochromu P-450 [7; 10; 80; 91]. Mechanizmem działania EDHF jest otwarcie kanałów potasowych w komórkach mięśni gładkich [7; 35; 44; 79].

Pośredni udział ECs w regulacji ciśnienia i objętości osocza jest związany z obecnością w nich konwertazy Ang I. ECs naczyń płucnych mogą ponadto unieczynniać Ang II, 5-HT, NA [7; 90].

EC pośredniczy w działaniu szeregu substancji regulujących przepływ krwi. Hormony uczestniczące w zależnej od EC reakcji naczyniowej to NA i inni agoniści

receptora  $\alpha_2$ . Wazopresyna (ADH) uwalnia EDRF przez wpływ na receptor  $V_1$ . Działanie to jest wyraźne w naczyniach mózgowych. ADH może uczestniczyć w redystrybucji krwi do mózgu w sytuacjach, kiedy jest uwalniana w dużych ilościach np. w trakcie hipoksji, krwotoku [7]. Autokoidy powodujące uwolnienie EDRF to histamina działająca poprzez receptor  $H_1$  i bradykinina działająca przez receptor śródbłonkowy należący do grupy  $B_2$  receptorów kininowych. Bradykinina bierze udział w reakcjach związanych z przekrwieniem wielu gruczołów zewnątrzwydzielniczych (np. ślinianek). Neuropeptydy, zwłaszcza SP, mogą przez wpływ na EC uczestniczyć w miejscowym rozszerzaniu naczyń – reakcji charakterystycznej dla antydromowej (odruch aksonalny) stymulacji nerwów czuciowych [7]. Również receptory trombiny są częściowo sprzężone z syntezą NO [37; 88]. Ekspresja mRNA dla ET-1 jest stymulowana przez trombinę, TGF $\beta$ , interleukinę 1 (IL-1), adrenalinę, Ang II, ADH, jonofory wapniowe i estry forbolu [31; 80; 100]. Oprócz wyżej wymienionych substancji działających poprzez EC czynnikiem regulującym jest pulsacyjny stres przepływowy (*shear-stress*; s-s), związany ze strumieniem krwi płynącej przez naczynie [7; 69]. EC ma pewne mechanoreceptory reagujące na zmiany strumienia krwi. Jednym z nich może być przezbłonowy strumień potasowy ( $K^+$ ). Informacja w ten sposób odebrana (poprzez mało jeszcze poznane mechanizmy) powoduje uwalnianie odpowiednich mediatorów. Efektami działania s-s na EC są [19; 28; 33; 38; 39; 44; 48; 55; 58; 69]:

- zmiana kształtu komórki, jej wydłużenie zgodnie z kierunkiem przepływu krwi,
- formowanie filamentów,
- zwiększona przepuszczalność,
- wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywacja prądu potasowego,
- regulacja ekspresji czynników transkrypcyjnych,
- aktywacja kinazy C i jej dalszy udział w regulacji genów dla PDGF i ET-1,
- wzmożona sekrecja PGI $_2$ ,
- synteza histaminy.

Prawdopodobnie wewnątrzkomórkowe mikrotubule mogą brać udział w przekazywaniu sygnałów o zmianach przepływu [55; 69]. Przekazane poprzez cytoszkielet sygnały powodują zwiększenie ekspresji genów dla t-PA, kolagenaz, syntetazy NO (NOS), PDGF-A, TGF $\beta$ , bFGF, t-PA, trombomoduliny, ICAM-1 i innych, a zmniejszenie dla VCAM-1 i ET-1. Jest to kolejna ważna funkcja cytoszkieletu EC poza utrzymywaniem integralności struktury, regulacji migracji, naprawy i przepuszczalności EC [46; 47; 55; 58; 61; 69].

Zmiany cytoszkieletu pod wpływem s-s polegają na wzroście ilości monomerów G-aktyny bez zmiany całkowitej zawartości aktyny. Jest to tzw. reorganizacja mikrofilamentów we włókna naprężeniowe (*stress fibres*), czyli wiązki cienkich aktynowych filamentów zawierających też miozynę, tropomiozynę i aktyninę. Reorganizacja mikrofilamentów stanowiąca rodzaj unikalnej odpowiedzi na zmiany

przepływu krwi ma miejsce w stanach, takich jak: nadciśnienie, miażdżycza oraz obserwuje się ją w przebiegu angiogenezy [14; 4; 55; 97]. Ekspozycja EC na s-s, wskutek tego niszczenie F-aktyny, przemiana i redystrybucja cytoszkieletu, powoduje wzmożoną sekrecję EDRF. Przy działaniu niskiego s-s ( $5 \text{ dyn/cm}^2$ ) ekspresja genu dla ET-1 i uwalnianie ET-1 utrzymują się na podwyższonym poziomie [55]. Zauważono natomiast, że ekspozycja EC na bardzo duży s-s (powyżej  $20 \text{ dyn/cm}^2$ ) powoduje supresję produkcji ET-1. Również indukowany przez s-s NO poprzez cGMP hamuje uwalnianie ET-1 [36; 55; 90]. Zmiany kinetyki przemian i składu filamentów aktynowych mogą stanowić wyjaśnienie różnic w efektach działania dużego i niskiego s-s [55]. Przy działaniu dużego s-s okres półtrwania G-aktyny jest znacznie krótszy niż przy małym, co może stanowić wyjaśnienie mniejszej sekrecji ET-1 w miejscach narażonych na duży stres przepływowy.

Być może zwiększona sekrecja ET-1 pod wpływem powstawania włókien stresowych w miejscach gdzie jest mniejszy s-s ma znaczenie także dla proliferacji mięśni gładkich i migracji miocytów do błony wewnętrznej naczynia, co prowadzi do przerostu i pogrubienia zarówno błony środkowej, jak i wewnętrznej. Istnieją też dowody, że płytki miażdżycowe mają tendencję do tworzenia się w miejscach narażonych na mniejszy s-s [7; 55]. Prawdopodobnie obecność kurczliwych protein (aktyny, miozyny, tropomiozyny,  $\alpha$ -aktyniny), czyli włókien naprężeniowych, w EC odpowiada za zmianę kształtu komórki i zjawisko kurczliwości włóściczek w przebiegu niedotlenienia przy nieobecności unerwienia współczulnego. Włókna naprężeniowe mają również znaczenie w regulacji szerokości przestrzeni międzykomórkowej i formowania szczelin między komórkami w zapaleniu [94].

## ROLA W HEMOSTAZIE

Śródbłonek ma szereg receptorów biorących udział w komunikowaniu się z różnymi komórkami, jednak adhezja ich w warunkach fizjologicznych jest znikoma. Szczególne znaczenie przypisuje się regulacji przylegania płytek [19; 95]. Jeżeli naczynie jest nieuszkodzone, płytki krwi nie przylegają do EC. Dopiero infekcja wirusowa, stymulacja trombiną lub uszkodzenie mechaniczne mogą powodować adhezję płytek do EC i tkanek podśródbłonkowych [44; 95]. Adhezja płytek może być bezpośrednia ale też i pośrednia poprzez wiązanie się z leukocytami, które łączą się z odpowiednimi receptorami na powierzchni EC, co ma szczególne znaczenie dla procesów immunologicznych [95].

Nawet bez adhezji do ECs aktywne płytki mogą wywierać na nie wpływ poprzez różne wazoaktywne substancje uwalniane z ich ziarnistości (ADP, 5-HT,  $\text{TxA}_2$ ). Płytki też pośredniczą w syntezie  $\text{PGI}_2$  poprzez dostarczanie ECs jej prekursorów. Generują też leukotrieny i lipoksynę mogące działać na nieuszkodzone naczynie [95].

NO hamuje funkcje płytek przez zwiększenie poziomu cGMP. Synergistyczne działanie wykazuje PGI<sub>2</sub>, powodująca podwyższenie poziomu cAMP w cytoplazmie płytek [1; 19; 95]. Agoniści uwalniani w trakcie degradacji płytek powodują wzrost wolnego Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie EC, co może przyczyniać się do zwiększonego uwalniania NO i PGI<sub>2</sub>. EC syntetyzuje też t-PA i u-PA, przekształcające plazminogen w aktywną endopeptydazę plazminę, która hamuje agregację płytek oraz powoduje lizę skrzepliny. Aktywne płytki mogą uwalniać PAI-1, który neutralizuje związany z EC t-PA, jak również substancje, które mogą indukować syntezę PAI-1 przez sam EC [10; 95]. Wzrost poziomu PAI-1 związany jest ze zwiększonym ryzykiem powikłań zakrzepowych. Natomiast obniżenie poziomu  $\alpha$ 2 antyplazminy, zmniejszenie aktywności PAI-1 bądź podwyższony poziom t-PA obserwowano u pacjentów z tendencją do krwotoków stanowiących rezultat aktywności hiperfibrinolitycznej [10; 78].

Obroną śródbłonna przed spontaniczną aktywnością prozakrzepową jest również ekspresja na jego powierzchni trombomoduliny, która ma bardzo duże powinowactwo do trombiny. Interakcja między trombiną i trombomoduliną aktywuje naturalny antykoagulant, białko C [19; 95]. Aktywacja białka C kontrolowana jest też przez białko S syntetyzowane przez EC. Śródbłonkowy siarczan heparanu wiąże i aktywuje antytrombinę III. Podobny do niego wpływ na hemostazę wywierają inne cząsteczki z grupy mukopolisacharydów, m.in. siarczan dermatanu, syntetyzowany przez EC [19; 30]. Na powierzchni EC występuje też ADP-aza, która przemienia uwolniony przez płytki ADP do nieaktywnych AMP, adenozyiny i inozyiny. Dodać jednak trzeba, że uwalniane z płytek substancje zwiększają też ekspresję na EC cząstek przylegania (adhezyn) i substancji naczyniozwiązujących. Uwalniane zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i po stymulacji trombiną, histaminą i różnymi cytokinami vWF pośredniczy w adhezji płytek do błony wewnętrznej naczynia. Pacjenci z nadciśnieniem płucnym mają podwyższony poziom krążącego vWF, co sugeruje, że rozciągnięcie naczyń, s-s mogą modulować uwalnianie tej glikoproteiny przez komórki EC i w ten sposób również wpływać na hemostazę [95]. Aktywacja płytek zwiększa w niejasny jeszcze sposób produkcję ET-1. Jej zwiększony poziom zauważono w takich stanach patologicznych, jak miażdżyca, nadciśnienie, niewydolność nerek [34; 53; 80; 95]. Stymulacja EC powoduje też uwalnianie PAF, który indukuje agregację płytek, uwalnianie substancji naczyniokurczących i adhezję płytek do powierzchni EC [95].

Zaburzenie interakcji między komórkami może być przyczyną powstania niektórych poważnych stanów patologicznych, a nawet prowadzić do śmierci organizmu [1].

## ZNACZENIE ŚRÓDBŁONKA W ETIOPATOGENEZIE NIEKTÓRYCH CHORÓB

Przeciętna długość życia EC u dorosłej osoby wynosi około 30 lat. Po tym czasie starzejące się komórki zanikają i są zastępowane przez nowe. Nowe ECs tracą częściowo zdolność uwalniania EDRF w szczególności w odpowiedzi na trombinę, 5-HT, inne substancje uwalniane z płytek i agonistów receptora  $\alpha 2$  [7; 42]. Obszar zregenerowany staje się miejscem, w którym w reakcji na 5-HT występuje nadmierny skurcz naczyń – jedna z wcześniej występujących cech choroby wieńcowej u ludzi [7]. Może to mieć znaczenie w przemijających stanach niedokrwienia, kiedy wzrasta uwalnianie 5-HT przez zagregowane płytki [7; 44; 82]. Również naczynia powstające *de novo* w organizmie są nadwrażliwe na działanie naczynioskurczowe 5-HT [7]. Hipercholesterolemia, długotrwałe narażenie na stres przepływowy razem z innymi czynnikami ryzyka, takimi jak nadciśnienie, palenie papierosów, przyspieszają starzenie się ECs, a tym samym proces jej regeneracji.

Szereg chorób przebiega z zarówno morfologicznym, jak i funkcjonalnym uszkodzeniem ECs. Uszkodzenie ECs powoduje odsłonięcie błony wewnętrznej naczynia. Komórki tworzącego się neoendothelium są wielokątne, ułożone chaotycznie, co ma związek z tym, że mają mniej mikrotubuli, mniejsza też jest ilość fałdów. Odsłonięcie blaszki podstawnej prowadzi do przylegania do niej płytek krwi, wytworzenia skrzeplin przyściennych, co ma szczególne znaczenie w przebiegu miażdżycy i tworzenia płytki miażdżycowej [42]. Małe uszkodzenia śródbłonna mają tendencję do gojenia się, gdy jednak powtarzają się np. wskutek nadciśnienia, hiperlipidemii, może dojść do proliferacji mięśni gładkich stymulowanych przez czynniki wzrostu pochodzące z ECs i krwi, przerostu błony wewnętrznej, tworzenia się depozytów lipidów w ścianie naczynia, ich wapnienia i przylegania płytek krwi [65; 70]. Zaburzenia te są często pogłębione w wyniku współistnienia hipercholesterolemii. Oksydacja lipoprotein małej gęstości (LDL) zachodzi w ścianie naczynia. Zmieniona miażdżycowo tętnica ma zmniejszony poziom antyutleniaczy, wskutek tego LDL pacjentów z miażdżycą są bardziej podatne na oksydację [49; 65]. Obecność utlenionych LDL powoduje stymulację syntezy DNA i ekspresję antygenów układu zgodności tkankowej – HLA-DR, receptorów dla IL-2 i uwalnianie IL-1 z monocytów, stymulację adhezji monocytów do ECs, migrację leukocytów do błony wewnętrznej [29; 59]. Oksydowane LDL indukują proliferację i migrację mięśni gładkich, zaburzają rozkurcz, przyczyniają się do wzrostu produkcji ET-1, a przez zwiększenie agregacji płytek wyzwalają proces krzepnięcia. Wskutek swojej silnej cytotoksyczności mogą też uszkadzać elementy strukturalne naczynia, przyczyniając się w ten sposób do pogłębienia zmian miażdżycowych [1; 29; 44].

Wytwarzający się zakrzep może uwalniać szereg cytokin między innymi czynniki wzrostu: TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PDGF, czynnik wzrostu komórek nabłonka (ECGF), czynnik

stymulujący wzrost kolonii makrofagów (M-CSF), GM-CSF oraz oksydowane LDL. Prowadzi to do pogłębiania się już istniejących zmian [29; 59]. Czynniki te zaburzają fibrynolizę przez indukcję PAI-1 i supresję t-PA [10; 43; 57]. Zniszczenie ECs powoduje przemijające obniżenie poziomu t-PA, a następnie aktywność t-PA i u-PA rośnie zbiegając się w czasie z proliferacją i migracją mięśni gładkich [13; 44]. Wzrost aktywności t-PA i u-PA jest równoważony przez wzmożoną ekspresję PAI-1 w uszkodzonych ECs, mięśniach gładkich lub jego uwalnianie z płytek krwi [10]. Zwiększony poziom PAI-1, zaburzając fibrynolizę, przyczynia się do rozwoju skrzepliny i dalszego niszczenia ściany naczynia. Zwiększoną aktywność PAI-1 stwierdzono u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, jak również u osób z czynnikami ryzyka miażdżycy [26]. Analiza *in situ* blaszki miażdżycowej wykazała wzmożoną ekspresję PAI-1 w ECs, mięśniach gładkich i makrofagach oraz ekspresję czynnika tkankowego, trombiny i witronektyny [10; 78]. Obecne w płytce miażdżycowej t-PA i u-PA biorą udział w jej neowaskularyzacji i przyczyniają się do jej uszkodzenia i tworzenia tętniaków [68].

Również w przebiegu nadciśnienia tętniczego dochodzi do zmian funkcjonowania EC. W nadciśnieniu tętniczym ECs wykazują większą objętość i wpuklają się do światła naczynia. Zwiększona też jest ilość fibryny i komórek w przestrzeni pod błoną wewnętrzną. Również interakcje pomiędzy płytkami, monocytami a ECs są bardziej wyrażone niż u osób normotensyjnych. W zależności od badanego eksperymentalnego modelu nadciśnienia, zmniejszenie reakcji rozkurczowej zależnej od ECs jest spowodowane zmniejszeniem produkcji czynnika naczyniorozszerzającego lub zwiększeniem produkcji śródbłonkowych substancji wazokonstrykcyjnych [7]. W niektórych formach nadciśnienia u ludzi i w cukrzycy EC produkuje EDCF. Ach, która w zdrowym naczyniu wywołuje rozkurcz, tu powoduje uwalnianie EDCF wiążącego się z receptorami dla  $TxA_2$ , który maskuje lub nawet znosi odpowiedź rozkurczową [44; 95]. Obserwuje się też spadek syntezy EDNO. U osób z nadciśnieniem tętniczym wyższy jest także poziom ET-1 działającej presyjnie przez receptor  $ET_A$ . Poza zwiększaniem napięcia mięśni gładkich ET-1 przez swoje właściwości mitogenne może pogłębiać zmiany w ścianie naczynia krwionośnego i potęgować przerost błony mięśniowej [53; 80; 91].

Podwyższony poziom ET-1 może być związany pogorszeniem czynności nerek u niektórych pacjentów z nadciśnieniem, co w konsekwencji prowadzić może do zaburzonego metabolizmu i wydalania tego hormonu oraz zwiększeniem jego syntezy [80]. Należy pamiętać, że w warunkach fizjologicznych zależne od śródbłonkowego receptora  $ET_B$  właściwości rozszerzania naczyń ET-1 mogą odgrywać ważną rolę [7; 51; 53]. U nowo narodzonych zwierząt, u których gen dla ET-1 był uszkodzony, ciśnienie tętnicze jest raczej podwyższone niż obniżone [7].

Poziom ET-1 jest podwyższony w ciężkiej i schyłkowej niewydolności krążenia, rozległym zawale mięśnia sercowego, nieodwracalnym wstrząsie. Nie wyjaśniono jednak, czy podwyższony poziom ET-1 pozostaje w związku przyczynowym z

tymi stanami. Przyпуска się także, że ET-1 może mieć znaczenie patogenetyczne w stanach skurczowych tętnic mózgowych [34; 44; 92].

W cukrzycy zmiany morfologiczne ECs polegają na zwiększaniu ich proliferacji, oznakach migracji ECs do niektórych obszarów włośniczek i ich zarostania. ECs są porowate, obładowane glikogenem, stają się bardziej przepuszczalne dla białek. Sprzyja to pogrubieniu błony podstawnej, które potęgują takie substancje jak osoczowe inhibitory kolagenazy, np.  $\alpha_2$  makroglobulina czy  $\alpha_2$  antytrypsyna, przechodzące z osocza do błony podstawnej i hamujące jej degradację [15; 86]. Ilość krążącego czynnika vWF jest zwiększona, co sprzyja nasileniu adhezji płytek. Kolagen błony podstawnej ulega glikozylacji i tym silniej agreguje płytki. Same płytki syntetyzują więcej  $TxA_2$  w odpowiedzi na ADP, adrenalinę i kolagen. Płytki wykazują podwyższony poziom wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ , podobnie jak w nadciśnieniu czy mocznicy, co powoduje ich zwiększoną mobilizację przy tym samym lub nawet mniejszym poziomie agonistów. Uwalnianie EDRF i  $PGI_2$  w cukrzycy jest zmniejszone [86; 95]. Zaburzenia lipidowe i zmieniony metabolizm insuliny sprzyjają proliferacji mięśni gładkich i pogrubieniu błony wewnętrznej naczyń, co pogłębia zmiany miażdżycowe ściany naczynia i zaburzenia funkcji EC [68].

Interakcje między ECs i innymi komórkami są szczególnie istotne dla rozważania i zrozumienia patogenezы wielu chorób i ich powikłań. EC okazuje się bowiem kluczową w rozwoju wielu zaburzeń w organizmie człowieka.

Ogromna liczba związanych z EC receptorów, ligandów i generowanych w związku z ich działaniem wewnątrzkomórkowych przekaźników umożliwia wykorzystanie ich w terapii i prewencji wielu chorób, w tym przede wszystkim chorób układu krążenia i naczyń.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ÅNGGÅRD E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; **343**: 1199–1206.
- [2] ASAHARA T, BAUTERS C, ZHENG LP, TAKESHITA S, BUNTING S, FERRARA N, SYMES JF, ISNER JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis *in vivo*. *Circulation* 1995; **92** (suppl 9): II365–371.
- [3] AUGUSTIN HG, KOZIAN DH, JOHNSON RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cells phenotypes. *Bioessays* 1994; **16**: 1–6.
- [4] BACHARACH E, ITIN A, KESHET E. *In vivo* patterns of expression of urokinase and its inhibitor pai-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10686–10690.
- [5] BARTLETT MR, UNDERWOOD PA, PARISH CR. Comparative analysis of ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: Evidence for cytokine dependence and detection of novel sulfatase. *Immunol Cell Biol* 1995; **73**: 113–124.
- [6] BIKFALVI A. Significance of angiogenesis in tumor progression and metastasis. *Eur J Cancer* 1995; **31A** (7–8): 1101–1104.
- [7] BOULANGER CM, VANHOUTTE PM. Kluczowa rola śródbłonna w chorobach układu krążenia. Publikacja medyczna SERVIER POLSKA 1994.



- [8] BROOKS PC, CLARK RA, CHERESH DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; **264**: 569–571.
- [9] CANFIELD AE, SCHOR AM. Evidence that tenascin and trombospondin-1 modulate sprouting of endothelial cells. *J Cell Sci* 1995; **108** (pt 2): 797–809.
- [10] CARMELIET P, COLLEN D. Gene targeting and gene transfer studies of the plasminogen/plasmin system: implications in thrombosis, hemostasis, neointima formation, and atherosclerosis. *FASEB J* 1995; **9**: 934–938.
- [11] CAVEDA L, CORADA M, MARTIN-PADURA I, DEL MASCHIO A, BREVIARIO F, LAMPUGNANI MG, DEJANA E. Structural characteristics and functional role of endothelial cell to cell junctions. *Endothelium* 1994; **2**: 1–10.
- [12] CHEIFETZ S, BELLON T, CALES C, VERA S, BARNABEU C, MASSAGUE J, LETARTE M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; **267**: 19027–19030.
- [13] CHEN CC, ROSENBLOOM CL, ANDERSON DC, MANNING AM. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I $\kappa$ B $\alpha$ -phosphorylation. *J Immunol* 1995; **155**: 3538–3545.
- [14] COOMBER BL. Centrosome reorientation in regenerating endothelial monolayers requires bFGF. *J Cell Biochem* 1993; **52**: 289–296.
- [15] CZYŻYK A. Cukrzyca. [w] Orłowski W [red.] Nauka o chorobach wewnętrznych. Wyd. 2, t. 3, Warszawa PZWL 1989: 427–430.
- [16] DE BELLIS A, BIZZARRO A, GATTONI A, ROMANO C, DI MARTINO S, SINISI AA, ABBADESSA S, BALLASTELLA A. Behavior of soluble intercellular adhesion molecule-1 and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 concentrations in patients with Graves disease with or without ophthalmopathy and in patients with toxic adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; **80**: 2118–2121.
- [17] DEJANA E, CORADA M, LAMPUGNANI MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; **9**: 910–918.
- [18] DIAZ-FLORES L, GUTIERREZ R, VARELA HI. Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol* 1994; **9**: 807–843.
- [19] FAJARDO LF. The complexity of endothelial cells. *Am J Clin Pathol* 1989; **92**: 241–250.
- [20] FIDLER IJ, ELLIS LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; **79**: 185–188.
- [21] FRIESEL RE, MACIĄG T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 1995; **9**: 919–925.
- [22] FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of the arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **299**: 373–376.
- [23] GEARING AJ, NEWMAN W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1994; **14**: 506–512.
- [24] GIRARD PR, NEREM RM. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Physiol* 1995; **163**: 179–193.
- [25] GIRARD JP, SPRINGER TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 1995; **16**: 449–457.
- [26] HAMSTEN A, ERIKSSON P. Fibrinolysis and atherosclerosis: an update. *Fibrinolysis* 1994; **8** (suppl 1): 253–262.
- [27] HANNEKEN A, YING W, LING N, BAIRD A. Identification of soluble forms of the fibroblast growth factor receptor in blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 9170–9174.
- [28] HERMAN JM, BRANT AM, WARTY VS, BONACCORSO J, KLEIN EC, KORMOS RL, BOROVETZ HS. Hemodynamics and the vascular endothelial cytoskeleton. *J Cell Biol* 1987; **105**: 291–302.

- [29] HOLVOET P, COLLEN D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J* 1994; **8**: 1279–1284.
- [30] IHRCKE NS, WRENSHALL LE, LINDMAN BJ, PLATT JL. Role of heparan sulphate in immune system - blood vessel interactions. *Immunology Today* 1993; **14**: 500–505.
- [31] IMAI T, HIRATA MY, EMORI T, YANAGISAWA M, MASAKI T, MARUMO F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992; **19**: 753–757.
- [32] JAKÓBISIAK M. Immunologia. PWN Warszawa 1993: 141–146.
- [33] JAMES LJ, HARRISON DG, NEREM RM. Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. *FASEB J* 1995; **9**: 968–973.
- [34] JANUSZEWICZ A, ŁAPIŃSKI M, STYŚ A. Endotelina – nowy hormon presyjny. *Pol Tyg Lek* 1991; T. XLVI: 35–36.
- [35] KOMORI K, LORENZ RR, VANHOUTTE PM. Nitric oxide, acetylcholine, and electrical and mechanical properties of canine arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1988; **255**: H207–H212.
- [36] KOUREMBANAS S, MCQUILLAN LP, LEUNG GK, FALLER DV. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 1993; **92**: 99–104.
- [37] KU DD, ZALESKI JK. Receptor mechanism of thrombin-induced endothelium-dependent and endothelium-independent coronary vasclar effect in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; **22**: 609–616.
- [38] KUCHAN MJ, FRANGES JA. Shear-stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 1993; **264**: H150–H156.
- [39] LAN Q, MERCURIUS KO, DAVIES PF. Stimulation of transcriptional factors NFB and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **201**: 950–956.
- [40] LANGREHR JM, HOFFMAN RA, LANCASTER JR, SIMMONS RL. Nitric oxide – a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 1993; **55**: 1205–1212.
- [41] LEFER AM, WEYRICH AS, BUERKE M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules in ischaemia – reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 1994; **28**: 289–294.
- [42] LIGHT JT, BELLAN JA, -LI CHEN I, LONGENECKER LL, MURPHY WA, COY DH, KADOWITZ PJ, MCNAMARA DB. Angiotensin enhances acetylcholine-induced relaxation and inhibits intimal hyperplasia after vascular injury. *Am J Physiol (Hear Circ Physiol)* 1993; **265**: H1265–H1274.
- [43] LIU AC, LAWN RM. Lipoprotein(a) and atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1994; **46**: 40–44.
- [44] LÜSCHER TF, TANNER FC. Endothelial regulation of vascular tone and growth. *Am J Hypertens* 1993; **6**: 283S–293S.
- [45] MAJEWSKI S. Układ krążenia. [w] Ostrowski K [red.]. Histologia. PZWL Warszawa 1995: 569–580
- [46] MALEK AM, GIBBONS GH, DZAU VJ, IZUMO S. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2013–2021.
- [47] MALEK AM, GREENE AL, IZUMO S. Regulation of endothelin-1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 5999–6003.
- [48] MALEK AM, IZUMO S. Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell (editorial review). *J Hypertension* 1994; **12**: 989–999.
- [49] MARUI N, OFFERMANN MK, SWERLICK R, KUNSCH C, ROSSEN CA, AHMAD M, WAYNE ALEXANDER R, MEDFORD RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)

- gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1866–1874.
- [50] MARX M, PERIMUTTER RA, MADRI JA. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis. *J Clin Invest* 1994; **93**: 131–139.
- [51] McMURDO L, THIEMERMANN C, VANE JR. The endothelin ET<sub>B</sub> receptor agonist, IRL 1620, causes vasodilatation and inhibits *ex vivo* platelet aggregation in the anaesthetised rabbit. *Eur J Pharmacol* 1994; **259**: 51–55.
- [52] MILLAUER B, WIZIGMANN-VOOS S, SCHNÜRCH HI, MARTINEZ R, MØLLER NPH, RISAU W, ULLRICH A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; **72**: 835–846.
- [53] MILLER RC, PELTON JT, HUGGINS JP. Endothelins – from receptors to medicine. *TiPS* 1993; **14**: 54–60.
- [54] MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communications. *Biochem Pharmacol* 1989; **11**: 1709–1715.
- [55] MORITA T, KURIHARA HI, MAEMURA K, YOSHIZUMI M, YAZAKI Y. Disruption of cytoskeletal structures mediates shear stress - induced endothelin-1 gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; **92**: 1706–1712.
- [56] MURPHY JF, BORDET JC, WYLER B, RISSOAN MC, CHOMARAT P, DEFRANCE T, MIOSSEC P, MCGREGOR JL. The vitronectin receptor (alpha v beta 3) is implicated in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in the adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem J* 1994; **304** (Pt2): 537–542.
- [57] NACHMAN RL. Thrombosis and atherogenesis: molecular connections. *Blood* 1992; **79**: 1897–1906.
- [58] NAGEL T, RESNICK N, ATKINSON WJ, FORBES DEWEY C, Jr, GIMBRONE MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; **94**: 885–891.
- [59] NILLSON J. Lipid oxidation, vascular inflammation and coronary atherosclerosis. *Transplant Proc* 1993; **25**: 2063–2064.
- [60] O'BRIEN KD, ALLEN MD, MCDONALD TO, CHAIT A, HARLAN JM, FISHBEIN D, MCCARTY J, FERGUSON M, HUDKINS K, BENJAMIN CD, LOBB R, ALPERS CE. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; **92**: 945–951.
- [61] OHNO M, COOKE JP, DZAU VJ, GIBBONS GH. Fluid shear stress induces endothelial TGFβ1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* 1995; **95**: 1363–1369.
- [62] PALMER RMJ, REES DD, ASTHON DS, MONCADA S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **153**: 1251–1256.
- [63] PEPPER MS, VASSALLI JD, WILKS JW, SCHWEIGERER L, ORCI L, MONTESANO R. Modulation of bovine microvascular endothelial cell proteolytic properties by inhibitors of angiogenesis. *J Cell Biol* 1994; **55**: 419–434.
- [64] PETERS KG, DE VRIES C, WILLIAMS LT. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggest a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 8915–8919.
- [65] PETTERSSON K, BJÖRK HI, BONDJERS G. Endothelium integrity and injury in atherogenesis. *Transplant Proc* 1993; **25**: 2057–2060.
- [66] PIALI L, HAMMEL P, UHEREK C, BACHMANN F, GISLER RH, DUNON D, IMHOF BA. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 1995; **130**: 451–460.

- [67] PLATE KH, BREIER G, RISAU W. Molecular mechanism of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol* 1994; **4**: 207–218.
- [68] REILLY JM, SICARD GA, LUCORE CL. Abnormal expression of plasminogen activators in aneurysmal and occlusive disease. *J Vasc Surg* 1994; **19**: 865–872.
- [69] RESNICK N, GIMBRONE MA, Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995; **9**: 874–882.
- [70] RIDRAY S, HEUDERS D, MICHEL O, PENICAUD L, KTORZA A. Increased SMC proliferation after endothelial injury in hyperinsulinemic obese Zucker rats. *Am J Physiol* 1994; **267**: H1976–H1983.
- [71] RISAU W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; **9**: 926–933.
- [72] ROBERTS WG, PALADE GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995; **108** (Pt 6): 2369–2379.
- [73] ROSEN SD, BERTOZZI CR. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **3**: 701–710.
- [74] ROTHLEIN R, MAINOLFI EA, CZAJKOWSKI M, MARLIN SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991; **147**: 3788–3793.
- [75] ROŻYNEK M. Patologia naczyń. [w:] Groniowski J, Kruś S [red.] Podstawy patomorfologii. PZWL Warszawa 1991: 387–391.
- [76] SATOTN, QIN Y, KOZAK CA, AUDUS KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 9355–9358.
- [77] SCHMIDT D, von-HOCHSTETTER AR. The use of CD31 and collagen IV as vascular markers. A study of 56 Vascular lesions. *Pathol Res Pract* 1995; **191**: 410–414.
- [78] SCHNEIDERMAN J, SAWDEY MS, KEETON MR, BORDIN GM, BERNSTEIN EF, DILLEY RB, LOSKUTOFF DJ. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6998–7002.
- [79] SCHULZ R, TRIGGLE CR. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *TIPS* 1994; **15**: 255–259.
- [80] SEKURAI T, GOTO K. Endothelins – vascular action and clinical implication. *Drugs* 1993; **46**: 795–804.
- [81] SETH R, RAYMOND FD, MAKGOBA MW. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 1991; **338**: 83–84.
- [82] SHIMOKAWA HI, VANHOUTTE PM. Angiographic demonstration of hyperconstriction induced by serotonin and aggregating platelets in porcine coronary arteries with regenerated endothelium. *J Am Coll Cardiol* 1991; **17**: 1197–1202.
- [83] STEGEMAN CA, COHEN TERVAERT JW, HUITEMA MG, DE JONG PE, KALLEMBERG CGM. Serum levels of soluble adhesion molecules intercellular adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1, and E-selectin in patients with Wegeners granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 1228–1235.
- [84] SZABÓ C, WU C-C, MITCHELL JA, GROSS SS, THIEMERMANN C, VANE JR. Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 1993; **73**: 991–999.
- [85] TANG DG, HONN KV. Adhesion molecules and tumor metastasis; an update. *Invasion Metastasis* 1994–1995; **14**: 106–122.
- [86] TATOŃ J. Diabetologia Praktyczna. PZWL Warszawa 1993: 233–331.
- [87] TEDDER TF, STEEBER DA, CHEN A, ENGEL P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; **9**: 866–873.
- [88] TEFAMARIAM B. Thrombin receptor-mediated vascular relaxation differentiated by a receptor antagonist and desensitization. *Am J Physiol* 1994; **267**: H1962–H1967.

- [89] THIEMERMANN C, WU C-C, SZABÓ C, PERRETTI M, VANE JR. Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in rat model of endotoxin shock. *Br J Pharmacol* 1993; **110**: 177–182.
- [90] TOMLINSON A, VAN VLIJMEN HI, LOESCH A, BURNSTOCK G. An immunohistochemical study of endothelial cell heterogeneity in the rat: observations in "en face" Häutchen preparations. *Cell Tissue Res* 1991; **263**: 173–181.
- [91] VANE JR, BOTTING RM. Regulatory mechanisms of the vascular endothelium: an update. *Pol J Pharmacol* 1994; **46**: 499–521.
- [92] VANHOUTTE PM, KATUSIC ZS, SHEPHERD JT. Vasopressin induces endothelium-dependent relaxations of cerebral and coronary, but not of systemic arteries. *J Hypertens* 1984; **2** (suppl.3): 421–422.
- [93] VECCHI A, GARLANDA C, LAMPUGNANI MG, RESNATI M, MATTEUCCI C, STOPPACCIARO A, SCHNÜRCH HI, RISAU W, RUCO L, MANTOVANI A, DEJANA E. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994; **63**: 247–254.
- [94] WARD BJ, MCCARTHY A. Endothelial cell "swelling" in ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 1293–1300.
- [95] WARE JA, HEISTAD DD. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med* 1993; **328**: 628–635.
- [96] WEINSTAT-SASLOW D, STEEG PS. Angiogenesis and colonisation in the tumor metastatic process-basic and applied advances. *FASEB J* 1994; **8**: 401–407.
- [97] WHITE GE, GIMBRONE MA, FUJIWARA K. Factors influencing the expression of stress fibres in vascular endothelial cells *in situ*. *J Cell Biol* 1983; **97**: 416–424.
- [98] YAMAGUCHI TP, DUMONT DJ, CONLON RA, BREITMAN ML, ROSSANT J. Flk-1, an f1t-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial-cell precursors. *Development* 1993; **118**: 489–498.
- [99] YANAGISAWA M, KURIHARA HI, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K, MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; **332**: 411–415.
- [100] YOKOKAWA K, TEHARA HI, KOHNO M, MANDAL AK, YANAGISAWA M, TAKE-DA T. Heparin regulates endothelin production through endothelium-derived nitric oxide in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2080–2085.

Redaktor prowadzący: Jerzy Kawiak

Otrzymano: 05.11.1995 r.

Przyjęto: 18.11.1996 r.

Adres autora:

## CZĄSTECZKI ADHEZYJNE W NOWOTWORACH JELITA GRUBEGO

### ADHESION MOLECULES IN COLORECTAL CANCER

Joanna KITLIŃSKA, Jacek WOJCIEROWSKI

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie

*Streszczenie:* Cząsteczki adhezyjne są białkami powierzchniowymi odpowiedzialnymi za interakcje komórek z substancją międzykomórkową oraz z innymi komórkami, a tym samym za prawidłową architekturę tkanek oraz takie procesy, jak przemieszczanie się komórek w czasie embriogenezy, czy procesów zapalnych. Proces nowotworowy związany jest często z zaburzeniami funkcjonowania cząsteczek adhezyjnych, co może przyczynić się do zaburzenia architektury tkanek i tworzenia przerzutów. Przykładem może być tu rak jelita grubego, w którym wykazano szereg funkcjonalnych i strukturalnych zaburzeń cząstek adhezyjnych (np. E-kadheryn, integryn, antygenów CEA i GA733). Ponadto znane geny zaangażowane w powstawanie tego nowotworu okazały się kodować cząsteczki adhezyjne (DCC) lub białka z nimi oddziałujące (APC).

*Słowa kluczowe:* białka adhezyjne, przerzuty, rak jelita grubego.

*Summary:* Adhesion molecules are cell surface proteins responsible for interactions of cells with one another and with the extracellular matrix and thus for tissue organization, cells migration during embryogenesis or inflammatory processes. The process of tumor growth often involves alternations in function of adhesion molecules which can be connected with destruction of tissue architecture or tumor metastasis. There are a variety of alternations in the function and structure of adhesion molecules (E-cadherins, integrins, CEA, GA733) in colorectal cancer. Moreover known genes often connected with colorectal cancer development appear to encode adhesion molecules (DCC) or proteins interacted with them (APC).

*Key words:* adhesion proteins, metastasis, colorectal cancer.

*Wykaz stosowanych skrótów:* **APC** (*adenomatous polyposis coli*) – gen zaangażowany w rozwój rodzinnej polipowatości jelita grubego, **CEA** – antygen karcinoembrionalny, **DCC** (*deleted in colorectal cancer*) – gen ulegający delecji w nowotworach jelita grubego, **FAK** (*pp 125 focal adhesion kinase*), **ICAM** (*intercellular adhesion molecule*) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna, **NCAM** (*neural cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych, **PSA** – kwas polisialowy, **RGD** – trójpeptyd Arg-Gly-Asp, **SF/HGF** (*scatter factor/hepatocyte growth factor*) – czynnik rozprzestrze-

niania identyczny z czynnikiem wzrostu hepatocytów, **SLe<sup>a</sup>** – sialowana pochodna antygenu *a* układu grupowego Lewis, **SLe<sup>x</sup>** – sialowana pochodna antygenu *x* układu grupowego Lewis, **VCAM** (*vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna komórek naczyniowych, **YIGSR** – pentapeptyd Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg wchodzący w skład łańcucha B1 lamininy.

Z rozwojem nowotworów nieodłącznie związana jest ich inwazyjność i tworzenie przerzutów. Jest to wielostopniowy proces obejmujący:

- oderwanie się komórek od pierwotnej masy guza,
- przejście do sąsiednich tkanek (najczęściej przez błonę podstawną),
- przedostanie się do limfy i krwi, a wraz z nimi do tkanek docelowych,
- przyłączenie się do komórek śródbłonna naczyń i jego penetrację,
- inwazję do tkanek docelowych przez błonę podstawną,
- unaczynianie tworzących się ognisk nowotworowych.

Każdy z tych etapów wymaga specyficznych interakcji komórek nowotworowych między sobą, jak również z otaczającą substancją międzykomórkową oraz komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych. W oddziaływaniach tych pośredniczą specyficzne cząsteczki adhezyjne [2, 28].

## RODZAJE CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH I ICH ROLA W PROGRESJI NOWOTWORU

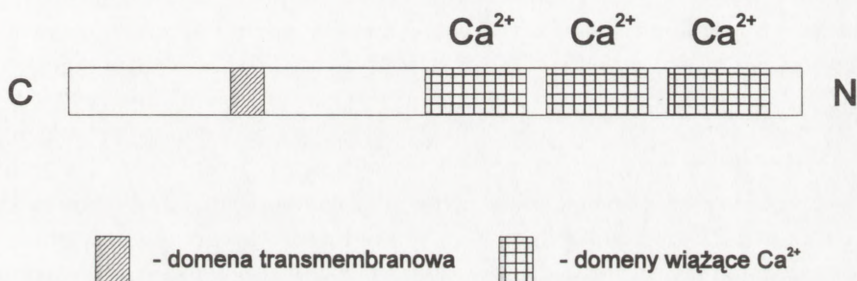
Cząsteczki adhezyjne są powierzchniowymi receptorami pośredniczącymi w interakcjach pomiędzy komórkami oraz komórkami i otaczającą je substancją międzykomórkową [34]. Na podstawie funkcji i budowy podzielono je na cztery główne grupy (tab. 1):

**Kadheryny** – pośredniczą w homotypowych interakcjach międzykomórkowych poprzez oddziaływanie z takimi samymi cząsteczkami leżącymi na komórkach sąsiednich w sposób zależny od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  [2, 34]. Wyróżniono kilka typów kadheryn: N-kadheryny (charakterystyczne dla komórek nerwowych i mięśniowych), P-kadheryny (ulegające ekspresji w łożysku i niektórych typach nabłonków), M-kadheryny (charakterystyczne dla komórek mięśniowych) i E-kadheryny [5]. E-kadheryny ulegają ekspresji już w rozwoju zarodkowym, w stadium blastuli. Biorą one udział w tworzeniu nabłonka endo- i ektodermalnego, zaś utrata ich ekspresji w pewnej grupie komórek prowadzi do powstania mezenchymy [5, 6]. W organizmach dojrziałych ulegają ekspresji w komórkach nabłonkowych pośrednicząc w różnicowaniu i utrzymaniu prawidłowej architektury tych tkanek [5, 28, 34]. E-kadheryny są białkami błonowymi (rys. 1A). Ich domena cytoplazmatyczna oddziałuje z grupą białek zwanych kateninami, łącząc się z  $\beta$  lub  $\gamma$  kateniną. Utworzony kompleks przyłącza następnie  $\alpha$  kateninę, która bezpośrednio wpływa na szkielet komórkowy (rys. 1B) [16, 52]. W nowotworach obserwowany jest często defekt w funkcjo-

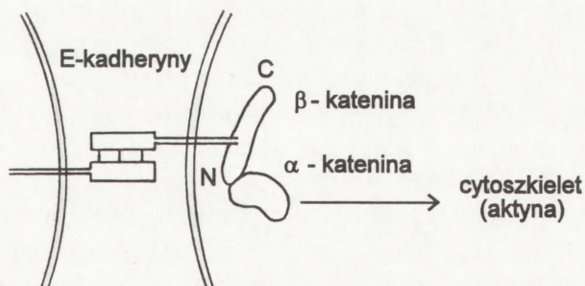
TABELA 1. Główne klasy cząsteczek adhezyjnych

Klasa	Przykłady	Funkcja
Integryny	Heterodimery $\alpha, \beta$	Interakcje pomiędzy komórkami a substancją międzykomórkową
Kadheryny	E – nabłonkowe N – komórek nerwowych P – łożyskowe	Oddziaływania homotypowe pomiędzy komórkami
Selektyny	E, P – śródbłonkowe L - leukocyty	Oddziaływanie z komórkami śródbłonka
Superrodzina immunoglobulin	I-CAM 1 i 2, V-CAM, N-CAM, CEA	Oddziaływania ze śródbłonkiem naczyń oraz homotypowe międzykomórkowe

A



B



Rys. 1. E-kadheryny i ich oddziaływania: A – schemat budowy białka E-kadheryny (wg [28], zmieniony); B – schemat działania E-kadheryn; domeny zewnątrzkomórkowe E-kadheryn oddziałują ze sobą wzajemnie; ich domeny cytoplazmatyczne łączą się z  $\beta$ -kateniną, która swoim końcem  $NH_2$  przyłącza  $\alpha$ -kateninę oddziałującą następnie ze składnikami cytoszkieletu (wg [16], zmieniony)



nowaniu E-kadheryn wywołany brakiem domeny cytoplazmatycznej (brak interakcji z kateninami) lub zewnątrzkomórkowej (brak interakcji z sąsiednimi komórkami przy jednoczesnej akumulacji katenin) oraz zmianami mutacyjnymi. Ponadto produkty niektórych onkogenów destabilizują ich oddziaływania adhezyjne, np. produkt genu *src* fosforyluje  $\beta$  kateniny inaktywując je tym samym. Zaburzenia te prowadzą do oderwania komórek nowotworowych od pierwotnej masy guza, a co za tym idzie zwiększenia ich inwazyjności [5, 6].

**Integryny** – zaangażowane głównie w interakcje pomiędzy komórkami a otaczającą je substancją międzykomórkową, choć niektóre z nich oddziałują także z cząsteczkami adhezyjnymi typu immunoglobulin obecnymi na powierzchni śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych (ICAM, VCAM) [1, 2, 34, 35, 50, 51, 52]. Zbudowane są z dwóch podjednostek –  $\alpha$  i  $\beta$  – związanych niekowalencyjnie. Dotąd znanych jest 14 różnych podjednostek  $\alpha$  i 8  $\beta$  [2, 18, 50, 52]. Odpowiednie ich zestawienie decyduje o specyficzności wiązania integryn z różnymi składnikami substancji międzykomórkowej – fibronektyną, lamininą, kolagenem itp. Są to najczęściej glikoproteiny zawierające charakterystyczne miejsca rozpoznawane przez integryny np. trójpeptyd Arg-Gly-Asp (RGD) [14, 50, 52]. Każda tkanka ma specyficzny zestaw integryn, który w mniejszym lub większym stopniu ulega zmianie w wywodzących się z niej guzach [34]. Wykazano, że domeny cytoplazmatyczne integryn za pomocą taliny i innych białek oddziałują z systemem filamentów aktynowych uczestnicząc jednocześnie w przekazywaniu sygnału do wnętrza komórki. W odpowiedzi na stymulację przez integryny fosforylowany jest bowiem kompleks białkowy kinazy tyrozynowej FAK, który to enzym aktywowany jest również przez białko G związane z receptorem neuropeptydów i kinazę *src*. Zwiększona fosforylacja FAK wydaje się towarzyszyć inwazji nowotworu przez substancję międzykomórkową [18, 51].

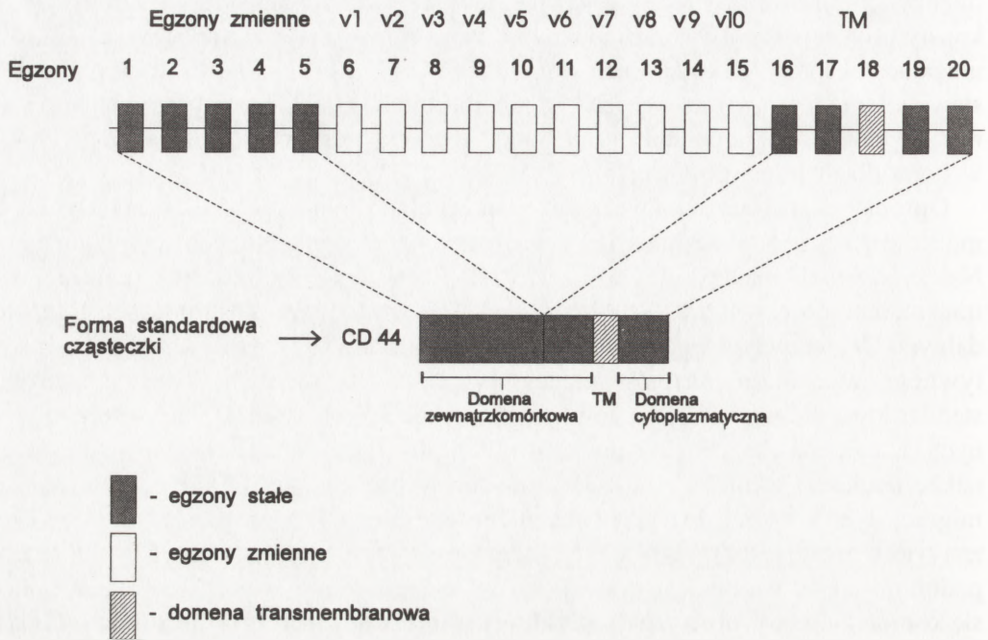
**Selektyny** – ulegają ekspresji na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych i limfatycznych aktywowanego cytokinami (selektyny E i P) oraz leukocytów (selektyny L) [3, 4, 8, 34, 50, 52]. W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wiążą różne determinanty węglowodanowe obecne w błonie komórek, np. sialowane pochodne antygeny Lewis –  $\text{SLe}^x$  i  $\text{SLe}^a$ . Ich fizjologiczna funkcja polega na przyłączaniu leukocytów do śródbłonna naczyń i ułatwianiu im jego penetracji podczas procesu zapalnego [1, 4, 8, 27, 43, 50, 52]. W warunkach patologicznych mogą przyczyniać się do tworzenia przerzutów na skutek pojawienia się specyficznych determinant na powierzchni komórek transformowanych [34, 50].

**Cząsteczki adhezyjne z superrodziny immunoglobulin** – działają niezależnie od obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Mogą pośredniczyć w wiązaniach homo- i heterofilowych, jak np. cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych NCAM warunkująca zarówno ich adhezję do siebie, jak i do substancji międzykomórkowej [2, 8, 18, 34]. Do grupy tej należą także cząsteczki zaangażowane w przyłączanie leukocytów do aktywowanego śródbłonna naczyń podczas procesów zapalnych. Są to między innymi

międzykomórkowe cząsteczki adhezyjne: ICAM1 (indukowana) i ICAM2 (ulegająca konstytutywnej ekspresji) oraz indukcyjna naczyniowa cząsteczka adhezyjna VCAM ulegające ekspresji w komórkach śródbłonna [4, 11, 12, 31, 50, 52]. Innym przedstawicielem tej grupy jest antygen karcinoembrionalny CEA biorący udział w utrzymaniu prawidłowej architektury nabłonka. Jego ekspresja często ulega zaburzeniu w komórkach transformowanych [8, 34].

Oprócz scharakteryzowanych wyżej molekuł pośredniczących w adhezji komórkowej istnieją także inne, nie mieszczące się w wydzielonych tutaj grupach. Należy do nich między innymi cząsteczka CD44 (rys. 2). Jest to glikoproteina transmembranowa warunkująca umiejscowienie limfocytów w strukturach limfoidalnych. Jej głównym ligandem jest kwas hialuronowy. Dzięki zjawisku alternatywnego wycinania intronów może występować w różnych formach. Forma standardowa nie ma tzw. egzonów zmiennych obecnych w wariantach alternatywnych. Ulega ona ekspresji w prawidłowych limfocytach. W stanach zapalnych jednakże dochodzi w nich do wytworzenia formy wariantowej CD44v6, co ułatwia migrację tych komórek do naczyń układu limfatycznego. Proces nowotworowy związany jest często z ekspresją różnych izoform CD44, w tym także CD44v6, co, podobnie jak w warunkach prawidłowych, może być przyczyną przemieszczania się komórek nowotworowych do struktur limfatycznych, a co za tym idzie tworzenia przerzutów. Obecność form wariantowych CD44 stwierdzono jednakże również na powierzchni niektórych prawidłowych nabłoneków oraz w formie rozpuszczalnej w surowicy krwi [8, 15, 28, 34, 37, 48, 50].

Komórki nowotworowe różnią się od komórek prawidłowych sposobem oddziaływania z otaczającymi tkankami i substancją międzykomórkową. Wiąże się to z zaburzeniami w funkcjonowaniu cząsteczek adhezyjnych. Zazwyczaj jednak polegają one na zmianie ekspresji lub mutacji cząsteczek obecnych na powierzchni komórek normalnych, nie zaś na nabyciu jakichś nowych cech, charakterystycznych jedynie dla nowotworów [8]. Ponadto poszczególne guzy różnią się znacznie pod względem zdolności do tworzenia przerzutów. Wiąże się to z faktem, że jest to proces złożony, zależny nie od jednej nabytej cechy, lecz od całego zespołu czynników promujących i hamujących inwazję nowotworu, które warunkują wytworzenie specyficznej równowagi [28]. I tak np. E-kadheryny są typowym przykładem cząsteczek zapobiegających odrywaniu się komórek od guza i ich migracji [6, 28]. Integryny natomiast mogą odgrywać dwojaką rolę – promować ruchliwość komórek, ale także przyczyniać się do ich zatrzymania w tkance macierzystej [28]. Niewyjaśniona jest też rola pojawiającej się w niektórych nowotworach ekspresji *de novo* cząsteczek ICAM-1. Z jednej strony mogłyby się one przyczyniać do adhezji i aktywacji limfocytów T cytotoksycznych, a tym samym do lizy komórek (w chłoniakach obecność cząsteczki ICAM-1 łączy się z dobrą prognozą), z drugiej strony przyłączające się monocyty mogłyby powodować redukcję adhezji między komórkami guza i ułatwiać tworzenie przerzutów (w czerniakach ekspresja ICAM-1 skorelowana jest



Rys. 2. Schemat budowy genu cząsteczki CD 44: egzony zmienne v1–v10 ulegają wycięciu w czasie dojrzewania mRNA formy standardowej CD 44; w różnego typu izoformach CD 44 mogą zostać zachowane (wg [48], zmieniony)

ze skłonnością do tworzenia przerzutów). Jednocześnie rozpuszczalne formy ICAM-1, obecne w niektórych przypadkach w surowicy krwi chorych zdolne są do blokowania receptorów limfocytów T, a tym samym do hamowania odpowiedzi immunologicznej organizmu [9, 10, 41]. Czynnikiem zdecydowanie negatywnym jest pojawienie się na powierzchni błony komórek transformowanych nadmiaru ligandów dla selektyn, cząstek typu CD44, a także receptorów dla tzw. czynników ruchliwości, np. receptora c-met dla czynnika rozprzestrzeniania SF/HGF [6, 28]. Ponadto komórki guza mogą produkować receptory dla specyficznych hydrolaz i ich aktywatorów, np. aktywatora plazminogenu, co umożliwi przerwanie ciągłości substancji międzykomórkowej [29, 36, 40].

## ZMIANY EKSPRESJI CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH W GUZACH JELITA GRUBEGO

Komórki raków jelita grubego, podobnie jak nowotwory wywodzące się z innych tkanek, wykazują zmienione właściwości adhezyjne. W dużym odsetku przypadków

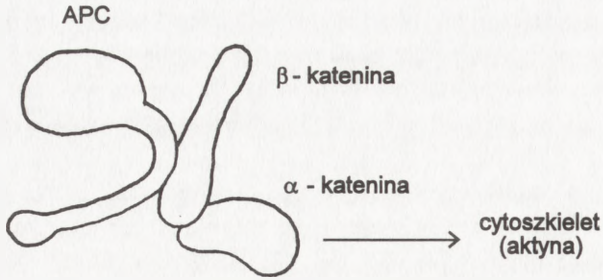
stwierdzono znaczne zmniejszenie ekspresji E-kadheryn. Niektórzy badacze sugerują także istnienie zmian mutacyjnych w obrębie tych cząstek w rakach jelita [5, 8, 28]. Ponadto zidentyfikowano nowotworowe linie komórkowe, które nie wytwarzały  $\alpha$ -kateniny - białka pośredniczącego w interakcjach E-kadheryny z cytoszkieletem [5].

Powszechnym zjawiskiem w omawianych tu nowotworach jest nadmierna ekspresja antygeny SLe<sup>x</sup>, który stanowi receptor dla E-selektyn pośredniczących w adhezji komórek do śródbłonna naczyń [42, 43, 50]. Stwierdzono także wysoki poziom białka 32/67 kDa wiążącego lamininę [49]. Transformowane komórki nabłonka jelitowego wykazują również ekspresję cząstek ICAM1 oraz pewnych alternatywnych form CD44. W fazie hyperprolifracji nabłonka jelitowego stwierdzono mianowicie nadprodukcję cząstek CD44v5, w fazie inwazyjnej natomiast cząstek CD44v6 uważanych za czynniki promujące tworzenie przerzutów. Związane jest to również ze zwiększeniem poziomu tego białka w surowicy krwi [11, 12, 37, 48]. Wykazano ponadto częste zmiany w ekspresji integryn – w porównaniu z komórkami normalnymi zmniejsza się ilość integryn  $\alpha_2$  i  $\alpha_5$  w gruczolakach, całkowicie zaś zanikają one w gruczolakorakach, ekspresja integryn  $\alpha_6$ ,  $\beta_1$  i  $\beta_4$  spada natomiast dopiero w gruczolakorakach [18].

Do jednych z bardziej charakterystycznych zmian w nowotworach jelita grubego należy wzrost poziomu antygeny karcinoembrionalnego CEA (10–100 razy) oraz jego zaburzona dystrybucja. W komórkach prawidłowych znajduje się on jedynie na powierzchni skierowanej do światła jelita, w nowotworach zaś na całej błonie komórkowej. Wydaje się, że zmiany te mogą zaburzać normalną adhezję międzykomórkową, prowadząc do zniszczenia architektury tkanki [8, 30, 39].

Powszechnie znanymi genami supresorowymi ulegającymi inaktywacji w rakach jelita są geny *DCC* i *APC*. Okazało się, że mają one najprawdopodobniej związek z regulacją adhezji komórkowej. Gen *DCC* koduje białko powierzchniowe (153 kDa) wykazujące dużą homologię do cząsteczki NCAM. Sugeruje się, że może ono odgrywać rolę w samorozpoznawaniu komórek nabłonka jelita, natomiast jego uszkodzenie lub brak może prowadzić do zwiększenia inwazyjności i powstawania przerzutów [5, 8, 20, 21, 28, 32].

Białko kodowane przez gen *APC* okazało się również jednym z regulatorów interakcji międzykomórkowych. Łączy się ono zarówno z  $\beta$ , jak i z  $\gamma$  kateninami oddziałując tym sposobem, przez wiązanie utworzonego kompleksu z  $\alpha$  kateninami, ze składnikami szkieletu komórkowego. Interakcje te są analogiczne do obserwowanych pomiędzy E-kadheryną a kateninami (rys. 3). Wykazano ponadto, że białko APC współzawodniczy w wiązaniu  $\beta$  i  $\gamma$  katenin z kadheryną. Jak dotąd nie udało się jeszcze jednoznacznie określić zależności pomiędzy produktem genu *APC* a adhezją komórkową. Sugeruje się, że kateniny mogą regulować negatywnie adhezję warunkowaną obecnością E-kadheryn, białko APC zaś byłoby czynnikiem zapobiegającym tym oddziaływaniom. Inna hipoteza głosi, że APC pośrednio interferuje



Rys. 3. Schemat oddziaływań białka APC z kateninami; oddziaływania te są analogiczne do interakcji obserwowanych między kateninami a domenami cytoplazmatycznymi E-kadheryn (wg [16], zmieniony)

z działaniem adhezyjnych E-kadheryn, przyczyniając się tym samym do uwalniania komórek nabłonkowych do światła jelita. Potwierdzałyby to obserwowany stopniowy wzrost ekspresji genu *APC* od podstawy do powierzchni krypt. Brak *APC* powodowałby zatrzymanie komórek proliferujących, które mogłyby gromadzić mutacje niezbędne do dalszej transformacji [16, 21].

Do białek o charakterze cząstek adhezyjnych zaliczono także ostatnio produkty genów rodziny *GA733*. Są to glikoproteiny powierzchniowe o masie ok. 40 kDa, których nadmierną ekspresję stwierdzono w nowotworach wywodzących się z nabłonka endodermalnego – przede wszystkim w rakach jelita grubego, ale także żołądka, płuc, trzustki, pęcherza moczowego [13, 19, 25, 26, 47]. Przeciwciała rozpoznające te antygeny stosowano już niejednokrotnie w próbach immuno- i radioimmunoterapii oraz diagnostyki tych schorzeń [22, 33, 38, 45]. Funkcja tych białek jak dotąd nie została dokładnie poznana. Pewne podobieństwa sekwencji aminokwasowej produktu genu *GA733-2* i genu *nidogenu* (białka wiążącego lamininę) pozwalają sądzić, że uczestniczy on w interakcjach pomiędzy komórkami nowotworowymi a substancją międzykomórkową [7, 24]. Z drugiej jednak strony bezpośrednie doświadczenia polegające na transfekcji komórek NIH 3T3 cDNA genu *GA733-2* wykazały jego udział w adhezji homotypowej – komórki transfekowane tworzyły agregaty oddzielając się jednocześnie od pozostałych. Możliwe, że nadmierna ekspresja *GA733-2* hamuje działanie innych cząsteczek adhezyjnych. Zjawisko takie mogłoby promować odrywanie się komórek od masy guza i tworzenie przerzutów [26]. Jednakże funkcja produktów genów *GA733* jak dotąd nie jest jeszcze jasna i wymaga potwierdzenia.

## PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH W TERAPII I DIAGNOSTYCE NOWOTWORÓW

Dokładniejsze poznanie roli i sposobu funkcjonowania cząsteczek adhezyjnych w nowotworach wydaje się być bardzo ważną dziedziną badań. Pozwoli ono nie

tylko na głębsze zrozumienie biologii tworzenia przerzutów, ale także może stworzyć nowe perspektywy terapii i diagnostyki. Już dziś metodę uzupełniającą w rozpoznawaniu raka jelita grubego stanowi badanie poziomu antygenu karcinoembrionalnego CEA we krwi pacjentów. Test ten jednak jest dość niespecyficzny, gdyż daje pozytywne rezultaty także w innych typach nowotworów (np. sutka, płuć) oraz w pewnych schorzeniach nienowotworowych, takich jak zapalenie trzustki. Poza tym stężenie CEA we krwi wzrasta dosyć późno w rozwoju choroby, w związku z czym we wczesnych stadiach test jest niemiernodajny [30, 44]. Z drugiej strony proponuje się wykorzystanie wspomnianej wcześniej zmienionej (cytoplazmatycznie-błonowo-podścieliskowej) lokalizacji tego antygenu w komórkach raka jelita grubego jako czynnika prognostycznego w tym schorzeniu [30]. Podobną rolę mogłoby pełnić zdaniem niektórych autorów badanie ekspresji E-kadheryn skorelowanej wg nich ze stadiem rozwoju nowotworu Dukesa [5]. Innym zjawiskiem pomocnym w przewidywaniu przebiegu choroby jest ekspresja *de novo* cząsteczek ICAM w komórkach chłoniaków (skorelowana z pozytywnymi rokowaniami) i czerniaka (związana ze skłonnością do tworzenia przerzutów) [10, 41]. W przypadku drobnokomórkowego raka płuć proponuje się wykorzystanie obecności pewnych rozpuszczalnych izoform cząsteczek NCAM o charakterze embrionalnym (bogatych w reszty kwasu polisialowego – PSA) we krwi pacjentów jako markera tego schorzenia [17, 46].

Inny kierunek badań stanowią próby zapobiegania tworzeniu przerzutów polegające na blokowaniu odpowiednich cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek nowotworowych. Stosuje się do tego celu skierowane przeciwko nim przeciwciała lub syntetyczne polipeptydy – odpowiedniki fragmentów białek macierzy zewnątrzkomórkowej rozpoznawanych przez cząsteczki adhezyjne (np. analogi peptydu RGD obecnego w fibronektynie lub YIGSR znajdującego się w lamininie) [23, 49].

Podjęmowane są także próby zastosowania wiedzy o cząsteczkach adhezyjnych w immunoterapii nowotworów. Opracowano w tym celu strategię polegającą na izolacji limfocytów naciekających guz, ich hodowli *in vitro* w warunkach promujących ekspresję cząsteczek adhezyjnych zaangażowanych w adhezję do powierzchni komórek danego typu nowotworu i ponownym wprowadzaniu ich do organizmu pacjenta [1].

Pomimo że większość opisanych tu prób diagnostyki i terapii pozostaje wciąż w sferze doświadczeń, istnieje nadzieja, że dalsze badania doprowadzą do ich ulepszenia i możliwości zastosowania ich w praktyce klinicznej.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ADAMS DH, SHAW S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; **343**: 831–835.

- [2]AKIYAMA SK, YAMADA KM. Introduction: Adhesion molecules in cancer. Part I. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 215–218.
- [3]ALBEDA SM, SMITH CW, WARD PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; **8**: 504–512.
- [4]BEVILACQUA MP, NELSON RM. Endothelial-leucocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis. *Thromb Haemost* 1993; **70**: 152–154.
- [5]BIRCHMEIER W, BEHRENS J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1198**: 11–26.
- [6]BIRCHMEIER W, WEIDNER KM, HULSKEN J, BEHRENS J. Molecular mechanism leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 231–239.
- [7]BJÖRK P, JÖNSSON U, SVEDBERG H, LARSSON K, LIND P, DILLNER J, HEDLUND G, DOHLSTEN M, KALLAND T. Isolation, partial characterization, and molecular cloning of a human colon adenocarcinoma cell-surface glycoprotein recognized by the C215 mouse monoclonal antibody. *J Biol Chem* 1993; **268**: 24232–24241.
- [8]BRESALIER RS. Adhesion molecules and gastrointestinal malignancies. *Gastroenterology* 1994; **106**: 1378–1382.
- [9]CAMPBELL SC, TANABE K, ALEXANDER JP, EDINGER M, TUBBS RR, KLEIN EA. Intercellular adhesion molecule-1 expression by bladder cancer cells: functional effects. *J Urology* 1994; **151**: 1385–1390.
- [10]COLEMAN N, GREENFIELD IM, HARE J, KRUGER-GRAY H, CHAIN BM, STANLEY MA. Characterization and functional analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human papillomavirus-related disease of cervical keratinocytes. *Am J Pathol* 1993; **143**: 355–367.
- [11]DAS KM, SQUILLANTE L, ROBERTSON FM. Amplified expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and Mr 40K protein by DLD-1 colon tumor cells by interferon- $\gamma$ . *Cell Immunol* 1993; **147**: 215–221.
- [12]DIPPOLD W, WITTING B, SCHWAEBLE W, MEYER KH. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1, CD54) in colonic epithelial cells. *Gut* 1993; **34**: 1593–1597.
- [13]FERNSTEN PD, PRIMUS FJ, GREINER JW, SIMPSON JF, SCHLOM J. Characterization of the colorectal carcinoma-associated antigen defined by monoclonal antibody D612. *Cancer Res* 1991; **51**: 926–934.
- [14]GLUKHOVA MA, THIERY JP. Fibronectin and integrins in development. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 241–249.
- [15]HARŁOZIŃSKA-SZMYRKA A. Nowotwory jako choroba genów. *Post Biochem* 1995; **41**: 7–15.
- [16]HÜLSKEN J, BIRCHMEIER W, BEHRENS J. E-cadherin and APC compete for the interaction with  $\beta$ -catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 1994; **127**: 2061–2069.
- [17]JACQUES G, AUERBACH B, PRITSCH M, WOLF M, MADRY N, HAVEMANN K. Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer* 1993; **72**: 418–425.
- [18]JULIANO RL, VARNER JA. Adhesion molecules in cancer: the role of integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 812–818.
- [19]KITLIŃSKA J, WOJCIEROWSKI J. GA733 genes expression in human gastrointestinal tumours. *J Appl Genet* 1995; **36**: 279–284.
- [20]KNUDSON AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10914–10921.
- [21]KRAJEWSKA WM, MŁYNARSKI W, WÓJCIK M. Genetyczne podstawy transformacji nowotworowej jelita grubego. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 279–298.

- [22]LANGMUIR VK, MENDONCA HL, WOO DV. Comparisons between two monoclonal antibodies that bind to the same antigen but have differing affinities: Uptake kinetics and <sup>125</sup>I-Antibody therapy efficacy in multicell spheroids. *Cancer Res* 1992; **52**: 4728–4734.
- [23]LAURI D, DeGIOVANNI C, BIONDELLI T, LALLI E, LANDUZZI L, FACCHINI A, NICOLETTI G, NANNI P, DEJANA E, LOLLINI PL. Decreased adhesion to endothelial cells and matrix proteins of H-2K<sup>b</sup> gene transfected tumour cells. *J Cancer* 1993; **68**: 862–867.
- [24]LINNENBACH AJ, SENG B, WU S, ROBBINS S, SCOLLON M, PYRC J, DRUCK T, HUEBNER K. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 1507–1515.
- [25]LINNENBACH AJ, WOJCIEROWSKI J, WU S, PYRC J, ROSS AH., DIETZSCHOLD B, SPEICHER D, KOPROWSKI H. Sequence investigation of the major gastrointestinal tumor-associated antigen gene family, GA733. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 27–31.
- [26]LITVINOV SV, VELDEERS MP, BAKKER AM, FLEUREN GJ, WARNAAR S. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1994; **125**: 437–446.
- [27]MACKAY CR, IMHOF BA. Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today* 1993; **14**: 99–102.
- [28]MAREEL M, BRACKE M, ROY F. Invasion promoter versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-cadherin. *Mol Biol Rep* 1993; **19**: 45–67.
- [29]MONSKY WL, CHEN WT. Proteases of cell adhesion proteins in cancer. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 251–258.
- [30]NASIEROWSKA-GUTTMEJER A, ROSZKOWSKA-PURSKA K, MARYNIAK R, BURZYKOWSKI T, NOWACKI M. Porównanie wartości klasyfikacji Dukesa, Astler-Collera, Jassa i typu lokalizacji CEA w tkance raka odbytnicy metodą analizy wieloczynnikowej. *Nowotwory* 1994; **44**: 114–122.
- [31]NELSON H, RAMSEY PS, DONOHUE JH, WOLD LE. Cell adhesion molecule expression within the microvasculature of human colorectal malignancies. *Clin Immunol and Immunopathol* 1994; **72**: 129–136.
- [32]NEUMAIER M, PAULULAT S, CHAN A, MATTHAES P, WAGNER C. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 10744–10748.
- [33]NIERODA CA, MOJZISIK C, HINKLE G, THURSTON MO, MARTIN EW. Radioimmuno-guided surgery (RIGS) in recurrent colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 1991; **15**: 225–229.
- [34]NIGAM AK. Adhesion molecules in cancer. *Eur J Surg Oncol* 1994; **20**: 82–84.
- [35]PAAVONEN T, TUSALA S, MAJURI ML, BÖHLING T, RENKONEN R. *In vivo* evidence of the role of  $\alpha_4\beta_1$ -VCAM-1 interaction in sarcoma, but not in carcinoma extravasation. *Int J Cancer* 1994; **58**: 298–302.
- [36]PYKE C, KRISTENSEN P, RALFKIAR E, GRONDAHL-HANSEN J, ERIKSEN J, BLASI F, DANO K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; **138**: 1059–1067.
- [37]RADZIKOWSKI C. Przerzuty nowotworowe – problem biologiczny, dylemat prognostyczny i terapeutyczny. *Nowotwory* 1995; **45**: 184–201.
- [38]RAGNHAMMAR P, FAGERBERG J, FRÖDIN JE, HJELM AL, LINDEMALM C, MAGNUSSON I, MASUCCI G, MELLSTEDT H. Effect of monoclonal antibody 17-1A and GM-CSF in patients with advanced colorectal carcinoma - long-lasting, complete remissions can be induced. *Int J Cancer* 1993; **53**: 751–758.
- [39]ROSENBERG M, NÉDELLEC P, JOTHY S, FLEISZER D, TURBIDE C, BEAUCHEMIN N. The expression of mouse biliary glycoprotein, a carcinoembryonic antigen-related gene, is down-regulated in malignant mouse tissues. *Cancer Res* 1993; **53**: 4938–4945.



- [40] RUCKLIDE GJ, EDVARSDEN K, BOCK E. Cell-adhesion molecules and metalloproteinases: a linked role in tumor cell invasiveness. *Biochem Soc Trans* 1994; **22**: 63–68.
- [41] RÜNGER TM, KLEIN CE, BECKER JC, BRÖCKER EB. The role of genetic instability, adhesion, cell motility, and immune escape mechanisms in melanoma progression. *Curr Opin Oncology* 1994; **6**: 188–196.
- [42] SALEM RR, WOLF BC, SEARS HF, LAVIN PT, RAVIKUMAR TS, DECOSTED D, D'EMILIA JC, HERLYN M, SCHLOM J, GOTTLIEB LS, STEELE GD. Expression of colorectal carcinoma-associated antigens in colonic polyps. *J Surg Res* 1993; **55**: 249–255.
- [43] SAWADA R, TSUBOI S, FUKUDA M. Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1425–1431.
- [44] STEVENSON GW. Radiology and endoscopy in the pretreatment diagnostic management of colorectal cancer. *Cancer* 1993; **71**: 4198–4206.
- [45] STRASSBURG CP, KASAI Y, SENG B, MINIOP P, ZALOUDIK J, HERLYN D, KOPROWSKI H, LINNENBACH AJ. Baculovirus recombinant expressing a secreted form of a transmembrane carcinoma-associated antigen. *Cancer Res* 1992; **52**: 815–821.
- [46] TAKAMATSU K, AUERBACH B, GERARDY-SCHAHN R, ECKHARDT M, JAQUES G, MADRY N. Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res* 1994; **54**: 2598–2603.
- [47] TAKIYAMA Y, TEMPERO MA, TAKASAKI H, ONDA M, TSUCHIYA R, BÜCHLER M, NESS M, COLCHER D, SCHLOM J, POUR PM. Reactivity of CO17-1A and B72.3 in benign and malignant pancreatic diseases. *Hum Pathol* 1989; **20**: 832–838.
- [48] WIELENGA VJM., HEIDER KH, OFFERHAUS GJA., ADOLF GR, BERG FM, PONTA H, HERRLICH P, PALS ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; **53**: 4754–4756.
- [49] YAMAMURA K, KIBBEY MC, JUN SH, KLEINMAN HK. Effect of matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 259–265.
- [50] ZETTER BR. Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 1993; **4**: 219–229.
- [51] ŻAK I. Białka mozaikowe. *Post Biochem* 1995; **41**: 120–130.
- [52] ŻAK I. Receptory adhezyjne. *Post Biol Kom* 1996; **23**: 221–242.

Redaktor prowadzący: Szczepan Biliński

Otrzymano: 05.08.1996 r.

Przyjęto: 25.11.1996 r.

Adres autora: Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej w Lublinie  
ul. Radziwiłłowska 11 20-950 Lublin

## SPRAWOZDANIE Z DZIAŁALNOŚCI ZARZĄDU FUNDACJI BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ ZA OKRES CZERWIEC 1994–SIERPIEŃ 1996

Sprawozdanie Fundacji za okres: grudzień 1990 – maj 1994 opublikowano w "Postęпах Biologii Komórki" (21;341-347, 1994). Sprawozdanie za rok ubiegły (maj 1994 – wrzesień 1995) Zarząd złożył Fundatorom wcześniej.

W obecnym okresie sprawozdawczym **Zarząd** działał w niezmiennym składzie: Jerzy Kawiak – prezes, Maciej Nałęcz – v-prezes, Maciej Zabel – sekretarz, Maciej Kawalec – skarbnik. Również skład **Rady Fundacji** nie zmienił się: Zofia Osuchowska – przewodnicząca, członkowie: Tadeusz Cichocki, Antoni Horst, Józef Kałuża, Aleksander Koj, Włodzimierz Korohoda, Andrzej Łukaszyk, Andrzej Myśliwski, Maria Olszewska, Aleksandra Stojałowska, Jan Steffen. Zarząd pracował społecznie.

W pracy Zarządu pomagały panie: Ewa Próchniewicz – księgowa, Barbara Miks, Danuta Wasilewska, Małgorzata Siarkiewicz w rozprawdaniu zeszytów "Postępów Biologii Komórki". Zarząd składa tym osobom serdeczne podziękowania. F-ma "Script" wspomagała współpracę z drukarniami.

### 1. Działalność wydawnicza

Jest to główny zakres działania Zarządu Fundacji. Fundacja wspiera wydawanie czasopism "*Folia Histochemica et Cytobiologica*" oraz "*Postępy Biologii Komórki*".

#### A. *Folia Histochemica et Cytobiologica*

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie odpowiadającej standardom międzynarodowym. Wprowadzono zwyczaj częstego publikowania artykułów przeglądowych pisanych przez wybitnych specjalistów. Wydano suplement 1, 1996. Skład i druk czasopisma odbywa się w Krakowie.

Merytoryczną pieczę i decyzje o składzie Redaktorów "Folia" ma Polskie Towarzystwo Histochemików i Cytochemików. Również Towarzystwo od 1995 r. jest formalnym właścicielem czasopisma.

Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Do chwili obecnej (sierpień 1996) Zarząd Fundacji nie otrzymał dotacji z Komitetu Badań Naukowych na wydawanie czasopisma w roku bieżącym, ale liczy na tę ważną pomoc w drugim półroczu. Otwarto subkonto Fundacji w PKO SA w Krakowie dla ułatwienia Redaktorom prowadzenia czasopisma.

Artykuły z "Folia" są indeksowane w: Medline, Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert.

### **B. Postępy Biologii Komórki**

Czasopismo ukazywało się regularnie w dotychczasowej formie. W dalszym ciągu wydawano suplementy. Suplementy ukazały się pod redakcją:

supl. 3. Zdzisław Żak – *Biotechnologia, wybrane zagadnienia z inżynierii komórkowej, genetycznej i białkowej,*

supl. 4. Stefan Malepszy – *Somatyczna embriogeneza i jej molekularno-genetyczne uwarunkowania u roślin,*

supl. 5. Andrzej Klein – *25-lecie IBM UJ, wybrane zagadnienia z biochemii, biofizyki i biologii komórki,*

supl. 6. Ryszard Słomski – *Postępy badań DNA.*

Zarząd i Redakcja "Postępów" postanowiły wydawać suplementy w związku z dorocznymi konferencjami biologii komórki organizowanymi w Warszawie od 25 lat przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Histo- i Cytochemików oraz Redakcję "Postępów".

Skład czasopisma odbywa się w dalszym ciągu w Wydawnictwie Fundacji •Rozwój SGGW • w Warszawie.

Merytoryczną pieczę nad "Postępami" ma od 23 lat Polskie Towarzystwo Anatomiczne oraz od 3 lat Polskie Towarzystwo Biologii Komórki. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Anatomicznego zdecydował, że o tytuł własności czasopisma "Postępy Biologii Komórki" powinna ubiegać się Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej. Fundacja wystąpiła o własność tego tytułu, co zostało pozytywnie rozpatrzone (decyzja Sądu Wojewódzkiego w Warszawie z 18 lipca 1995, Nr 576/95). Przejęcie czasopisma odbyło się w porozumieniu z Zarządem Głównym Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki.

Wydawanie czasopisma odbywa się z finansową pomocą Komitetu Badań Naukowych oraz z funduszy zebranych ze sprzedaży czasopisma. Do chwili obecnej (sierpień 1996) Zarząd Fundacji nie otrzymał dotacji z Komitetu Badań Naukowych na wydawanie czasopisma w roku bieżącym, ale liczy na tę ważną pomoc w drugim półroczu.

## 2. Wyróżnienia oraz pomoc w wyjazdach zagranicznych

W dalszym ciągu działała stała Komisja Nagród Fundacji pod przewodnictwem prof. Zofii Osuchowskiej. Członkami Komisji są:

prof. dr Barbara Sztabert-Grzelakowska, dr hab. Agnieszka Mostowska, prof. dr Hieronim Bartel, prof. dr Stanisław Moskalewski, prof. dr Jerzy Kawiak.

Komisja opracowała regulamin dorocznej nagrody Fundacji. Konkurs nagród w 1994 r. został ogłoszony w "Postęпах Biologii Komórki" (1994; 21 zeszyt 3). Ogłoszono też regulamin nagrody Fundacji w "Postęпах" (22;429,1995).

Za rok 1994 przyznano nagrodę M. Kopaczowi, E. Karwatowskiej-Prokopczuk, A. Beręsewiczowi z Z. Fizjologii CMKP w Warszawie za pracę "*Reperfusion arrhythmias and purine washout in isolated rat and rabbit heart effect of allopurinol, dimethylurea, and calcium reduction*" ogłoszoną w J. Molec. Cell Cardiol 25; 859-874, 1993.

Zarząd zdecydował, aby nagrodę za rok 1995 przyznać Redaktorom czasopisma "*Folia Histochemica et Cytobiologica*" prof. dr Janowi Litwinowi i doc. dr Barbarze Bilińskiej za szczególną troskę i zaangażowanie w redagowanie periodyku, dbałość o zachowanie wysokiego poziomu merytorycznego czasopisma oraz za doprowadzenie formy czasopisma do poziomu światowego i dopilnowanie regularnego ukazywania się zeszytów.

Do Fundacji zwracały się o pomoc w wyjazdach na konferencję naukową w 1995 pt. "*Mechanism of DNA repair: Association to transcription, replication and recombination*" w Giens, Francja następujące osoby: mgr. Anna Czajkowska oraz p. Anna Bębenek, obie z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, oraz p. Zbigniew Sroka z Katedry i Zakładu Farmakognozji AM we Wrocławiu, który prosił o opłacenie wpisowego w Zjeździe Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego 1995 w Warszawie.

Fundacja nie dysponowała wtedy funduszami, które umożliwiłyby realizację tych propozycji.

### 3. Organizacja Banku Linii Komórek ludzkich i zwierzęcych oraz Banku Sond Molekularnych oraz wspomaganie konferencji krajowych

Zarząd w dalszym ciągu wspólnie z Siecią UNESCO/PAN czynił starania o zdobycie funduszy na zorganizowanie w kraju kolekcji linii komórkowych i banku sond molekularnych. Proponowano, by bank centralny linii komórkowych mieścił się w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu, a filie banku były w Instytucie Biologii Molekularnej UJ w Krakowie, Zakładzie Histologii AM w Gdańsku i Z. Cytologii Klinicznej CMKP w Warszawie. Centralny bank sond molekularnych planowano w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, a filie w Zakładzie Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu i Instytucie im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Czyniono starania o grant zamawiany w KBN przez Urząd Patentowy PR. Grantu na ten cel nie otrzymano mimo, iż naszym zdaniem przyczyniłoby się to do współpracy kilku ośrodków w kraju zajmujących się biologią komórki, biologią molekularną, patologią komórkową, schorzeniami nowotworowymi i podobnymi zagadnieniami.

Zarząd Fundacji z Zarządem Sieci UNESCO postanowili zrezygnować z wspólnej działalności w zakresie finansowego wspomaganie organizacji zjazdów i konferencji w kraju, ponieważ takie starania organizatorzy mogą obecnie czynić bezpośrednio w KBN.

#### 4. Finanse i inwestycje

Fundatorzy Fundacji w osobach: prof. dr Tadeusz Cichocki, prof. dr Andrzej Łukaszyc, prof. dr Andrzej Myśliwski oraz Przewodnicząca Rady Fundacji prof.dr Zofia Osuchowska kontrolowali finanse Fundacji w maju 1994 r oraz we wrześniu 1995 r.

Zarząd zakupił twardy dysk do komputera IBM oraz używaną kserokopiarkę. Inwestycje te są ułatwieniem w pracy Zarządu.

*Prezes Fundacji:*

*V-Prezes:*

*Sekretarz:*

*Jerzy Kawiak*

*Maciej Nałęcz*

*Maciej Zabel*

*Warszawa, sierpień 1996.*

## Sprawozdanie przedstawione Komitetowi Cytobiologii PAN, czerwiec 1996

### **Folia Histochemica et Cytobiologica**

*Redaktorzy:* Jan A. Litwin, Barbara Bilińska – Kraków

*Komitet Redakcyjny:* Ernő Bácsy (Budapest), Zofia Bielańska-Osuchowska (Warszawa), Manfred Dietel (Berlin), Reinhart Gossrau (Berlin), Józef Kałuża (Kraków), Jerzy Kawiak (Warszawa), Wincenty Kilarski (Kraków), Aleksander Koj (Kraków), Zdenek Lojda (Praha), Andrzej Łukaszyk (Poznań), Hans Lupp (Leipzig), Ludwik Malendowicz (Poznań), Józef Niweliński (Kraków), Cornelis J. F. van Noorden (Amsterdam), Kazuo Ogawa (Kyoto), Maria Olszewska (Łódź), Christoph Pilgrim (Ulm), Mels van der Ploeg (Leiden), Aleksandra Przełęcka (Warszawa), Dietrich W. Scheuermann (Antwerpen), Jerzy Stachura (Kraków), Andrzej Vorbrodt (Staten Island, NY).

W 1995 r. opublikowano 38 prac w tym:

- prac autorów zagranicznych 9,
- prac zespołowych – autorzy polscy i zagraniczni 6,
- prac autorów polskich 23.

Odrzucono 30% nadesłanych manuskryptów

Ostatni impact factor za 1994 r. 0.122

*Referowane w:* Biological Abstracts, Excerpta Medica, Index Medicus, SciSearch, Research Alert, Current Adv in Cell and Developmental Biology

*Własność:* Polskie Towarzystwo Cytochemików i Histochemików

*Finansowanie:* Dotacja KBN, dochody z prenumeraty, za odbitki autorskie i barwne ilustracje poprzez Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej; nie płaci się honorariów redaktorom, recenzentom, autorom. Nakłady finansowe w 1995 r. ok. 40 000 NZ

### **Postępy Biologii Komórki**

*Redaktorzy:* Szczepan Biliński, Jerzy Kawiak, Maciej Kawalec, Wincenty Kilarski, Jan Michejda, Maria Olszewska, Maciej Zabel

*Komitet Redakcyjny:* Zofia Osuchowska – przewodnicząca, M. Chorąży, L. Cieciora, A. Horst, A.Koj, W. Korohoda, L. Kuźnicki, O. Narkiewicz, A. Przełęcka, A. Stojalowska, L. Wojtczak

W 1995 r. opublikowano 25 prac i 11 w suplementach=36; w 1996 (zeszyty 1+2) 18 artykułów. Odrzucono 20% nadesłanych manuskryptów

*Własność:* Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w imieniu Polskiego Tow. Anatomicznego i Polskiego Tow. Biologii Komórki

*Finansowanie:* Dotacja KBN, dochody z prenumeraty, za odbitki autorskie i barwne ilustracje poprzez Fundację Biologii Komórki i Biologii Molekularnej; nie płaci się honorariów redaktorom, recenzentom, autorom. Nakłady finansowe w 1995 r. ok. 30 000 NZ.

## KOMUNIKATY

### KURS CYTOMETRII

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Cytometrii zawiadamia, że w okresie:

10–13 czerwca 1997 r. odbędzie się kurs cytometrii z udziałem wykładowców z zagranicy organizowany przez:

dr J. Dobruckiego w Instytucie Biologii Molekularnej UJ w Krakowie  
(31-120 Kraków, Al. A. Mickiewicza 3, tel. 34 13 05)

14–15 czerwca odbędzie się związana z kursem Konferencja na temat Cytometrii w Warszawie; informacji udziela dr. J. Skierski pod adresem  
*Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34, tel. 41 29 89*

*Zarząd Polskiego Towarzystwa Cytometrii*

*Warszawa, grudzień 1996 r.*

## Komunikat Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

Zarząd Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej przyznaje doroczną nagrodę naukową, w tym również w roku 1996 i 1997, za wyróżniającą się oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej, opublikowaną w ostatnich dwóch latach w czasopiśmie figurującym w Current Content.

Zgłoszenia wraz z dwoma odbitkami należy kierować do dnia 15 listopada każdego roku pod adresem Fundacji. Regulamin nagrody poniżej.

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej  
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa  
tel. 34-03-44, fax 3404470

### Regulamin

dorocznej nagrody Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej

- \* 1. Raz w roku przyznawana będzie jedna nagroda za wyróżniającą się, oryginalną pracę z zakresu biologii komórki, indywidualną lub zespołową, wykonaną wyłącznie w krajowej placówce naukowej.
- \* 2. Praca musi być wydrukowana w czasopiśmie naukowym referowanym w Current Content.
- \* 3. Praca powinna być opublikowana nie wcześniej niż w ostatnich dwóch latach poprzedzających nadanie nagrody.
- \* 4. Preferowane będą prace młodych autorów.
- \* 5. Wysokość nagrody w danym roku kalendarzowym ustala Zarząd Fundacji.
- \* 6. Zgłaszać pracę do nagrody może każdy.
- \* 7. Pracę należy zgłaszać do Zarządu Fundacji ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, pokój 314 do 15 października każdego roku.
- \* 8. Ocenę kwalifikującą prace do nagrody przeprowadza Komisja Nagród powołana przez Zarząd Fundacji zasięgając w razie potrzeby opinii specjalistów.
- \* 9. Decyzja Komisji ogłaszana będzie w "Postęпах Biologii Komórki".
- \* 10. Nagroda wręczana będzie w czasie jednej z konferencji naukowych z zakresu biologii komórki.



## WSKAZÓWKI PRZYGOTOWANIA TEKSTU ARTYKUŁU I RYSUNKÓW

do publikacji w Postęпах Biologii Komórki

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w edytorze Word, wersja 6.0 lub wcześniejsza.

Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać również umieszczone osobno na dyskietce. Jeśli autor dostarcza rysunki na dyskietce, powinny to być albo mapy bitowe (.TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5.0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda i Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej.

### ERRATA

Sprostowanie do artykułu pt. *Zastosowanie technik cytogenetycznych do biologicznego monitorowania narażenia na czynniki mutagenne* – autorstwa: M. Sąsiadek, M. Paprocka-Borowicz, R. Ślęzak opublikowanego w: *Postępy Biologii Komórki* 1996; 23(3): 373–384.

**Jest:** Rys. 4. Przykład komórki dwujądźrzastej z widocznym mikrojądrem (zaznaczone strzałką)

**Powinno być:** Rys. 4. Przykład komórki dwujądźrzastej z widocznym mikrojądrem (zaznaczone strzałką – zdjęcie pochodzi z pracy Surrellesa i wsp. [36])

## NR 1

W tym Zeszyście • Postępów Biologii Komórki •	1
BARCZYK A.: Cytogenetyka męskiej gametogenezy. Część 2. Translokacje robertsonowskie i inwersje	3
KWIATKOWSKA J., SŁOMSKI R.: Powtórzenia sekwencji mikrosatelitarnych w genomie człowieka	19
ŚNIEŻKO R.: Kierunki badań nad cytoszkieletem komórek roślinnych	31
SZUMIEL I.: Regulacja cyklu komórkowego w napromienionej komórce zwierzęce	49
KOCIK J.: Udział cytokin i innych mediatorów w procesie gojenia rany	63
FRANCZAK A., KOTWICA G.: Fizjologiczna rola relaksyny	83
MAŁECKA-PANAS E.: Czynniki wzrostowe rodziny EGF i ich rola w karcinogenezie jelita grubego	107
SOPEL M., MURAWSKI M., ZABEL M.: PTHrP ( <i>parathyroid hormone-related peptide</i> ) – nowy peptydowy hormon o wielu funkcjach	127
Komunikaty	147
Errata	147

## NR 2

W tym zeszyście	145
Wspomnienie pośmiertne o prof. K. Stojałowskim	147
BANDOROWICZ-PIKUŁA J.: Rola aneksyn, białek wiążących $Ca^{2+}$ i fosfolipidy w komórce – o fuzji błon biologicznych do przekazywania informacji	151
HAUS O.: Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. I. Przewlekła białaczka szpikowa Ph-dodatnia [Ph(+)] CML	169
HAUS O.: Cytogenetyka przewlekłej białaczki szpikowej. II. Cytogenetyczne podtypy przewlekłej białaczki szpikowej (CML); Ph-ujemna CML, mozaikowatość Ph, warianty translokacyjne Ph	183
KOWALCZYK D.: Analiza różnorodności receptorów limfocytów T wiążących antygen w guzach litych	197
SZCZYGIEŁ M., KURPISZ M.: Struktura plemnikowego DNA ssaków	211
ŻAK I.: Receptory adhezyjne	221
HINEK A., HINEK A.: Funkcje biologiczne receptora elastynowego	243
CZEKAJ P.: Interakcje receptorów hormonu tarczycy i pochodnych witamin A i D z DNA	261
KRAJEWSKA W. M., MŁYNARSKI W., WÓJCIK M.: Genetyczne podstawy transformacji nowotworowej jelita grubego	279
SŁOWIŃSKI J., HARABIN-SŁOWIŃSKA M., KAŁUŻA J.: Zjawisko apoptozy w układzie nerwowym	299
Komunikaty	313

## NR 3

W tym zeszytcie	317
MARLICZ W.: Trombopoetyna – odkrycie, właściwości i potencjalne zastosowanie kliniczne	319
JAŁOSZYŃSKI P., KUJAWSKI M. SZYFTER K.: Nowa technika badania uszkodzeń DNA – comet assay	339
KUPCZYK P., SOWIŃSKI P., TRZECIAK W. H.: Diagnostyka molekularna zespołu nadnerczowo-płciowego	355
SĄSIADK M., PAPROCKA-BOROWICZ M., ŚLĘZAK R.: Zastosowanie technik cytogenetycznych do biologicznego monitorowania narażenia na czynniki mutagenne	373
GBUREK J., GOŁĄB K.: Cystatyny pochodzenia roślinnego	385
TRETYN A.: Białka wiążące GTP: budowa i funkcje	399
ROŻYŃKOWA D.: Apoptoza doświadczalna: Modele indukcji <i>in vitro</i> i zastosowania	421
KOPEĆ-ŚLĘZAK J.: Czynniki regulacyjne apoptozy	445
MADEJA Z., KOROHODA W.: Niektóre zastosowania metody komputerowej analizy obrazu (cytometrii obrazowej) w biologii komórki	457
ŚLÓSAREK G., BARCISZEWSKI J.: Struktura i funkcja systeminy – peptydu o właściwościach hormonu roślinnego	477
Statut Polskiego Towarzystwa Cytometrii	491
Komunikaty	498

## NR 4

Pamięci doktora Macieja Kawalca	503
W tym zeszytcie	505
JAKÓBISIAK M.: Niektóre aspekty restrykcji MHC	507
JANA B., STĘPIEŃ A.: Wpływ cytokin na hormonalną regulację procesów rozrodu	513
HEJNOWICZ Z.: Akwaporynowe kanały wodne komórek zwierzęcych i roślinnych	529
ŻEKANOWSKI C.: Nowe zastosowania peptydowych kwasów nukleinowych	547
KAPUSTA P., KORDOWIAK A. M. : Receptory eikozanoidów	559
STĘPIEŃ E.: Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost neuronów	577
WYROBA E., SURMACZ L.: Receptor beta-adrenergiczny: Budowa i istotne motywy sekwencyjne	601
PUCICKA-HOFFMANN K., KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E.: Budowa i funkcje receptorów lipoprotein ze szczególnym uwzględnieniem rodziny receptora LDL	615
KORDYLEWSKI L.: Trójwymiarowa mikroskopia świetlna	635
JAKUBOWSKA A., MURACH A. P., KOWALCZYK S.: Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin	657
SOCHA K.: Wybrane zagadnienia z fizjologii i patologii komórki śródbłonka	683
KITLIŃSKA J., WOJCIEROWSKI J.: Cząsteczki adhezyjne w nowotworach jelita grubego	705
Sprawozdanie z działalności zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za okres czerwiec 1994 – sierpień 1996	717
Komunikaty	722
Errata	725





## 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. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności, a do Redakcji w Warszawie tylko artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

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

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

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach na adres redakcji w Warszawie bądź jednego z Redaktorów (adresy na 2 str. okładki). Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 z podwójną interlinią i marginesem 4 cm po lewej stronie. Strony powinny być kolejno numerowane. Nadesłanie tekstu pracy, **poprawionego po recenzjach**, i rysunków (wskazówki w z. 4/96 na s. 724) na dyskietce przyspieszy publikację.

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

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

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *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 powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Wymiary poszczególnych rysunków, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki muszą być opatrzone na odwrocie nazwiskiem pierwszego autora i oznaczeniem góry i dołu ilustracji. Stosowane jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 3 dni. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą, a ponadto mogą zamówić odbitki odpłatnie.

Redakcja prosi o propozycję do 5 osób (nazwisko, imię, adres, fax), które byłyby odpowiednimi recenzentami maszynopisu, nie powinny jednak być pracownikami instytucji, w której pracuje autor, ani jego współpracownikami. Redakcja prosi także głównego Autora o dołączenie do maszynopisu podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, Treść pracy nie była uprzednio publikowana i nie została tabel i rycin. **tak nie** wysłana do innej redakcji. **tak nie**

Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę. **tak nie** Dołączono kopię pracy na dyskietce z podaniem nazwy

Jest zgoda osób, których informacje niepubli- pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM **tak nie**

kowane są zamieszczone w tekście artykułu **tak nie** Odpowiadam za całość pracy opisanej w zał. maszyn. **tak nie**

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w "Postęпах Biologii Komórki" przechodzi na własność reda- kcji i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. **tak nie** *podpis*

## TREŚĆ

Pamięci doktora Macieja Kawalca	503
W tym zeszycie	505
JAKÓBISIAK M.: Niektóre aspekty restrykcji MHC	507
JANA B., STĘPIEŃ A.: Wpływ cytokin na hormonalną regulację procesów rozrodu	513
HEJNOWICZ Z.: Akwaporynowe kanały wodne komórek zwierzęcych i roślinnych	529
ŻEKANOWSKI C.: Nowe zastosowania peptydowych kwasów nukleinowych	547
KAPUSTA P., KORDOWIAK A. M.: Receptory eikozanoidów	559
STĘPIEŃ E.: Czynniki warunkujące ukierunkowany wzrost neuronów	577
WYROBA E., SURMACZ L.: Receptor beta-adrenergiczny: Budowa i istotne motywy sekwencyjne	601
PUCICKA-HOFFMANN K., KOPIECZNA-GRZEBIENIAK E.: Budowa i funkcje receptorów lipoprotein ze szczególnym uwzględnieniem rodziny receptora LDL	615
KORDYLEWSKI L.: Trójwymiarowa mikroskopia świetlna	635
JAKUBOWSKA A., MURACH A. P., KOWALCZYK S.: Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin	657
SOCHA K.: Wybrane zagadnienia z fizjologii i patologii komórki śródbłonna	683
KITLIŃSKA J., WOJCIEROWSKI J.: Cząsteczki adhezyjne w nowotworach jelita grubego	705
Sprawozdanie z działalności zarządu Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej za okres czerwiec 1994 – sierpień 1996	717
Komunikaty	722
Errata	724

## Warunki prenumeraty kwartalnika POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

***Prenumerata na rok 1997***

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 1997 na konto:

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

Cena prenumeraty rocznika na rok 1997:

- dla instytucji (bibliotek) wynosi 50 zł,
- a dla odbiorców indywidualnych 16 zł.

*Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 1997 should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa/Poland, account No:*

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

*Price per year 20 USD.*

Indeks 369705